

AGENTE TERAPÉUTICO QUE INDUCE CITOTOXICIDAD

Campo de la Invención

La presente invención se refiere a moléculas
5 multiespecíficas que se unen al antígeno, usos de las mismas, y
tales.

Antecedentes de la Invención

Los anticuerpos están dirigiendo la atención como
farmacéuticos debido a su alta estabilidad en plasma y pocas
10 reacciones adversas (Documentos No Patentes 1 y 2). Los
anticuerpos se conocen por inducir no solamente una acción de unión
al antígeno, una acción agonística, y una acción antagonística,
sino también por actividades citotóxicas mediadas por el efector
(también llamadas funciones efectoras), tales como citotoxicidad
15 celular dependiente del anticuerpo (ADCC, por sus siglas en
inglés), fagocitosis celular dependiente del anticuerpo (ADCP,
por sus siglas en inglés), y citotoxicidad dependiente del
complemento (CDC, por sus siglas en inglés), y presentan efectos
antitumorales contra células cancerígenas (Documento No Patente
20 3). La ADCC es una citotoxicidad presentada por células efectoras
contra las células de cáncer de objetivo unidas al anticuerpo
mediante unión de la región Fc del anticuerpo a un receptor de
Fc presente en células efectoras tal como células NK y macrófagos.
Un complejo de complemento se une al sitio de unión al complemento
25 presente en una estructura de anticuerpo. La CDC es lesión celular

que resulta de la destrucción celular donde una entrada de agua y iones en las células es promovida por la formación del poro en la membrana celular de las células que se unen al anticuerpo por componentes del complemento presentes en el complejo. Un número
5 de anticuerpos terapéuticos que muestran excelentes efectos anti-tumorales han sido desarrollados como farmacéuticos para el tratamiento del cáncer (Documento No Patente 4); y mientras anticuerpos terapéuticos existentes han mostrado acciones excelentes, el resultado terapéutico logrado por la
10 administración de estos anticuerpos todavía no es satisfactorio.

Para que un anticuerpo exprese ADCC, ADCP, y CDC, es necesario para la región Fc del anticuerpo, que el receptor del anticuerpo ($\text{Fc}\gamma\text{R}$, por sus siglas en inglés) presente en las células efectoras tales como células NK y macrófagos, y varios componentes
15 del complemento, se unan. En humanos, las isoformas de $\text{Fc}\gamma\text{RIa}$, $\text{Fc}\gamma\text{RIIa}$, $\text{Fc}\gamma\text{RIIb}$, $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$, y $\text{Fc}\gamma\text{RIIIb}$ han sido reportadas como la familia de proteínas $\text{Fc}\gamma\text{R}$, y los alotipos respectivos han sido reportados también (Documento No Patente 5). Entre estas
20 isoformas, $\text{Fc}\gamma\text{RIa}$, $\text{Fc}\gamma\text{RIIa}$, y $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$ llevan un dominio llamado la Porción de Activación a base de Tirosina del Inmunorreceptor (TTAM, por sus siglas en inglés) en el dominio intracelular, y transmiten señales de activación. Por otro lado, solamente $\text{Fc}\gamma\text{RIIb}$ lleva un dominio llamado la Porción Inhibidora a base de Tirosina del Inmunorreceptor (ITIM, por sus siglas en inglés), en el dominio
25 intracelular, y transmite señales inhibitoras. Cada uno de los

Fc γ Rs se conoce por transmitir señales mediante reticulación por complejos inmunes y tales (Documento No Patente 6). Cuando los anticuerpos ejercen actualmente una función efectora en células de cáncer, el Fc γ R en la membrana de células efectora forma grupos en las regiones Fc de varios anticuerpos unidos a la membrana de células cancerígenas, y las señales de activación son transmitidas por las células efectoras. Como resultado, se ejerce un efecto citocida, pero puesto que las Fc γ Rs son reticuladas solamente en las células efectoras presentes cerca de las células de cáncer esta vez, la activación de inmunidad se muestra por ocurrir localmente en células cancerígenas (Documento No Patente 7).

Las inmunoglobulinas que se originan naturalmente se unen a antígenos en sus regiones variables, y se unen a receptores tales como Fc γ R, FcRn, Fc α R, y Fc ϵ R, y complementos en sus regiones constantes. El FcRn es una de las moléculas de unión que interactúan en la región Fc del IgG, y puesto que cada una de las cadenas pesadas de anticuerpo se une a una molécula de FcRn, dos moléculas de FcRn han sido reportadas por unirse a una molécula de anticuerpo de tipo IgG. Sin embargo, distinto del FcRn y tal, el Fc γ R interactúa en la región de articulación del anticuerpo y dominio de CH₂, y solamente una molécula del Fc γ R se une a una molécula del anticuerpo de tipo IgG (Documento No Patente 8). Además, un anticuerpo de tipo IgG que se origina naturalmente reconoce y se une a un epítipo único mediante su región variable (Fab); por lo tanto, puede unirse a solamente un antígeno. Por

otro lado, se conocen muchos tipos de proteínas por estar interfiriendo en el cáncer e inflamación, y pueden ser reticuladas entre las proteínas. Por ejemplo, varias citocinas inflamatorias (TNF, IL1, y IL6) se conocen por estar involucradas en enfermedades
5 inmunológicas (Documento No Patente 9). Además, la activación de otros receptores se conoce como uno de los mecanismos de cáncer en adquirir resistencia al fármaco (Documento No Patente 10). En tales casos, los anticuerpos comunes que reconocen un epítipo único podrían ser incapaces de inhibir las proteínas múltiples.

10 Los anticuerpos (anticuerpos biespecíficos) que se unen a dos o más tipos de antígenos con una molécula están siendo estudiados como moléculas que inhiben objetivos múltiples. Es posible conferir actividades de unión a dos diferentes antígenos (un primer antígeno y un segundo antígeno) modificando anticuerpos
15 de tipo IgG que se originan naturalmente (Documento No Patente 11). Por consiguiente, no solamente existirá neutralización de dos o más tipos de antígenos por una molécula única, sino también mejoramiento de la actividad antitumoral debido a reticulaciones entre células que tienen actividad citotóxica y células de cáncer.

20 Como formas moleculares de un anticuerpo biespecífico, una molécula que comprende un sitio que se une al antígeno agregada a N-terminal o C-terminal de un anticuerpo (DVD-Ig y scFv-IgG), una molécula que tiene diferentes secuencias para las dos regiones Fab de un anticuerpo (anticuerpo biespecífico de cadena L común
25 e hibridoma de híbrido), una molécula en la cual una región Fab

reconoce dos antígenos (IgG dos en uno), y una molécula que tiene un sitio de bucle de región CH3 como un nuevo sitio que se une al antígeno (Fcab), han sido reportados hasta ahora (Documentos No Patentes 12 y 13). Puesto que todos los anticuerpos
5 biespecíficos interactúan en sus regiones Fc con FcγR, las funciones efectoras del anticuerpo son preservadas. De este modo, el anticuerpo biespecífico se une a cualquier antígeno que reconoce y al mismo tiempo se une a FcγR, y presenta actividad ADCC contra células que expresan el antígeno.

10 Si todos los antígenos reconocidos por el anticuerpo biespecífico son antígenos específicamente expresados específicamente en cáncer, el anticuerpo biespecífico presenta actividad citotóxica a células de cáncer cuando se une a cualquiera de los antígenos. Por lo tanto, en comparación con un fármaco
15 de anticuerpo convencional que reconoce un antígeno, un efecto antitumoral más eficiente puede esperarse a partir de tal anticuerpo. Sin embargo, en el caso donde cualquiera de los antígenos reconocidos por el anticuerpo biespecífico es expresado en tejidos normales o células expresadas en inmunocitos, el daño
20 en los tejidos normales o liberación de citocinas ocurre debido a la reticulación con FcγR (Documento No Patente 14). Como un resultado, se inducen fuertes reacciones adversas.

Un anticuerpo que se redirige a células T que emplea citotoxicidad movilizando células T como células efectoras como
25 el mecanismo por su efecto antitumoral, se ha conocido desde la

década de los años 1980 como un anticuerpo biespecífico (Documentos No Patentes 15, 16, y 17). Distinto de los anticuerpos que emplean células NK que movilizan ADCC o macrófagos como células efectoras como el mecanismo por sus efectos antitumorales, un anticuerpo que se redirecciona a células T es un anticuerpo contra cualquiera de las subunidades que constituyen el complejo del receptor de células T (TCR) en las células T, y es específicamente un anticuerpo biespecífico que comprende un anticuerpo que se une a la cadena épsilon CD3 y un anticuerpo que se une a un antígeno en la célula de cáncer objetivo. Las células T se acercan a células de cáncer mediante unión simultánea de la cadena épsilon CD3 y un antígeno cancerígeno por un anticuerpo que redirecciona las células T. Como un resultado, los efectos antitumorales contra células de cáncer son considerados por ser ejercidos a través de la actividad citotóxica poseída por las células T.

El catumaxomab, el cual se conoce como un anticuerpo que redirecciona células T, se une a dos Fabs cada uno a un antígeno de cáncer (EpCAM) y a una cadena CD3 ϵ (CD3 épsilon) expresada en células T. El catumaxomab induce actividad citotóxica mediada por células T por unión al antígeno de cáncer y a CD3 ϵ al mismo tiempo, e induce actividad citotóxica mediada por células que presentan antígeno tales como células NK y macrófagos, por unión al antígeno de cáncer y Fc γ R al mismo tiempo. Por el uso de estas dos actividades citotóxicas, el catumaxomab presenta un alto efecto terapéutico en ascitos malignos por administración intraperitoneal y de este

modo, ha sido aprobado en Europa (Documento No Patente 18). En
adición, existen casos donde la administración de catumaxomab
según se informa, proporciona anticuerpos reactivos a células de
cáncer, lo cual claramente muestra que la inmunidad adquirida es
5 inducida (Documento No Patente 19). A partir de este resultado,
los anticuerpos que tienen tanto actividad citotóxica mediada por
células T como las acciones mediadas por Fc γ R por células tales
como células NK o macrófagos (estos anticuerpos son
particularmente referidos como anticuerpos trifuncionales), han
10 recibido atención debido a un fuerte efecto antitumoral y se puede
esperar inducción de la inmunidad adquirida.

Los anticuerpos trifuncionales, sin embargo, se unen
a CD3 ϵ y Fc γ R al mismo tiempo aún en la ausencia de un antígeno
de cáncer y por lo tanto reticulan células T que expresan CD3 ϵ
15 con células que expresan Fc γ R aún en un ambiente ausente de células
de cáncer, conduciendo a la producción de varias citocinas en
grandes cantidades. Tal inducción independiente del antígeno de
cáncer de producción de varias citocinas, restringe la
administración actual de los anticuerpos trifuncionales a una ruta
20 intraperitoneal (Documento No Patente 20). Los anticuerpos
trifuncionales son muy difíciles de administrar sistémicamente
debido a varias reacciones adversas similares a tormentas de
citocina severas. En efecto, en el ensayo clínico Fase I de
administración de catumaxomab sistémicamente a pacientes con
25 cáncer de pulmón de células no pequeñas, una dosis muy pequeña

de 5 µg/cuerpo, es la dosis máxima permisible, y la administración de una dosis más ha sido reportada por provocar varias reacciones adversas serias (Documento No Patente 21).

Como tal, los anticuerpos biespecíficos por técnicas
5 convencionales pueden unirse a ambos antígenos, el primer antígeno es el antígeno de cáncer (EpCAM) y el segundo antígeno es CD3 ϵ , al mismo tiempo cuando se unen a Fc γ R; y por lo tanto, en vista de su estructura molecular es imposible evitar reacciones adversas causadas por la unión simultánea a Fc γ R y al segundo antígeno CD3 ϵ .

10 No obstante, distinto del catumaxomab, el BiTE no tiene sitio que se une al receptor Fc γ , y por lo tanto no reticula los receptores expresados en células T y células tales como células NK y macrófagos en una manera dependiente del antígeno de cáncer. De este modo, se ha demostrado que el BiTE no causa inducción de
15 citocina independiente del antígeno del cáncer lo cual se observa cuando el catumaxomab es administrado. Sin embargo, puesto que el BiTE es una molécula de anticuerpo de bajo peso molecular modificada sin una región Fc, el problema es que su vida útil en sangre después de la administración a un paciente es
20 significativamente más corta que los anticuerpos de tipo IgG convencionalmente usados como anticuerpos terapéuticos. En efecto, la vida útil en sangre de BiTE administrado *in vivo*, ha sido reportada por ser aproximadamente varias horas (Documentos No Patentes 22 y 23). En los ensayos clínicos de blinatumomab,
25 se administró por infusión intravenosa continua usando una

minibomba. Este método de administración no es solamente extremadamente inconveniente para pacientes, sino también tiene el riesgo potencial de accidentes médicos debido al mal funcionamiento del dispositivo o similares. De este modo, no se
5 puede decir que tal método de administración es deseable.

En años recientes, el uso de una región Fc con actividad de unión reducida a Fc γ R, ha permitido el mantenimiento de la fuerte actividad antitumoral poseída por el BiTE y la excelente propiedad de seguridad de no inducir una tormenta de citocina en
10 una manera dependiente del antígeno de cáncer, y ha proporcionado nuevos ensambles de polipéptido que tienen vidas útiles en la sangre (Documento de Patente 1).

Por otro lado, cuando se expresa un anticuerpo biespecífico por técnicas convencionales, puesto que dos tipos
15 de cadenas H y dos tipos de cadenas L son expresados, son concebibles diez combinaciones. Entre ellas, solamente una de las combinaciones producidas tiene la especificidad de unión de interés.

Por lo tanto, para obtener el anticuerpo biespecífico
20 de interés, el anticuerpo único de interés debe ser purificado a partir de los diez tipos de anticuerpos, lo cual es muy ineficiente y difícil.

Un método para secretar preferiblemente IgGs con una combinación heterodimérica de cadenas H, por ejemplo, una
25 combinación de una cadena H contra el antígeno A y una cadena H

contra el antígeno B, introduciendo sustituciones de aminoácido en la región CH3 de cadena H de IgG, se ha reportado como un método para resolver este problema (Documentos de Patente 2, 3, 4, 5, 6, 7, y Documentos No Patentes 24 y 25). Un método que utiliza la alteración física, es decir, "botón" y "ojal", y un método que utiliza la repulsión de carga eléctrica ha sido reportado como tales métodos.

Para obtener la molécula de interés con mejor eficiencia, los métodos para usar cadenas L que pueden unirse a dos diferentes antígenos aún a través de las cadenas L, tienen la misma secuencia de aminoácido que ha sido reportada (Documentos de Patente 8 y 9). Sin embargo, la afinidad del antígeno puede reducirse mayormente con el uso de cadenas L comunes, y es difícil encontrar cadenas L comunes que mantienen la afinidad del antígeno.

Lista de Citaciones

Documentos de Patente

Documento de Patente 1- W02012/073985
 Documento de Patente 2- W096/27011
 Documento de Patente 3- W02006/106905
 Documento de Patente 4- W02007/147901
 Documento de Patente 5- W02009/089004
 Documento de Patente 6- W02010/129304
 Documento de Patente 7- W02013/065708
 Documento de Patente 8- W098/050431

Documento de Patente 9- W02006/109592

Documentos No Patente

Documento No Patente 1- Nat. Biotechnol. (2005) 23,
1073-1078

5 Documento No Patente 2- Eur J Pharm Biopharm. (2005) 59 (3),
389-396

Documento No Patente 3- Drug Des Devel Ther (2009) 3, 7-16

Documento No Patente 4- Clin Cancer Res. (2010) 16 (1), 11-20

Documento No Patente 5- Immunol. Lett. (2002) 82, 57-65

10 Documento No Patente 6- Nat. Rev. Immunol. (2008) 8, 34-47

Documento No Patente 7- Ann. Rev. Immunol. (1988). 6. 251-81

Documento No Patente 8- J. Bio. Chem., (20001) 276,
16469-16477

Documento No Patente 9- Nat. Biotech., (2011) 28, 502-10

15 Documento No Patente 10- Endocr Relat Cancer (2006) 13,
45-51

Documento No Patente 11- MAbs. (2012) Mar 1,4(2)

Documento No Patente 12- Nat. Rev. (2010) 10, 301-316

Documento No Patente 13- Peds (2010), 23(4), 289-297

20 Documento No Patente 14- J. Immunol. (1999) Aug 1, 163(3),
1246-52

Documento No Patente 15- Nature (1985) 314 (6012), 628-31

Documento No Patente 16- Int J Cancer (1988) 41 (4), 609-15.

25 Documento No Patente 17- Proc Natl Acad Sci USA (1986) 83
(5), 1453-7

Documento No Patente 18- Cancer Treat Rev. (2010) Oct 36(6),
458-67

Documento No Patente 19- Future Oncol. (2012) Jan 8(1),
73-85

5 Documento No Patente 20- Cancer Immunol Immunother. (2007)
56(9), 1397-406

Documento No Patente 21- Cancer Immunol Immunother. (2007)
56 (10), 1637-44

Documento No Patente 22- Cancer Immunol Immunother. (2006)
10 55(5), 503-14

Documento No Patente 23- Cancer Immunol Immunother. (2009)
58(1), 95-109

Documento No Patente 24- Protein Engineering. (1996) vol.9,
p.617-621

15 Documento No Patente 25- Nature Biotechnology. (1998)
vol.16, p.677-681

Breve Descripción de la Invención

Problemas que serán resueltos por la invención

La presente invención se logró en vista de las
20 circunstancias anteriores. Un objetivo de la presente invención
es proporcionar moléculas multiespecíficas que se unen al antígeno
que llevan células T cercanas a las células de cáncer objetivo,
y pueden tratar cáncer a través de la actividad citotóxica de
células T contra los tejidos de cáncer objetivo que contienen
25 células que expresan glipicano-3, y son formas moleculares que

pueden ser producidas con alta eficiencia; métodos para producir las moléculas que se unen al antígeno; y composiciones farmacéuticas que comprenden las moléculas que se unen al antígeno como ingrediente activo.

5 Medios para Resolver los Problemas

Los presentes inventores descubrieron una cadena L común a un dominio que comprende una región variable de anticuerpo que se une a glipicano-3, y un dominio que comprende una región variable de anticuerpo que se une al complejo del receptor de
10 células T, donde la cadena L común es capaz de mejorar la afinidad de ambos antígenos. Esto permite la preparación de formas moleculares que pueden ser producidas con alta eficiencia, y además el descubrimiento de nuevas moléculas multiespecíficas que se unen al antígeno que mantienen la fuerte actividad antitumoral
15 poseída por los anticuerpos que se redireccionan a células T tales como BiTE y la excelente propiedad de seguridad de no inducir una tormenta de citocina en una manera dependiente del antígeno de cáncer, y también tienen vidas útiles largas en la sangre. Además, los presentes inventores descubrieron que las moléculas
20 multiespecíficas que se unen al antígeno que comprenden cadenas L comunes se dirigen a células de cáncer que expresan glipicano-3 y causan lesión celular. Basados en este descubrimiento, los presentes inventores elucidaron que las moléculas multiespecíficas que se unen al antígeno de la presente invención,
25 causan lesión a tejidos de cáncer que contienen células de cáncer

que expresan glipicano 3.

Más específicamente, la presente invención proporciona lo siguiente:

[1] Una molécula multiespecífica que se une al antígeno
5 que comprende:

(1) un dominio que comprende una región variable de anticuerpo que tiene actividad de unión a glipicano-3,

(2) un dominio que comprende una región variable de anticuerpo que tiene actividad de unión al complejo receptor de
10 células T, y

(3) un dominio que comprende una región Fc con actividad de unión reducida hacia un receptor Fc, en donde las regiones variables de cadena L comprendidas en la región variable de (1) y la región variable de (2) tienen una secuencia de aminoácido
15 común; en donde la molécula multiespecífica que se une al antígeno tiene una actividad citotóxica equivalente a, o mayor que aquella del anticuerpo biespecífico GPC3_ERY22_rCE115 que comprende un dominio de unión a glipicano-3 que comprende las SEQ ID N0s: 47 y 48, y un dominio de unión al complejo del receptor de células
20 T que comprende las SEQ ID N0s: 49 y 50.

[2] La molécula multiespecífica que se une al antígeno de [1], en donde la actividad citotóxica es actividad citotóxica dependiente de células T.

[3] La molécula multiespecífica que se une al antígeno
25 de [1] o [2], en donde la actividad que se une al complejo del

receptor de células T es actividad de unión hacia un receptor de células T.

[4] La molécula multiespecífica que se une al antígeno de cualquiera de [1] hasta [3], en donde la actividad que se une
5 al complejo del receptor de células T es actividad que se une hacia una cadena CD3 ϵ .

[5] La molécula multiespecífica que se une al antígeno de cualquiera de [1] hasta [4], en donde la región variable de anticuerpo de (1) en [1] es una región variable de anticuerpo que
10 comprende cualquiera de las combinaciones de CDR1, CDR2 y CDR2 de cadena H, seleccionadas a partir de (a1) hasta (a5) siguientes, o una región variable de anticuerpo funcionalmente equivalente a esta:

(a1) Las CDR1, CDR2, y CDR3 idénticas a las secuencias
15 de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 40;

(a2) Las CDR1, CDR2, y CDR3 idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 197;

20 (a3) Las CDR1, CDR2, y CDR3 idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 206;

(a4) Las CDR1, CDR2, y CDR3 idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en
25 la SEQ ID NO: 211; y

(a5) Las CDR1, CDR2, y CDR3 idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 215.

[6] La molécula multiespecífica que se une al antígeno
5 de cualquiera de [1] hasta [4], en donde la región variable de anticuerpo de (2) en [1] es una región variable de anticuerpo que comprende cualquiera de las combinaciones de las secuencias de aminoácido de CDR1, CDR2, y CDR3 de cadena H, seleccionadas a partir de (b1) hasta (b15) siguientes, o una región variable de
10 anticuerpo funcionalmente equivalente a esta:

(b1) Las CDR1, CDR2, y CDR3 idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 52;

(b2) Las CDR1, CDR2, y CDR3 idénticas a las secuencias
15 de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 103;

(b3) Las CDR1, CDR2, y CDR3 idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 122;

20 (b4) Las CDR1, CDR2, y CDR3 idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 128;

(b5) Las CDR1, CDR2, y CDR3 idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en
25 la SEQ ID NO: 129;

(b6) Las CDR1, CDR2, y CDR3 idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 132;

5 (b7) Las CDR1, CDR2, y CDR3 idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 142;

(b8) Las CDR1, CDR2, y CDR3 idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 144;

10 (b9) Las CDR1, CDR2, y CDR3 idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 164;

(b10) Las CDR1, CDR2, y CDR3 idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en
15 la SEQ ID NO: 168;

(b11) Las CDR1, CDR2, y CDR3 idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 421;

(b12) Las CDR1, CDR2, y CDR3 idénticas a las secuencias
20 de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 424;

(b13) Las CDR1, CDR2, y CDR3 idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 426;

25 (b14) Las CDR1, CDR2, y CDR3 idénticas a las secuencias

de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 429; y

(b15) Las CDR1, CDR2, y CDR3 idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 430.

[7] La molécula multiespecífica que se une al antígeno de cualquiera de [1] hasta [4], en donde las regiones variables de anticuerpo de (1) y (2) en [1] son regiones variables de anticuerpo que comprenden cualquiera de las combinaciones de CDR1, CDR2 y CDR2 de cadena H, seleccionadas a partir de los siguientes (c1) hasta (c19), o regiones variables de anticuerpo funcionalmente equivalentes a esta:

(c1) Las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de (1) en [1] e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 40; y Las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de (2) en [1] e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 52;

(c2) Las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de (1) en [1] e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 40; y las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de (2) en [1] e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en

la SEQ ID NO: 421;

(c3) Las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de (1) en [1] e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 40; y las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de (2) en [1] e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 426;

(c4) Las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de (1) en [1] e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 40; y las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de (2) en [1] e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 429;

(c5) Las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de (1) en [1] e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 40; y las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de (2) en [1] e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 430;

(c6) Las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de (1) en [1] e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en

la SEQ ID NO: 197; y las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de (2) en [1] e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 128;

5 (c7) Las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de (1) en [1] e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 206; y las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la
10 región variable de anticuerpo de (2) en [1] e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 142;

 (c8) Las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de (1) en [1] e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en
15 la SEQ ID NO: 206; y las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de (2) en [1] e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 144;

 (c9) Las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región
20 variable de anticuerpo de (1) en [1] e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 206; y las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la
 región variable de anticuerpo de (2) en [1] e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3
25 comprendidas en la SEQ ID NO: 164;

(c10) Las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de (1) en [1] e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 206; y las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la
5 región variable de anticuerpo de (2) en [1] e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 168;

(c11) Las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de (1) en [1] e idénticas a las secuencias
10 de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 211; y las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de (2) en [1] e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 142;

(c12) Las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de (1) en [1] e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 211; y las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la
15 región variable de anticuerpo de (2) en [1] e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 144;
20

(c13) Las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de (1) en [1] e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en
25 la SEQ ID NO: 211; y las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región

variable de anticuerpo de (2) en [1] e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 164;

(c14) Las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de (1) en [1] e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 211; y las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de (2) en [1] e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 168;

(c15) Las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de (1) en [1] e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 215; y las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de (2) en [1] e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 103;

(c16) Las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de (1) en [1] e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 215; y las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de (2) en [1] e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 122;

(c17) Las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región

variable de anticuerpo de (1) en [1] e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 215; y las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de (2) en [1] e idénticas a las
5 secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 129;

(c18) Las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de (1) en [1] e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en
10 la SEQ ID NO: 215; y las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de (2) en [1] e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 132; y

(c19) Las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de (1) en [1] e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en
15 la SEQ ID NO: 215; y las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de (2) en [1] e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3
20 comprendidas en la SEQ ID NO: 424.

[8] La molécula multiespecífica que se une al antígeno de cualquiera de [5] hasta [7], en donde las CDR1, CDR2, y CDR3 son regiones CDR1, CDR2, y CDR3 basadas en la numeración de Kabat.

[9] La molécula multiespecífica que se une al antígeno
25 de cualquiera de [1] hasta [4], en donde la región variable de

anticuerpo de (1) en [1] es una región variable de anticuerpo que comprende cualquiera de las regiones variables de cadena H seleccionadas a partir de (a1) hasta (a5) siguientes, o una región variable de anticuerpo funcionalmente equivalente a esta:

5 (a1) una región variable de cadena H que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 40;

 (a2) una región variable de cadena H que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 197;

 (a3) una región variable de cadena H que tiene la
10 secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 206;

 (a4) una región variable de cadena H que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 211; y

 (a5) una región variable de cadena H que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 215. [10]

15 [10] La molécula multiespecífica que se une al antígeno de cualquiera de [1] hasta [4], en donde la región variable de anticuerpo de (2) en [1] es una región variable de anticuerpo que comprende cualquiera de las regiones variables de cadena H seleccionadas a partir de (b1) hasta (b15) siguientes, o una región
20 variable de anticuerpo funcionalmente equivalente a esta:

 (b1) una región variable de cadena H que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 52;

 (b2) una región variable de cadena H que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 103;

25 (b3) una región variable de cadena H que tiene la

secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 122;

(b4) una región variable de cadena H que tiene la
secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 128;

(b5) una región variable de cadena H que tiene la
5 secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 129;

(b6) una región variable de cadena H que tiene la
secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 132;

(b7) una región variable de cadena H que tiene la
secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 142;

10 (b8) una región variable de cadena H que tiene la
secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 144;

(b9) una región variable de cadena H que tiene la
secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 164;

(b10) una región variable de cadena H que tiene la
15 secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 168;

(b11) una región variable de cadena H que tiene la
secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 421;

(b12) una región variable de cadena H que tiene la
secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 424;

20 (b13) una región variable de cadena H que tiene la
secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 426;

(b14) una región variable de cadena H que tiene la
secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 429; y

(b15) una región variable de cadena H que tiene la
25 secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 430. [11]

[11] La molécula multiespecífica que se une al antígeno de cualquiera de [1] hasta [4], en donde las regiones variables de anticuerpo de (1) y (2) en [1] son regiones variables de anticuerpo que comprenden cualquiera de las combinaciones de las
5 regiones variables de cadena H seleccionadas a partir de (c1) hasta (c19) siguientes, o regiones variables de anticuerpo funcionalmente equivalentes a esta:

(c1) una región variable de cadena H comprendida en la región variable de anticuerpo de (1) en [1] la cual tiene la
10 secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 40; y una región variable de cadena H comprendida en la región variable de anticuerpo de (2) en [1] la cual tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 52;

(c2) una región variable de cadena H comprendida en la
15 región variable de anticuerpo de (1) en [1] la cual tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 40; y una región variable de cadena H comprendida en la región variable de anticuerpo de (2) en [1] la cual tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 421;

20 (c3) una región variable de cadena H comprendida en la región variable de anticuerpo de (1) en [1] la cual tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 40; y una región variable de cadena H comprendida en la región variable de anticuerpo de (2) en [1] la cual tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID
25 NO: 426;

(c4) una región variable de cadena H comprendida en la región variable de anticuerpo de (1) en [1] la cual tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 40; y una región variable de cadena H comprendida en la región variable de anticuerpo de (2) en [1] la cual tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 429;

(c5) una región variable de cadena H comprendida en la región variable de anticuerpo de (1) en [1] la cual tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 40; y una región variable de cadena H comprendida en la región variable de anticuerpo de (2) en [1] la cual tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 430;

(c6) una región variable de cadena H comprendida en la región variable de anticuerpo de (1) en [1] la cual tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 197; y una región variable de cadena H comprendida en la región variable de anticuerpo de (2) en [1] la cual tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 128;

(c7) una región variable de cadena H comprendida en la región variable de anticuerpo de (1) en [1] la cual tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 206; y una región variable de cadena H comprendida en la región variable de anticuerpo de (2) en [1] la cual tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 142;

(c8) una región variable de cadena H comprendida en la

región variable de anticuerpo de (1) en [1] la cual tiene la
secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 206; y una región variable
de cadena H comprendida en la región variable de anticuerpo de
(2) en [1] la cual tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID
5 NO: 144;

(c9) una región variable de cadena H comprendida en la
región variable de anticuerpo de (1) en [1] la cual tiene la
secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 206; y una región variable
de cadena H comprendida en la región variable de anticuerpo de
10 (2) en [1] la cual tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID
NO: 164;

(c10) una región variable de cadena H comprendida en
la región variable de anticuerpo de (1) en [1] la cual tiene la
secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 206; y una región variable
15 de cadena H comprendida en la región variable de anticuerpo de
(2) en [1] la cual tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID
NO: 168;

(c11) una región variable de cadena H comprendida en
la región variable de anticuerpo de (1) en [1] la cual tiene la
20 secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 211; y una región variable
de cadena H comprendida en la región variable de anticuerpo de
(2) en [1] la cual tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID
NO: 142;

(c12) una región variable de cadena H comprendida en
25 la región variable de anticuerpo de (1) en [1] la cual tiene la

secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 211; y una región variable de cadena H comprendida en la región variable de anticuerpo de (2) en [1] la cual tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 144;

5 (c13) una región variable de cadena H comprendida en la región variable de anticuerpo de (1) en [1] la cual tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 211; y una región variable de cadena H comprendida en la región variable de anticuerpo de (2) en [1] la cual tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID
10 NO: 164;

 (c14) una región variable de cadena H comprendida en la región variable de anticuerpo de (1) en [1] la cual tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 211; y una región variable de cadena H comprendida en la región variable de anticuerpo de
15 (2) en [1] la cual tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 168;

 (c15) una región variable de cadena H comprendida en la región variable de anticuerpo de (1) en [1] la cual tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 215; y una región variable
20 de cadena H comprendida en la región variable de anticuerpo de (2) en [1] la cual tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 103;

 (c16) una región variable de cadena H comprendida en la región variable de anticuerpo de (1) en [1] la cual tiene la
25 secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 215; y una región variable

de cadena H comprendida en la región variable de anticuerpo de (2) en [1] la cual tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 122;

(c17) una región variable de cadena H comprendida en la región variable de anticuerpo de (1) en [1] la cual tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 215; y una región variable de cadena H comprendida en la región variable de anticuerpo de (2) en [1] la cual tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 129;

(c18) una región variable de cadena H comprendida en la región variable de anticuerpo de (1) en [1] la cual tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 215; y una región variable de cadena H comprendida en la región variable de anticuerpo de (2) en [1] la cual tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 132; y

(c19) una región variable de cadena H comprendida en la región variable de anticuerpo de (1) en [1] la cual tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 215; y una región variable de cadena H comprendida en la región variable de anticuerpo de (2) en [1] la cual tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 424. [12]

[12] La molécula multiespecífica que se une al antígeno de cualquiera de [1] hasta [11], en donde la cadena L común de [1] es una cadena L común que comprende cualquiera de las combinaciones de CDR1, CDR2, y CDR3 seleccionadas a partir de (d1)

hasta (d11) siguientes, o una cadena L común funcionalmente equivalente a esta:

(d1) Las CDR1, CDR2, y CDR3 idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en
5 la SEQ ID NO: 53;

(d2) Las CDR1, CDR2, y CDR3 idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 223;

(d3) Las CDR1, CDR2, y CDR3 idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en
10 la SEQ ID NO: 299;

(d4) Las CDR1, CDR2, y CDR3 idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 301;

(d5) Las CDR1, CDR2, y CDR3 idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en
15 la SEQ ID NO: 302;

(d6) Las CDR1, CDR2, y CDR3 idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en
20 la SEQ ID NO: 304;

(d7) Las CDR1, CDR2, y CDR3 idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 306;

(d8) Las CDR1, CDR2, y CDR3 idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en
25

la SEQ ID NO: 307;

(d9) Las CDR1, CDR2, y CDR3 idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 309;

5 (d10) Las CDR1, CDR2, y CDR3 idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 310; y

(d11) Las CDR1, CDR2, y CDR3 idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en
10 la SEQ ID NO: 319.

[13] La molécula multiespecífica que se une al antígeno de cualquiera de [1] hasta [11], en donde la región variable de cadena L de [1] es una región variable de cualquiera de las secuencias de aminoácido de cadena L seleccionadas a partir de
15 (d1) hasta (d11) siguientes:

(d1) una cadena L que comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 53;

(d2) una cadena L que comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 223;

20 (d3) una cadena L que comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 299;

(d4) una cadena L que comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 301;

(d5) una cadena L que comprende la secuencia de
25 aminoácido de la SEQ ID NO: 302;

(d6) una cadena L que comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 304;

(d7) una cadena L que comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 306;

5 (d8) una cadena L que comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 307;

(d9) una cadena L que comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 309;

(d10) una cadena L que comprende la secuencia de
10 aminoácido de la SEQ ID NO: 310; y

(d11) una cadena L que comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 319. [14]

[14] La molécula multiespecífica que se une al antígeno de cualquiera de [1] hasta [4], en donde las regiones variables
15 de anticuerpo de (1) y (2) de [1] y la región variable de cadena L común son regiones variables de anticuerpo que comprenden cualquiera de las combinaciones de CDR1, CDR2, y CDR3 de cadena H y CDR1, CDR2, y CDR3 de cadena L seleccionadas a partir de (e1) hasta (e25) siguientes, o regiones variables de anticuerpo
20 funcionalmente equivalentes a esta:

(e1) Las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de (1) en [1] e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 197; las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región
25 variable de anticuerpo de (2) en [1] e idénticas a las secuencias

de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 128; y las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de la cadena L común e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3
5 comprendidas en la SEQ ID NO: 53;

(e2) Las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de (1) en [1] e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 197; las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región
10 variable de anticuerpo de (2) en [1] e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 128; y las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de la cadena L común e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3
15 comprendidas en la SEQ ID NO: 299;

(e3) Las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de (1) en [1] e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 197; las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región
20 variable de anticuerpo de (2) en [1] e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 128; y las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de la cadena L común e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3
25 comprendidas en la SEQ ID NO: 310;

(e4) Las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de (1) en [1] e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 197; las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de (2) en [1] e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 128; y las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de la cadena L común e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 319;

(e5) Las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de (1) en [1] e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 206; las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de (2) en [1] e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 142; y las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de la cadena L común e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 223;

(e6) Las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de (1) en [1] e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 206; las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de (2) en [1] e idénticas a las secuencias

de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 144; y las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de la cadena L común e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3
5 comprendidas en la SEQ ID NO: 223;

(e7) Las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de (1) en [1] e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 206; las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región
10 variable de anticuerpo de (2) en [1] e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 164; y las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de la cadena L común e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3
15 comprendidas en la SEQ ID NO: 223;

(e8) Las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de (1) en [1] e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 206; las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región
20 variable de anticuerpo de (2) en [1] e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 168; y las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de la cadena L común e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3
25 comprendidas en la SEQ ID NO: 223;

(e9) Las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de (1) en [1] e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 211; las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de (2) en [1] e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 142; y las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de la cadena L común e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 223;

(e10) Las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de (1) en [1] e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 211; las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de (2) en [1] e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 142; y las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de la cadena L común e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 299;

(e11) Las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de (1) en [1] e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 211; las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de (2) en [1] e idénticas a las secuencias

de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 144; y las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de la cadena L común e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3
5 comprendidas en la SEQ ID NO: 223;

(e12) Las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de (1) en [1] e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 211; las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región
10 variable de anticuerpo de (2) en [1] e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 164; y las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de la cadena L común e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3
15 comprendidas en la SEQ ID NO: 223;

(e13) Las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de (1) en [1] e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 211; las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región
20 variable de anticuerpo de (2) en [1] e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 168; y las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de la cadena L común e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3
25 comprendidas en la SEQ ID NO: 223;

(e14) Las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de (1) en [1] e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 215; las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de (2) en [1] e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 103; y las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de la cadena L común e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 53;

(e15) Las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de (1) en [1] e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 215; las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de (2) en [1] e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 103; y las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de la cadena L común e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 299;

(e16) Las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de (1) en [1] e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 215; las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de (2) en [1] e idénticas a las secuencias

de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 103; y las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de la cadena L común e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3
5 comprendidas en la SEQ ID NO: 301;

(e17) Las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de (1) en [1] e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 215; las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región
10 variable de anticuerpo de (2) en [1] e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 103; y las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de la cadena L común e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3
15 comprendidas en la SEQ ID NO: 302;

(e18) Las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de (1) en [1] e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 215; las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región
20 variable de anticuerpo de (2) en [1] e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 103; y las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de la cadena L común e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3
25 comprendidas en la SEQ ID NO: 304;

(e19) Las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de (1) en [1] e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 215; las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de (2) en [1] e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 103; y las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de la cadena L común e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 306;

(e20) Las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de (1) en [1] e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 215; las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de (2) en [1] e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 103; y las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de la cadena L común e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 307;

(e21) Las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de (1) en [1] e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 215; las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de (2) en [1] e idénticas a las secuencias

de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 103; y las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de la cadena L común e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3
5 comprendidas en la SEQ ID NO: 309;

(e22) Las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de (1) en [1] e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 215; las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región
10 variable de anticuerpo de (2) en [1] e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 122; y las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de la cadena L común e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3
15 comprendidas en la SEQ ID NO: 53;

(e23) Las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de (1) en [1] e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 215; las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región
20 variable de anticuerpo de (2) en [1] e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 129; y las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de la cadena L común e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3
25 comprendidas en la SEQ ID NO: 53;

(e24) Las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de (1) en [1] e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 215; las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de (2) en [1] e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 132; y las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de la cadena L común e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 53; y

(e25) Las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de (1) en [1] e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 215; las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de (2) en [1] e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 424; y las CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la región variable de anticuerpo de la cadena L común e idénticas a las secuencias de aminoácido de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 comprendidas en la SEQ ID NO: 53.

[15] La molécula multiespecífica que se une al antígeno de cualquiera de [1] hasta [4], en donde las regiones variables de anticuerpo de (1) y (2) de [1] y la región variable de cadena L común son regiones variables de anticuerpo que comprenden cualquiera de las combinaciones de regiones variables

seleccionadas a partir de (f1) hasta (f26) siguientes, o regiones variables de anticuerpo funcionalmente equivalentes a esta:

(f1) una región variable de cadena H comprendida en la región variable de anticuerpo de (1) en [1] e idéntica a la
5 secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 197; una región variable de cadena H comprendida en la región variable de anticuerpo de (2) en [1] e idéntica a la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 128; y una región variable de anticuerpo de la cadena L común idéntica a la secuencia de aminoácido de la región variable
10 comprendida en la SEQ ID NO: 53;

(f2) una región variable de cadena H comprendida en la región variable de anticuerpo de (1) en [1] e idéntica a la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 197; una región variable de cadena H comprendida en la región variable de anticuerpo de
15 (2) en [1] e idéntica a la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 128; y una región variable de anticuerpo de la cadena L común idéntica a la secuencia de aminoácido de la región variable comprendida en la SEQ ID NO: 299;

(f3) una región variable de cadena H comprendida en la
20 región variable de anticuerpo de (1) en [1] e idéntica a la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 197; una región variable de cadena H comprendida en la región variable de anticuerpo de (2) en [1] e idéntica a la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 128; y una región variable de anticuerpo de la cadena L común
25 idéntica a la secuencia de aminoácido de la región variable

comprendida en la SEQ ID NO: 310;

(f4) una región variable de cadena H comprendida en la región variable de anticuerpo de (1) en [1] e idéntica a la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 197; una región variable
5 de cadena H comprendida en la región variable de anticuerpo de (2) en [1] e idéntica a la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 128; y una región variable de anticuerpo de la cadena L común idéntica a la secuencia de aminoácido de la región variable comprendida en la SEQ ID NO: 319;

10 (f5) una región variable de cadena H comprendida en la región variable de anticuerpo de (1) en [1] e idéntica a la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 206; una región variable de cadena H comprendida en la región variable de anticuerpo de (2) en [1] e idéntica a la secuencia de aminoácido de la SEQ ID
15 NO: 142; y una región variable de anticuerpo of la cadena L común e idéntica a la secuencia de aminoácido de la región variable comprendida en la SEQ ID NO: 223;

(f6) una región variable de cadena H comprendida en la región variable de anticuerpo de (1) en [1] e idéntica a la
20 secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 206; una región variable de cadena H comprendida en la región variable de anticuerpo de (2) en [1] e idéntica a la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 144; y una región variable de anticuerpo de la cadena L común idéntica a la secuencia de aminoácido de la región variable
25 comprendida en la SEQ ID NO: 223;

(f7) una región variable de cadena H comprendida en la región variable de anticuerpo de (1) en [1] e idéntica a la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 206; una región variable de cadena H comprendida en la región variable de anticuerpo de (2) en [1] e idéntica a la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 164; y una región variable de anticuerpo de la cadena L común e idéntica a la secuencia de aminoácido de la región variable comprendida en la SEQ ID NO: 223;

(f8) una región variable de cadena H comprendida en la región variable de anticuerpo de (1) en [1] e idéntica a la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 206; una región variable de cadena H comprendida en la región variable de anticuerpo de (2) en [1] e idéntica a la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 168; y una región variable de anticuerpo de la cadena L común idéntica a la secuencia de aminoácido de la región variable comprendida en la SEQ ID NO: 223;

(f9) una región variable de cadena H comprendida en la región variable de anticuerpo de (1) en [1] e idéntica a la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 211; una región variable de cadena H comprendida en la región variable de anticuerpo de (2) en [1] e idéntica a la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 142; y una región variable de anticuerpo de la cadena L común idéntica a la secuencia de aminoácido de la región variable comprendida en la SEQ ID NO: 223;

(f10) una región variable de cadena H comprendida en la

región variable de anticuerpo de (1) en [1] e idéntica a la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 211; una región variable de cadena H comprendida en la región variable de anticuerpo de (2) en [1] e idéntica a la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 142; y una
5 región variable de anticuerpo de la cadena L común idéntica a la secuencia de aminoácido de la región variable comprendida en la SEQ ID NO: 299;

(f11) una región variable de cadena H comprendida en la región variable de anticuerpo de (1) en [1] e idéntica a la
10 secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 211; una región variable de cadena H comprendida en la región variable de anticuerpo de (2) en [1] e idéntica a la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO:144; y una región variable de anticuerpo de la cadena L común idéntica a la secuencia de aminoácido de la región variable
15 comprendida en la SEQ ID NO: 223;

(f12) una región variable de cadena H comprendida en la región variable de anticuerpo de (1) en [1] e idéntica a la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 211; una región variable de cadena H comprendida en la región variable de anticuerpo de
20 (2) en [1] e idéntica a la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 164; y una región variable de anticuerpo de la cadena L común idéntica a la secuencia de aminoácido de la región variable comprendida en la SEQ ID NO: 223;

(f13) una región variable de cadena H comprendida en
25 la región variable de anticuerpo de (1) en [1] e idéntica a la

secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 211; una región variable de cadena H comprendida en la región variable de anticuerpo de (2) en [1] e idéntica a la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 168; y una región variable de anticuerpo de la cadena L común
5 idéntica a la secuencia de aminoácido de la región variable comprendida en la SEQ ID NO: 223;

(f14) una región variable de cadena H comprendida en la región variable de anticuerpo de (1) en [1] e idéntica a la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 215; una región variable
10 de cadena H comprendida en la región variable de anticuerpo de (2) en [1] e idéntica a la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 103; y una región variable de anticuerpo de la cadena L común idéntica a la secuencia de aminoácido de la región variable comprendida en la SEQ ID NO: 53;

15 (f15) una región variable de cadena H comprendida en la región variable de anticuerpo de (1) en [1] e idéntica a la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 215; una región variable de cadena H comprendida en la región variable de anticuerpo de (2) en [1] e idéntica a la secuencia de aminoácido de la SEQ ID
20 NO: 103; y una región variable de anticuerpo de la cadena L común idéntica a la secuencia de aminoácido de la región variable comprendida en la SEQ ID NO: 299;

(f16) una región variable de cadena H comprendida en la región variable de anticuerpo de (1) en [1] e idéntica a la
25 secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 215; una región variable

de cadena H comprendida en la región variable de anticuerpo de (2) en [1] e idéntica a la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 103; y una región variable de anticuerpo de la cadena L común idéntica a la secuencia de aminoácido de la región variable
5 comprendida en la SEQ ID NO: 301;

(f17) una región variable de cadena H comprendida en la región variable de anticuerpo de (1) en [1] e idéntica a la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 215; una región variable de cadena H comprendida en la región variable de anticuerpo de
10 (2) en [1] e idéntica a la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 103; y una región variable de anticuerpo de la cadena L común idéntica a la secuencia de aminoácido de la región variable comprendida en la SEQ ID NO: 302;

(f18) una región variable de cadena H comprendida en
15 la región variable de anticuerpo de (1) en [1] e idéntica a la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 215; una región variable de cadena H comprendida en la región variable de anticuerpo de (2) en [1] e idéntica a la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 103; y una región variable de anticuerpo de la cadena L común
20 idéntica a la secuencia de aminoácido de la región variable comprendida en la SEQ ID NO: 304;

(f19) una región variable de cadena H comprendida en la región variable de anticuerpo de (1) en [1] e idéntica a la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 215; una región variable
25 de cadena H comprendida en la región variable de anticuerpo de

(2) en [1] e idéntica a la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 103 ; y una región variable de anticuerpo de la cadena L común idéntica a la secuencia de aminoácido de la región variable comprendida en la SEQ ID NO: 306;

5 (f20) una región variable de cadena H comprendida en la región variable de anticuerpo de (1) en [1] e idéntica a la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 215; una región variable de cadena H comprendida en la región variable de anticuerpo de (2) en [1] e idéntica a la secuencia de aminoácido de la SEQ ID
10 NO: 103; y una región variable de anticuerpo de la cadena L común idéntica a la secuencia de aminoácido de la región variable comprendida en la SEQ ID NO: 307;

 (f21) una región variable de cadena H comprendida en la región variable de anticuerpo de (1) en [1] e idéntica a la
15 secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 215; una región variable de cadena H comprendida en la región variable de anticuerpo de (2) en [1] e idéntica a la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 103; y una región variable de anticuerpo de la cadena L común idéntica a la secuencia de aminoácido de la región variable
20 comprendida en la SEQ ID NO: 309;

 (f22) una región variable de cadena H comprendida en la región variable de anticuerpo de (1) en [1] e idéntica a la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 215; una región variable de cadena H comprendida en la región variable de anticuerpo de
25 (2) en [1] e idéntica a la secuencia de aminoácido de la SEQ ID

NO: 122; y una región variable de anticuerpo de la cadena L común idéntica a la secuencia de aminoácido de la región variable comprendida en la SEQ ID NO: 53;

(f23) una región variable de cadena H comprendida en
5 la región variable de anticuerpo de (1) en [1] e idéntica a la
secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 215; una región variable
de cadena H comprendida en la región variable de anticuerpo de
(2) en [1] e idéntica a la secuencia de aminoácido de la SEQ ID
NO: 129; y una región variable de anticuerpo of la cadena L común
10 e idéntica a la secuencia de aminoácido de la región variable
comprendida en la SEQ ID NO: 53;

(f24) una región variable de cadena H comprendida en la
región variable de anticuerpo de (1) en [1] e idéntica a la secuencia
de aminoácido de la SEQ ID NO: 215; una región variable de cadena
15 H comprendida en la región variable de anticuerpo de (2) en [1] e
idéntica a la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 132; y una
región variable de anticuerpo of la cadena L común e idéntica a la
secuencia de aminoácido de la región variable comprendida en la SEQ
ID NO: 53;

20 (f25) una región variable de cadena H comprendida en
la región variable de anticuerpo de (1) en [1] e idéntica a la
secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 215; una región variable
de cadena H comprendida en la región variable de anticuerpo de
(2) en [1] e idéntica a la secuencia de aminoácido de la SEQ ID
25 NO: 424; y una región variable de anticuerpo of la cadena L común

e idéntica a la secuencia de aminoácido de la región variable comprendida en la SEQ ID NO: 53; y

(f26) molécula multiespecífica que se une al antígeno que se une a un epítipo traslapante con cada uno de los epítopos en el complejo receptor de células T y glipicano-3 unidos por la molécula multiespecífica que se une al antígeno de cualquiera de (f1) hasta (f25), y la cual tiene una cadena L común.

[16] La molécula multiespecífica que se une al antígeno de cualquiera de [1] hasta [15], en donde la región Fc de (3) en [1] es una región Fc con una mutación de aminoácido en cualquiera de los aminoácidos que constituyen la región Fc de las SEQ ID NOs: 23 hasta 26 (IgG1 hasta IgG4).

[17] La molécula multiespecífica que se une al antígeno de [16], en donde la región Fc de (3) en [1] es una región Fc con mutación de al menos un aminoácido seleccionado a partir de las siguientes posiciones de aminoácido especificadas por la numeración Estadounidense:

posición 220, posición 226, posición 229, posición 231, posición 232, posición 233, posición 234, posición 235, posición 236, posición 237, posición 238, posición 239, posición 240, posición 264, posición 265, posición 266, posición 267, posición 269, posición 270, posición 295, posición 296, posición 297, posición 298, posición 299, posición 300, posición 325, posición 327, posición 328, posición 329, posición 330, posición 331, y posición 332.

[18] La molécula multiespecífica que se une al antígeno de [16], en donde la región Fc de (3) en [1] es una región Fc que comprende al menos un aminoácido seleccionado a partir de los siguientes aminoácidos especificados por la numeración
5 Estadounidense:

Arg en la posición de aminoácido 234, Ala o Arg en la posición de aminoácido 235, Lys en la posición de aminoácido 239, y Ala en la posición de aminoácido 297.

[19] La molécula multiespecífica que se une al antígeno
10 de cualquiera de [16] hasta [18], en donde la región Fc de (3) en [1] comprende además, una mutación de aminoácido para promover la formación de una región Fc heterodimérica.

[20] La molécula multiespecífica que se une al antígeno de [19], en donde la región Fc heterodimérica es la combinación
15 de secuencia de aminoácido de (g1) o (g2) siguientes:

(g1) una combinación de una secuencia de aminoácido idéntica a la región Fc de una región constante que comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 57, y una secuencia de aminoácido idéntica a la región Fc de una región constante que
20 comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 58; y

(g2) una combinación de una secuencia de aminoácido idéntica a la región Fc de una región constante que comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 60 o 62, y una secuencia de aminoácido idéntica a la región Fc de una región constante que
25 comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 61.

[21] La molécula multiespecífica que se une al antígeno de cualquiera de [1] hasta [20], en donde la molécula multiespecífica que se une al antígeno es un anticuerpo biespecífico.

5 [22] Un anticuerpo biespecífico de cualquiera de (h1) hasta (h25) siguientes:

 (h1) un anticuerpo biespecífico que tiene una cadena H de anticuerpo que tiene actividad de unión a glipicano-3 que comprende una región variable de cadena H de anticuerpo que tiene
10 la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 215 y una región constante que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 61; una cadena H de anticuerpo que tiene actividad de unión al complejo receptor de células T que comprende una región variable de cadena H de anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácido
15 de la SEQ ID NO: 424 y una región constante que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 60 o 62; y una cadena L de anticuerpo común que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 53;

 (h2) un anticuerpo biespecífico que tiene una cadena H de anticuerpo que tiene actividad de unión a glipicano-3 que
20 comprende una región variable de cadena H de anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 215 y una región constante que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 61; una cadena H de anticuerpo que tiene actividad de unión al complejo receptor de células T que comprende una región variable
25 de cadena H de anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácido

de la SEQ ID NO: 103 y una región constante que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 60 o 62; y una cadena L de anticuerpo común que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 53;

(h3) un anticuerpo biespecífico que tiene una cadena
5 H de anticuerpo que tiene actividad de unión a glipicano-3 que comprende una región variable de cadena H de anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 215 y una región constante que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 61; una cadena H de anticuerpo que tiene actividad de unión al
10 complejo receptor de células T que comprende una región variable de cadena H de anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 103 y una región constante que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 60 o 62; y una cadena L de anticuerpo común que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 299;

15 (h4) un anticuerpo biespecífico que tiene una cadena H de anticuerpo que tiene actividad de unión a glipicano-3 que comprende una región variable de cadena H de anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 215 y una región constante que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO:
20 61; una cadena H de anticuerpo que tiene actividad de unión al complejo receptor de células T que comprende una región variable de cadena H de anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 103 y una región constante que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 60 o 62; y una cadena L de anticuerpo
25 común que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 301;

(h5) un anticuerpo biespecífico que tiene una cadena H de anticuerpo que tiene actividad de unión a glipicano-3 que comprende una región variable de cadena H de anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 215 y una región constante que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 61; una cadena H de anticuerpo que tiene actividad de unión al complejo receptor de células T que comprende una región variable de cadena H de anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 103 y una región constante que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 60 o 62; y una cadena L de anticuerpo común que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 302;

(h6) un anticuerpo biespecífico que tiene una cadena H de anticuerpo que tiene actividad de unión a glipicano-3 que comprende una región variable de cadena H de anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 215 y una región constante que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 61; una cadena H de anticuerpo que tiene actividad de unión al complejo receptor de células T que comprende una región variable de cadena H de anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 103 y una región constante que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 60 o 62; y una cadena L de anticuerpo común que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 304;

(h7) un anticuerpo biespecífico que tiene una cadena H de anticuerpo que tiene actividad de unión a glipicano-3 que comprende una región variable de cadena H de anticuerpo que tiene

la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 215 y una región constante que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 61; una cadena H de anticuerpo que tiene actividad de unión al complejo receptor de células T que comprende una región variable

5 de cadena H de anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 103 y una región constante que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 60 o 62; y una cadena L de anticuerpo común que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 306;

(h8) un anticuerpo biespecífico que tiene una cadena

10 H de anticuerpo que tiene actividad de unión a glipicano-3 que comprende una región variable de cadena H de anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 215 y una región constante que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 61; una cadena H de anticuerpo que tiene actividad de unión al

15 complejo receptor de células T que comprende una región variable de cadena H de anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 103 y una región constante que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 60 o 62; y una cadena L de anticuerpo común que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 307;

20 (h9) un anticuerpo biespecífico que tiene una cadena H de anticuerpo que tiene actividad de unión a glipicano-3 que comprende una región variable de cadena H de anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 215 y una región constante que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO:

25 61; una cadena H de anticuerpo que tiene actividad de unión al

complejo receptor de células T que comprende una región variable de cadena H de anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 103 y una región constante que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 60 o 62; y una cadena L de anticuerpo común que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 309;

(h10) un anticuerpo biespecífico que tiene una cadena H de anticuerpo que tiene actividad de unión a glipicano-3 que comprende una región variable de cadena H de anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 215 y una región constante que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 61; una cadena H de anticuerpo que tiene actividad de unión al complejo receptor de células T que comprende una región variable de cadena H de anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 122 y una región constante que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 60 o 62; y una cadena L de anticuerpo común que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 53;

(h11) un anticuerpo biespecífico que tiene una cadena H de anticuerpo que tiene actividad de unión a glipicano-3 que comprende una región variable de cadena H de anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 215 y una región constante que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 61; una cadena H de anticuerpo que tiene actividad de unión al complejo receptor de células T que comprende una región variable de cadena H de anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 129 y una región constante que tiene la secuencia

de aminoácido de la SEQ ID NO: 60 o 62; y una cadena L de anticuerpo común que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 53;

(h12) un anticuerpo biespecífico que tiene una cadena H de anticuerpo que tiene actividad de unión a glipicano-3 que
5 comprende una región variable de cadena H de anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 215 y una región constante que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 61; una cadena H de anticuerpo que tiene actividad de unión al complejo receptor de células T que comprende una región variable
10 de cadena H de anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 132 y una región constante que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 60 o 62; y una cadena L de anticuerpo común que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 53;

(h13) un anticuerpo biespecífico que tiene una cadena
15 H de anticuerpo que tiene actividad de unión a glipicano-3 que comprende una región variable de cadena H de anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 197 y una región constante que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 61; una cadena H de anticuerpo que tiene actividad de unión al
20 complejo receptor de células T que comprende una región variable de cadena H de anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 128 y una región constante que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 60 o 62; y una cadena L de anticuerpo común que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 299;

25 (h14) un anticuerpo biespecífico que tiene una cadena

H de anticuerpo que tiene actividad de unión a glipicano-3 que comprende una región variable de cadena H de anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 197 y una región constante que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 61; una cadena H de anticuerpo que tiene actividad de unión al complejo receptor de células T que comprende una región variable de cadena H de anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 128 y una región constante que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 60 o 62; y una cadena L de anticuerpo común que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 310;

(h15) un anticuerpo biespecífico que tiene una cadena H de anticuerpo que tiene actividad de unión a glipicano-3 que comprende una región variable de cadena H de anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 197 y una región constante que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 61; una cadena H de anticuerpo que tiene actividad de unión al complejo receptor de células T que comprende una región variable de cadena H de anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 128 y una región constante que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 60 o 62; y una cadena L de anticuerpo común que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 319;

(h16) un anticuerpo biespecífico que tiene una cadena H de anticuerpo que tiene actividad de unión a glipicano-3 que comprende una región variable de cadena H de anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 197 y una región

constante que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 61; una cadena H de anticuerpo que tiene actividad de unión al complejo receptor de células T que comprende una región variable de cadena H de anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 128 y una región constante que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 60 o 62; y una cadena L de anticuerpo común que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 53;

(h17) un anticuerpo biespecífico que tiene una cadena H de anticuerpo que tiene actividad de unión a glipicano-3 que comprende una región variable de cadena H de anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 211 y una región constante que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 61; una cadena H de anticuerpo que tiene actividad de unión al complejo receptor de células T que comprende una región variable de cadena H de anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 142 y una región constante que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 60 o 62; y una cadena L de anticuerpo común que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 299;

(h18) un anticuerpo biespecífico que tiene una cadena H de anticuerpo que tiene actividad de unión a glipicano-3 que comprende una región variable de cadena H de anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 211 y una región constante que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 61; una cadena H de anticuerpo que tiene actividad de unión al complejo receptor de células T que comprende una región variable

de cadena H de anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 142 y una región constante que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 60 o 62; y una cadena L de anticuerpo común que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 223;

5 (h19) un anticuerpo biespecífico que tiene una cadena H de anticuerpo que tiene actividad de unión a glipicano-3 que comprende una región variable de cadena H de anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 211 y una región constante que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 61; una cadena H de anticuerpo que tiene actividad de unión al
10 complejo receptor de células T que comprende una región variable de cadena H de anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 144 y una región constante que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 60 o 62; y una cadena L de anticuerpo
15 común que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 223;

 (h20) un anticuerpo biespecífico que tiene una cadena H de anticuerpo que tiene actividad de unión a glipicano-3 que comprende una región variable de cadena H de anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 206 y una región
20 constante que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 61; una cadena H de anticuerpo que tiene actividad de unión al complejo receptor de células T que comprende una región variable de cadena H de anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 144 y una región constante que tiene la secuencia
25 de aminoácido de la SEQ ID NO: 60 o 62; y una cadena L de anticuerpo

común que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 223;

(h21) un anticuerpo biespecífico que tiene una cadena H de anticuerpo que tiene actividad de unión a glipicano-3 que comprende una región variable de cadena H de anticuerpo que tiene
5 la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 206 y una región constante que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 61; una cadena H de anticuerpo que tiene actividad de unión al complejo receptor de células T que comprende una región variable de cadena H de anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácido
10 de la SEQ ID NO: 142 y una región constante que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 60 o 62; y una cadena L de anticuerpo común que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 223;

(h22) un anticuerpo biespecífico que tiene una cadena H de anticuerpo que tiene actividad de unión a glipicano-3 que
15 comprende una región variable de cadena H de anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 206 y una región constante que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 61; una cadena H de anticuerpo que tiene actividad de unión al complejo receptor de células T que comprende una región variable
20 de cadena H de anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 164 y una región constante que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 60 o 62; y una cadena L de anticuerpo común que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 223;

(h23) un anticuerpo biespecífico que tiene una cadena
25 H de anticuerpo que tiene actividad de unión a glipicano-3 que

comprende una región variable de cadena H de anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 206 y una región constante que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 61; una cadena H de anticuerpo que tiene actividad de unión al complejo receptor de células T que comprende una región variable de cadena H de anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 168 y una región constante que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 60 o 62; y una cadena L de anticuerpo común que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 223;

5 (h24) un anticuerpo biespecífico que tiene una cadena H de anticuerpo que tiene actividad de unión a glipicano-3 que comprende una región variable de cadena H de anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 211 y una región constante que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 61; una cadena H de anticuerpo que tiene actividad de unión al complejo receptor de células T que comprende una región variable de cadena H de anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 164 y una región constante que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 60 o 62; y una cadena L de anticuerpo común que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 223;

10 y

 (h25) un anticuerpo biespecífico que tiene una cadena H de anticuerpo que tiene actividad de unión a glipicano-3 que comprende una región variable de cadena H de anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 211 y una región

15 la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 211 y una región

20 la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 211 y una región

25 la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 211 y una región

constante que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 61; una cadena H de anticuerpo que tiene actividad de unión al complejo receptor de células T que comprende una región variable de cadena H de anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 168 y una región constante que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 60 o 62; y una cadena L de anticuerpo común que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 223.

[23] Un ácido nucleico que codifica la molécula multiespecífica que se une al antígeno de cualquiera de [1] hasta [20] o el anticuerpo biespecífico de [21] o [22].

[24] Un vector en el cual se introduce el ácido nucleico de [23].

[25] Una célula que comprende el ácido nucleico de [23] o el vector de [24].

[26] Un método para producir la molécula multiespecífica que se une al antígeno de cualquiera de [1] hasta [20] o el anticuerpo biespecífico de [21] o [22] cultivando la célula de [25].

[27] Una molécula multiespecífica que se une al antígeno o un anticuerpo biespecífico producido por el método de [26].

[28] Una composición farmacéutica que comprende la molécula multiespecífica que se une al antígeno de cualquiera de [1] hasta [20] o el anticuerpo biespecífico de [21] o [22], y un portador farmacéuticamente aceptable.

[29] La composición farmacéutica de [28], la cual induce

citotoxicidad.

[30] La composición farmacéutica de [29], en donde la citotoxicidad es citotoxicidad dependiente de células T.

[31] La composición farmacéutica de [28], la cual es
5 para administración a un paciente en necesidad de la molécula multiespecífica que se une al antígeno de cualquiera de [1] hasta [20] o el anticuerpo biespecífico de [21] o [22].

Además, la presente invención se refiere a un kit que será usado en un método de la presente invención, en donde el kit
10 comprende una molécula multiespecífica que se une al antígeno de la presente invención, o una molécula multiespecífica que se une al antígeno producida por el método de producción de la presente invención. La presente invención también se refiere al uso de una molécula multiespecífica que se une al antígeno de la presente
15 invención, o el uso de una molécula multiespecífica que se une al antígeno producida por el método de producción de la presente invención en la manufactura de una composición farmacéutica para activar la actividad citotóxica. La presente invención se refiere adicionalmente a una molécula multiespecífica que se une al
20 antígeno de la presente invención, o una molécula multiespecífica que se une al antígeno producida por el método de producción de la presente invención que será usado en un método de la presente invención. En la presente, las moléculas multiespecíficas que se unen al antígeno incluyen anticuerpos biespecíficos of la presente
25 invención.

Además, la presente invención se refiere a una molécula multiespecífica que se une al antígeno que comprende los siguientes dominios:

(1) un dominio que comprende una región variable de anticuerpo que tiene actividad de unión a glipicano-3;

(2) un dominio que comprende una región variable de anticuerpo que tiene actividad de unión al complejo receptor de células T;

en donde las regiones variables de cadena L contenidas en las regiones variables de (1) y (2) tienen una secuencia de aminoácido comúnmente compartida. La presente invención también se refiere al dominio de (1), el cual es más específicamente un dominio que comprende regiones variables de cadena ligera y/o cadena pesada de anticuerpo que tienen actividad de unión a glipicano-3, y la cual está comprendida en la molécula multiespecífica que se une al antígeno. La presente invención se refiere adicionalmente al dominio de (2), el cual es más específicamente un dominio que comprende una región variable de anticuerpo que tiene actividad de unión al complejo receptor de células T, y la cual está comprendida en la molécula multiespecífica que se une al antígeno. Detalles de los dominios de (1) y (2) pueden incluir aquellos descritos en [1] hasta [22] mencionados anteriormente. La molécula multiespecífica que se une al antígeno puede ser un anticuerpo biespecífico. Además, la molécula multiespecífica que se une al antígeno puede comprender

además, un dominio que comprende una región Fc, y la región Fc puede tener una actividad de unión al receptor Fc γ reducida. Los detalles del dominio que comprende una región Fc pueden incluir aquellos descritos en [1] hasta [22] mencionados anteriormente.

5 La presente invención se refiere a un ácido nucleico que codifica la molécula multiespecífica que se une al antígeno o los dominios, un vector introducido con el ácido nucleico, una célula que comprende el ácido nucleico o el vector, un método para producir la molécula multiespecífica que se une al antígeno cultivando las
10 células, y una molécula multiespecífica que se une al antígeno o dominios que comprenden una región variable de anticuerpo que tiene actividad de unión a glipicano-3 o actividad de unión del complejo del receptor de células T producidos por el método. Además, la presente invención se refiere a una composición
15 farmacéutica que comprende la molécula multiespecífica que se une al antígeno y un portador farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede inducir lesión celular, la lesión celular puede ser citotoxicidad celular dependiente de células T, y la composición puede ser para administración a un paciente
20 en necesidad de la molécula multiespecífica que se une al antígeno.

La presente invención también proporciona una molécula multiespecífica que se une al antígeno que se une a epítomos traspalantes y/o que compiten con epítomos en cada uno del complejo receptor de células T y glipicano-3 unido por la molécula
25 multiespecífica que se une al antígeno de cualquiera de (e1) hasta

(e25) de [14] mencionado anteriormente, y una molécula multiespecífica que se une al antígeno que se une a epítomos traslapantes y que compiten con epítomos en cada uno del complejo receptor de células T y glipicano 3 unido por la molécula multiespecífica que se une al antígeno de cualquiera de (f1) hasta (f25) de [15].

Con respecto a (g1) y (g2) de [20] mencionado anteriormente, de las dos regiones Fc, la región Fc anterior puede ser incluida en la cadena H de anticuerpo que tiene actividad de unión a glipicano-3 y la última región Fc puede ser incluida en la cadena H de anticuerpo que tiene actividad de unión al complejo receptor de células T; o la región Fc anterior puede ser incluida en la cadena H de anticuerpo que tiene actividad de unión al complejo receptor de células T y la región Fc última puede ser incluida en la cadena H del anticuerpo que tiene actividad de unión a glipicano-3.

Efectos de la Invención

La presente invención proporciona moléculas multiespecíficas que se unen al antígeno novedosas con formas moleculares que pueden ser producidas con alta eficiencia, las cuales mantienen la fuerte actividad antitumoral poseída por BiTE y la excelente propiedad de seguridad sin causar inducción independiente del antígeno de cáncer de una tormenta de citocina y tal, y tienen semividas largas en la sangre. Las composiciones farmacéuticas que activan la actividad citotóxica, la cual

comprende una molécula multiespecífica que se une al antígeno de la presente invención como ingrediente activo, tejidos de cáncer objetivo que contienen células de cáncer que expresan glipicano-3 para provocar la lesión celular, y pueden tratar o prevenir varios
5 cánceres. La invención permite el tratamiento deseado el cual tiene no solamente un alto nivel de seguridad, sino también carga física reducida, y es altamente conveniente para pacientes.

Breve Descripción de las Figuras

La Figura 1a: muestra diagrama esquemático de ERY22 y
10 la Figura 1b: muestra diagrama esquemático de ERY27.

La Figura 2 es una gráfica que muestra las actividades citotóxicas de GPC3_ERY22_rCE115 y GPC3_ERY27_hCE115 cuando NCI-H446 se usa como la célula objetivo. El rombo lleno (◆) y el triángulo lleno (▲) indican la actividad citotóxica de
15 GPC3_ERY22_rCE115 y GPC3_ERY27_hCE115, respectivamente.

La Figura 3 es una gráfica que muestra las actividades citotóxicas de GPC3_ERY22_rCE115 y GPC3_ERY27_hCE115 cuando PC-10 se usa como la célula objetivo. El rombo lleno (◆) y el triángulo lleno (▲) indican la actividad citotóxica de
20 GPC3_ERY22_rCE115 y GPC3_ERY27_hCE115, respectivamente.

Las Figuras 4a y 4b son una gráfica que muestra las actividades citotóxicas de los anticuerpos optimizados cuando NCI-H446 se usa como la célula objetivo.

Las Figuras 5a y 5b son una gráfica que muestra las
25 actividades citotóxicas de los anticuerpos optimizados cuando

NCI-H446 se usa como la célula objetivo.

Las Figuras 6a y 6b son una gráfica que muestra las actividades citotóxicas de los anticuerpos optimizados cuando NCI-H446 se usa como la célula objetivo.

5 Las Figuras 7a y 7b son una gráfica que muestra las actividades citotóxicas de los anticuerpos optimizados cuando NCI-H446 se usa como la célula objetivo.

Las Figuras 8a y 8b son una gráfica que muestra las actividades citotóxicas de los anticuerpos optimizados cuando
10 NCI-H446 se usa como la célula objetivo.

Las Figuras 9a y 9b son una gráfica que muestra las actividades citotóxicas de los anticuerpos optimizados cuando NCI-H446 se usa como la célula objetivo.

Las Figuras 10a y 10b muestran los efectos antitumorales
15 *in vivo* de los anticuerpos optimizados cuando PC-10 se usa como la célula objetivo.

Las Figuras 11a y 11b muestran los efectos antitumorales *in vivo* de los anticuerpos optimizados cuando NCI-H446 se usa como la célula objetivo.

20 La Figura 12 muestra la relación entre los residuos de aminoácido que constituyen las regiones Fc de IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4, y el sistema de numeración Estadounidense de Kabat (en la presente, también referido como el ÍNDICE ESTADOUNIDENSE).

La Figura 13a muestra las secuencias de región variable
25 de cadena pesada y su numeración de conformidad con Kabat *et al.*

La Figura 13b muestra las secuencias de región variable de cadena pesada y su numeración de conformidad con Kabat *et al.*

La Figura 14 muestra las secuencias de región variable de cadena ligera y su numeración de conformidad con Kabat *et al.*

5 **Descripción Detallada de la Invención**

Se proporcionan las definiciones siguientes para ayudar al entendimiento de la presente invención ilustrada en la presente.

Anticuerpo

10 En el presente documento, "anticuerpo" se refiere a una inmunoglobulina natural o una inmunoglobulina producida a través de síntesis parcial o total. Los anticuerpos pueden aislarse de fuentes naturales, como por ejemplo plasma y suero de aparición natural o sobrenadantes de cultivos de hibridomas que producen
15 anticuerpos. De manera alternativa, es posible sintetizar total o parcialmente anticuerpos usando técnicas como por ejemplo recombinación genética. Los anticuerpos preferidos incluyen, por ejemplo, anticuerpos de un isotipo o subclase de inmunoglobulina que pertenece a la misma. Las inmunoglobulinas humanas conocidas
20 incluyen anticuerpos de las nueve clases siguientes (isotipos): IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE e IgM. De estos isotipos, los anticuerpos de la presente invención incluyen IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

Los métodos de producción de un anticuerpo con actividad
25 de unión deseada son conocidos por los expertos en la técnica.

A continuación, se presenta un ejemplo que describe un método de producción de un anticuerpo (anticuerpo anti-GPC3) que se une a GPC3, el cual pertenece a la familia de receptores anclados en GPI (Int J Cancer. (2003) 103(4), 455-65). Los anticuerpos que
5 se unen a un antígeno aparte de GPC3 también pueden producirse de conformidad con el ejemplo descrito más adelante.

Los anticuerpos anti-GPC3 pueden obtenerse como anticuerpos policlonales o monoclonales usando métodos conocidos. Los anticuerpos anti-GPC3 producidos preferentemente
10 son anticuerpos monoclonales derivados de mamíferos. Tales anticuerpos monoclonales derivados de mamíferos incluyen anticuerpos producidos por hibridomas o células hospederas transformadas con un vector de expresión que transporta un gen de anticuerpo mediante técnicas de ingeniería genética.

15 Los hibridomas que producen anticuerpos monoclonales pueden producirse usando técnicas conocidas, por ejemplo, según se describe a continuación. Específicamente, los mamíferos se inmunizan a través de métodos de inmunización convencionales usando una proteína GPC3 como antígeno de sensibilización. Las
20 células inmunes obtenidas se fusionan con células precursoras conocidas mediante métodos de fusión celular convencional. Seguidamente, los hibridomas que producen un anticuerpo anti-GPC3 pueden seleccionarse mediante selección de células productoras de anticuerpos monoclonales usando métodos de
25 selección convencional.

Específicamente, los anticuerpos monoclonales son preparados según se menciona a continuación. En primer lugar, el gen GPC3 cuya secuencia de nucleótidos se describe en el número de acceso de RefSeq NM_001164617,1 (SEQ ID NO: 1) puede ser
5 expresado para producir una proteína GPC3 mostrada en Número de acceso de RefSeq NP_001158089,1 (SEQ ID NO: 2), a usar como antígeno de sensibilización para la preparación de anticuerpos. Es decir, se introduce una secuencia de genes que codifica GPC3 en un vector de expresión conocido y se transforman células
10 hospederas apropiadas con este vector. Se purifica la proteína GPC3 humana deseada a partir de células hospederas o sus sobrenadantes de cultivo a través de métodos conocidos. Por ejemplo, para preparar GPC3 soluble a partir de sobrenadantes del cultivo, los aminoácidos en las posiciones 564 a 580 que forman
15 la región hidrófoba correspondiente a la secuencia de anclaje GPI usada para anclar GPC3 en la membrana celular son eliminados de la secuencia de polipéptidos GPC3 de SEQ ID NO: 2 y seguidamente se expresa la proteína obtenida en lugar de la proteína GPC3 de SEQ ID NO: 2. De manera alternativa, es posible usar una proteína
20 GPC3 natural purificada como antígeno de sensibilización.

La proteína GPC3 purificada puede usarse como antígeno de sensibilización para la inmunización de mamíferos. Se puede usar un péptido GPC3 parcial como antígeno de sensibilización. En este caso, los péptidos parciales también se pueden obtener
25 por síntesis química a partir de la secuencia de aminoácido GPC3

humana. Además, se puede obtener también incorporando una porción del gen GPC3 en un vector de expresión y expresarlo. Sin embargo, también se puede obtener degradando la proteína GPC3 usando proteasa, pero la región y tamaño del péptido GPC3 usado como el

5 péptido parcial no están particularmente limitadas a una modalidad especial. Como la región preferida, cualquier secuencia a partir de la secuencia de aminoácido que corresponde a los aminoácidos en las posiciones 524 a 536, o más preferiblemente cualquier secuencia a partir de la secuencia de aminoácido que corresponde

10 a los aminoácidos en las posiciones 537 a 563 en la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO:2, puede ser seleccionada. Preferiblemente, cualquier secuencia puede ser seleccionada a partir de la secuencia de aminoácido de la región que no contiene la secuencia de aminoácido que corresponde a los aminoácidos en

15 las posiciones 550 a 663 en la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO:2. Preferiblemente, cualquier secuencia puede ser seleccionada a partir de la secuencia de aminoácido que corresponde a las posiciones 544 a 553, y más preferiblemente, cualquier secuencia puede ser seleccionada a partir de la

20 secuencia de aminoácido que corresponde a las posiciones 546 a 551 en la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO:2. El número de aminoácidos que constituye un péptido que será usado como el antígeno de sensibilización es al menos cinco o más, o preferiblemente por ejemplo, seis o más, o siete o más. Más

25 específicamente, los péptidos que consisten de 8 a 50 residuos

o preferiblemente 10 a 30 residuos pueden ser usados como el antígeno de sensibilización.

Para antígeno de sensibilización, de manera alternativa se puede usar una proteína de fusión preparada mediante la fusión de un polipéptido parcial o péptido deseado de la proteína GPC3 con un polipéptido diferente. Por ejemplo, se usan preferentemente fragmentos de anticuerpo Fc y etiquetas peptídicas para producir proteínas de fusión a usar como antígenos de sensibilización. Los vectores para la expresión de tales proteínas de fusión pueden construirse mediante la fusión en genes de armazón que codifican dos o más fragmentos de polipéptido deseados e inserción del gen de fusión en un vector de expresión según se describe anteriormente. Los métodos de producción de proteínas de fusión se describen en Molecular Cloning 2^a. ed. (Sambrook, J *et al.*, Molecular Cloning 2^a.d ed., 9,47-9,58 (1989) Cold Spring Harbor Lab. Press). Los métodos de preparación de GPC3 a usar como antígeno de sensibilización y métodos de inmunización usando GPC3 se describen específicamente en los documentos WO 2003/000883, WO 2004/022754 y WO 2006/006693.

No existe una limitación particular en cuanto a los mamíferos a inmunizar con el antígeno de sensibilización. Sin embargo, es preferible seleccionar los mamíferos tomando en consideración su compatibilidad con las células precursoras a usar para la fusión celular. En general, se usan preferentemente roedores como por ejemplo ratones, ratas y hámsteres, conejos y

monos.

Los animales anteriores se inmunizan con un antígeno de sensibilización a través de métodos conocidos. Los métodos de inmunización realizados de manera general incluyen, por ejemplo, inyección intraperitoneal o subcutánea de un antígeno de sensibilización en mamíferos. Específicamente, un antígeno de sensibilización se diluye de manera apropiada con PBS (Salina regulada por fosfato), solución fisiológica u otros semejantes. De así deseárselo, se mezcla un adyuvante convencional con el antígeno, como por ejemplo adyuvante completo de Freund, y se emulsiona la mezcla. Seguidamente, el antígeno de sensibilización es administrado a un mamífero varias veces a intervalos de 4- a 21-días. Pueden usarse soportes apropiados en la inmunización con el antígeno de sensibilización. En particular, cuando un péptido parcial de bajo peso molecular se usa como antígeno de sensibilización, a veces es deseable acoplar el péptido de antígeno de sensibilización con una proteína portadora, como por ejemplo albúmina o hemocianina de lapa californiana para inmunización.

De manera alternativa, los hibridomas que producen un anticuerpo deseado pueden ser preparados usando la inmunización con ADN según se menciona a continuación. La inmunización con ADN es un método de inmunización que confiere inmunoestimulación mediante la expresión de un antígeno de sensibilización en un animal inmunizado como resultado de administrar un vector de ADN

construido para permitir la expresión de un gen que codifica proteínas de antígeno en el animal. En comparación con métodos convencionales de inmunización en el cual un antígeno de proteína es administrado a los animales a inmunizar, se espera que la
5 inmunización con ADN sea superior en los aspectos siguientes:

- la immunoestimulación puede proporcionarse mientras se retiene la estructura de una proteína de membrana como por ejemplo GPC3; y
- no se necesita purificar el antígeno para la
10 inmunización.

Con la finalidad de preparar un anticuerpo monoclonal de la presente invención usando la inmunización con ADN, primero, se administra un ADN que expresa una proteína GPC3 a un animal a inmunizar. El ADN que codifica GPC3 puede sintetizarse mediante
15 métodos conocidos, como por ejemplo PCR. El ADN obtenido se introduce en un vector de expresión apropiado y seguidamente se administra a un animal a inmunizar. Los vectores de expresión usados preferentemente incluyen, por ejemplo, vectores de expresión disponibles comercialmente como por ejemplo pcADN3.1.
20 Los vectores pueden administrarse a un organismo usando métodos convencionales. Por ejemplo, la inmunización con ADN se realiza usando una pistola génica para introducir partículas de oro cubiertas de vectores de expresión en células del cuerpo de un animal a inmunizar. Los anticuerpos que reconocieron GPC3 también
25 pueden producirse con ayuda de los métodos descritos en el

documento WO 2003/104453.

Después de inmunizar a un mamífero según se describe anteriormente, se confirma un incremento en el suero de titulación de un anticuerpo que se une a GPC3. Seguidamente, se recopilan
5 las células inmunes del mamífero y seguidamente se someten a fusión celular. En particular, se usan preferentemente los esplenocitos como células inmunes.

Se usa una célula de mieloma de mamífero como una célula a fusionar con el inmunocito citado anteriormente. Las células
10 de mieloma preferentemente comprenden un marcador para selección adecuado para la selección. Un marcador para selección confiere características a las células para su supervivencia (o muerte) en condiciones de cultivo específicas. Como marcadores de selección se conocen la deficiencia de hipoxantina-guanina
15 fosforribosiltransferasa (en lo sucesivo abreviado como deficiencia HGPRT) y deficiencia de timidina cinasa (en lo sucesivo abreviado como deficiencia TK). Las células con deficiencia HGPRT o TK tienen sensibilidad a hipoxantina-aminopterin-timidina (en lo sucesivo abreviados
20 sensibilidad HAT). Las células sensibles a HAT no pueden sintetizar ADN en un medio de selección HAT y, por ende, son eliminadas. Sin embargo, cuando las células se fusionan con células normales, puede continuar la síntesis de ADN usando la ruta de rescate de las células normales y en consecuencia pueden
25 crecer incluso en el medio de selección HAT.

Se pueden seleccionar células con deficiencia HGPRT y TK en un medio que contiene 6-tioguanina, 8-azaguanina (en lo sucesivo abreviados 8AG) o 5'-bromodeoxiuridina, respectivamente. Las células normales se eliminan porque
 5 incorporan estos análogos de pirimidina en su ADN. Entretanto, las células que tienen deficiencias de estas enzimas pueden sobrevivir en el medio de selección, puesto que no pueden incorporar estos análogos de pirimidina. Adicionalmente, un marcador para selección denominado resistencia a G418
 10 proporcionado por el gen resistente a neomicina confiere resistencia a los antibióticos de 2-desoxiestreptamina (análogos de gentamicina). Se conocen diversos tipos de células de mieloma adecuados para la fusión celular.

Por ejemplo, se pueden usar preferentemente células de
 15 mieloma incluyendo las siguientes células:

P3(P3x63Ag8,653) (J. Immunol. (1979) 123 (4), 1548-1550);

P3x63Ag8U.1 (Current Topics in Microbiology and Immunology (1978)81, 1-7);

20 NS-1 (C. Eur. J. Immunol. (1976)6 (7), 511-519);

MPC-11 (Cell (1976) 8 (3), 405-415);

SP2/0 (Nature (1978) 276 (5685), 269-270);

FO (J. Immunol. Methods (1980) 35 (1-2), 1-21);

S194/5.XX0.BU,1 (J. Exp. Med. (1978) 148 (1), 313-323);

25 R210 (Nature (1979) 277 (5692), 131-133), etc.

Las fusiones celulares entre los inmunocitos y células de mieloma se realizan esencialmente mediante métodos conocidos, por ejemplo, un método de Kohler and Milstein *et al.*, (Métodos Enzymol. (1981) 73:3-46).

5 Más específicamente, la fusión celular puede realizarse, por ejemplo, en un medio de cultivo convencional en presencia de un agente promotor de fusiones celulares. Los agentes promotores de fusiones celulares incluyen, por ejemplo, polietilenglicol (PEG) y virus Sendai HVJ). De ser necesario, se
10 agrega también una sustancia auxiliar como por ejemplo sulfóxido de dimetilo para mejorar la eficiencia de la fusión.

La relación de inmunocitos a células de mieloma puede determinarse a discreción, preferiblemente, por ejemplo, una célula de mieloma por cada uno a diez inmunocitos. Los medios de
15 cultivo a usar para fusiones celulares incluyen, por ejemplo, medios adecuados para el crecimiento de líneas celulares de mieloma, como por ejemplo medio RPMI1640 y medio MEM y otros medios de cultivo convencionales usados para este tipo de cultivo celular. Adicionalmente, se agregan preferentemente complementos
20 de suero como por ejemplo suero de bovino fetal (FCS, por sus siglas en inglés).

Para la fusión celular, se mezclan muy bien cantidades predeterminadas de las células inmunes anteriores y de células de mieloma en el medio de cultivo mencionado anteriormente.
25 Seguidamente, se agrega una solución PEG (por ejemplo, el peso

molecular promedio es de aproximadamente 1,000 hasta 6,000) precalentada hasta aproximadamente 37°C a una concentración de generalmente 30% hasta 60% (p/v). Lo anterior se mezcla cuidadosamente para producir las células de fusión deseadas (hibridomas). Seguidamente, se agrega gradualmente a las células un medio de cultivo apropiado mencionado anteriormente y lo anterior se centrifuga repetidamente para retirar el sobrenadante. Por ende, se pueden retirar los agentes de fusión celular y otros semejantes que no son favorables para el crecimiento de hibridomas.

Los hibridomas así obtenidos pueden seleccionarse mediante un cultivo usando un medio selectivo convencional, por ejemplo, medio HAT (un medio de cultivo que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina). Se pueden eliminar células aparte de los hibridomas deseados (células no fusionadas) mediante el cultivo continuado en el medio HAT citado anteriormente durante un periodo suficiente. Normalmente, el período es de varios días hasta varias semanas. Seguidamente, los hibridomas que producen el anticuerpo deseado son seleccionados y clonados uno por uno mediante métodos de dilución de limitación convencional.

Los hibridomas así obtenidos pueden seleccionarse usando un medio de selección con base en el marcador para selección poseído por el mieloma usado para la fusión celular. Por ejemplo, células con deficiencia de HGPRT o TK pueden seleccionarse mediante cultivos usando el medio HAT (un medio de cultivo que

contiene hipoxantina, aminopterina y timidina). Específicamente, cuando se usan células sensibles a HAT para la fusión celular, las células fusionadas exitosamente con células normales pueden proliferar selectivamente en el medio HAT. Las células aparte de
5 los hibridomas deseados (células no fusionadas) pueden ser eliminadas mediante el cultivo continuado en el medio HAT citado anteriormente durante un período suficiente. Específicamente, se pueden seleccionar los hibridomas deseados mediante el cultivo durante generalmente varios días a varias semanas. Seguidamente,
10 los hibridomas que producen el anticuerpo deseado son seleccionados y clonados uno por uno mediante métodos convencionales de dilución de limitación.

Los anticuerpos deseados pueden seleccionarse preferentemente y clonarse uno por uno mediante métodos
15 seleccionados con base en la reacción conocida antígeno/anticuerpo. Por ejemplo, un anticuerpo monoclonal que se une a GPC3 puede unirse a GPC3 expresado en la superficie celular. Tal anticuerpo monoclonal puede seleccionarse mediante clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS, por
20 sus siglas en inglés). La clasificación FACS es un sistema que evalúa el acoplamiento de un anticuerpo a la superficie de la célula mediante el análisis de las células que se ponen en contacto con un anticuerpo fluorescente usando rayo láser y midiendo la fluorescencia emitida por las células individuales.

25 Para realizar la selección en busca de hibridomas que

producen un anticuerpo monoclonal de la presente invención a través de FACS, primero se preparan células que expresan GPC3. Las células usadas preferentemente para la selección son células de mamíferos en las cuales se expresa fuertemente GPC3. A modo
5 de control, es posible detectar selectivamente la actividad de un anticuerpo a unirse a la superficie celular GPC3 usando células de mamíferos no transformadas como células hospederas. Específicamente, se pueden aislar los hibridomas que producen un anticuerpo monoclonal anti-GPC3 mediante la selección de
10 hibridomas que producen un anticuerpo que se une a células forzadas a expresar GPC3 pero no a células hospederas.

De manera alternativa, la actividad de un anticuerpo a unirse a células inmovilizadas que expresan GPC3 se puede evaluar con base en el principio de ELISA. Por ejemplo, las células que
15 expresan GPC3 son inmovilizadas en los pocillos de una placa ELISA. Los sobrenadantes de cultivo de hibridomas se ponen en contacto con las células inmovilizadas en los pocillos y se detectan los anticuerpos que se unen a las células inmovilizadas. Cuando se derivan anticuerpos monoclonales de ratón, se pueden detectar los
20 anticuerpos unidos a las células usando un anticuerpo de inmunoglobulina anti-ratón. Los hibridomas que producen un anticuerpo deseado que tiene la capacidad de unión a antígenos se seleccionan mediante la selección citado anteriormente y pueden clonarse mediante un método de dilución de limitación u otros
25 semejantes.

Los hibridomas que producen anticuerpos monoclonales así preparados pueden pasar por un medio de cultivo convencional y almacenados en nitrógeno líquido durante un período prolongado.

Los hibridomas anteriores se cultivan mediante un
5 método convencional y los anticuerpos monoclonal deseados pueden ser preparados a partir del sobrenadante de los cultivos. De manera alternativa, los hibridomas son administrados a mamíferos compatibles y cultivados en los mismos y los anticuerpos monoclonales se preparan a partir de ascitis. El primer método
10 es adecuado para preparar anticuerpos de alta pureza.

Los anticuerpos codificados por genes de anticuerpos clonados de células que producen anticuerpos, como por ejemplo los hibridomas citados anteriormente, pueden usarse preferentemente también. Se introduce un gen de anticuerpo clonado
15 en un vector apropiado y lo anterior se introduce en un hospedero para expresar el anticuerpo codificado por el gen. Los métodos para el aislamiento de gen de anticuerpos, la introducción de los genes en los vectores y transformar células hospederas ya han sido establecidos, por ejemplo, en Vandamme *et al.*, (Eur. J. Biochem.
20 (1990) 192(3), 767-775). Los métodos de producción de anticuerpos recombinantes también se conocen, según se describe a continuación.

Por ejemplo, un ADNc que codifica la región variable (región V) de un anticuerpo anti-GPC3 se prepara a partir de
25 células de hibridoma que expresan el anticuerpo anti-GPC3. Con

este objetivo, se extrae primero el ARN total de los hibridomas. Los métodos usados para extraer ARNm de las células incluyen, por ejemplo:

- método de ultracentrifugación de guanidina
5 (Biochemistry (1979) 18(24), 5294-5299) y

- método AGPC (Anal. Biochem. (1987) 162(1), 156-159)

Los ARNm pueden purificarse usando el kit de purificación ARNm (GE Healthcare Bioscience) u otros semejantes. De manera alternativa, los kits para extraer el ARNm total
10 directamente de las células, como por ejemplo el kit de purificación QuickPrep ARNm (GE Healthcare Bioscience), son también disponibles comercialmente. Se pueden preparar los ARNm a partir de hibridomas con tales kits. Los ADNc que codifican la región V de anticuerpo pueden sintetizarse a partir del ARNm
15 preparado usando una transcriptasa inversa. Los ADNc pueden sintetizarse usando el kit de síntesis de ADNc primera hebra con Transcriptasa Inversa AMV (Seikagaku Co.) u otros semejantes. Además, el kit de amplificación de ADNc SMART RACE (Clontech) y el método PCR 5'-RACE (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85(23),
20 8998-9002; Nucleic Acids Res. (1989) 17(8), 2919-2932) pueden usarse de manera apropiada para sintetizar y amplificar ADNc. En tal proceso de síntesis de ADNc, se pueden introducir sitios de enzima de restricción apropiados descritos más adelante en ambos extremos de un ADNc.

25 El fragmento ADNc de interés es purificado a partir del

producto PCR obtenido y seguidamente se liga a un vector ADN. Así, se construye un vector recombinante y se introduce en *E. coli* u otros semejantes. Después de seleccionar la colonia, se puede preparar el vector recombinante deseado a partir de *E. coli*
5 formadora de colonias. Seguidamente, se realiza una prueba para saber si el vector recombinante tiene la secuencia de nucleótidos ADNc de interés mediante un método conocido como por ejemplo el método de terminación de cadena de nucleótidos didesoxi.

El método 5'-RACE, el cual usa cebadores para amplificar
10 el gen de región variable, se usa de manera conveniente para el aislamiento del gen que codifica la región variable. Primero, se construye una biblioteca ADNc 5'-RACE mediante síntesis de ADNc usando ARN extraídos a partir de células de hibridoma como plantilla. Un kit disponible comercialmente como por ejemplo el
15 kit de amplificación SMART RACE ADNc es usado de manera apropiada para sintetizar la biblioteca 5'-RACE ADNc.

El gen de anticuerpo es amplificado mediante PCR usando la biblioteca 5' ADNc -RACE preparada como plantilla. Los cebadores para amplificar el gen de anticuerpo de ratón pueden
20 ser diseñados con base en secuencias génicas de anticuerpo conocidas. Las secuencias de nucleótidos de los cebadores varían dependiendo de la subcategoría de inmunoglobulina. En consecuencia, es preferible que la subcategoría sea determinada con antelación usando un kit disponible comercialmente como por
25 ejemplo el kit de isotipos de anticuerpo monoclonal de ratón Iso

Strip (Roche Diagnostics).

Específicamente, por ejemplo, se usan los cebadores que permiten la amplificación de genes que codifican cadenas pesadas $\gamma 1$, $\gamma 2a$, $\gamma 2b$ y $\gamma 3$ y cadenas ligeras κ y λ para aislar genes que
5 codifican IgG de ratón. En general, se usa un cebador que se aparea con un sitio de región constante cercano a la región variable como un cebador lateral 3' para amplificar un gen de región variable IgG. Entretanto, un cebador unido al kit de construcción de biblioteca ADNc 5' RACE sirve de cebador lateral 5'.

10 Los productos PCR así amplificados se usan para dar nueva forma a las inmunoglobulinas compuestas por una combinación de cadenas pesadas y ligeras. Se puede seleccionar un anticuerpo deseado usando la actividad de unión a GPC3 de una inmunoglobulina reformada como indicador. Por ejemplo, cuando el objetivo es
15 aislar un anticuerpo contra GPC3, se prefiere más que la unión el anticuerpo a GPC3 sea específica. Un anticuerpo que se une a GPC3 puede ser seleccionado, por ejemplo, mediante los pasos siguientes:

(1) poner en contacto una célula que expresa GPC3 con
20 un anticuerpo que comprende la región V codificada por un ADNc aislado de un hibridoma;

(2) detectar la unión del anticuerpo a las células que expresan GPC3; y

(3) seleccionar un anticuerpo que se une a las células
25 que expresan GPC3.

Los métodos para detectar la unión de un anticuerpo a unas células que expresan GPC3 son conocidos. Específicamente, la unión de un anticuerpo a unas células que expresan GPC3 puede detectarse mediante las técnicas descritas anteriormente como por ejemplo FACS. Las muestras inmovilizadas de células que expresan GPC3 se usan de manera apropiada para evaluar la actividad de unión de un anticuerpo.

Los métodos de selección de los anticuerpos preferidos que usan la actividad de unión como indicador también incluyen métodos de desplazamiento que usan vectores de fagos. Los métodos de selección que usa vectores de fagos son ventajosos cuando los genes de anticuerpo se aíslan de bibliotecas de subcategorías de cadena pesada y cadena ligera de una población de células que expresan anticuerpos policlonales. Los genes que codifican las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera pueden vincularse mediante una secuencia de enlazador apropiada para formar un Fv de cadena única (scFv, por sus siglas en inglés). Los fagos que presentan scFv en su superficie pueden producirse mediante la introducción de un gen que codifica scFv en un vector de fago. Los fagos se ponen en contacto con un antígeno de interés. Seguidamente, se puede aislar un ADN que codifica scFv que tiene la actividad de unión de interés mediante la recopilación de fagos unidos a antígeno. Este proceso puede repetirse según sea necesario para enriquecer scFv que tiene la actividad de unión de interés.

Después del aislamiento del ADNc que codifica la región V del anticuerpo anti-GPC3 de interés, se digiere el ADNc con enzimas de restricción que reconocen los sitios de restricción introducidos en ambos extremos del ADNc. Las enzimas de restricción preferidas reconocen y segmentan una secuencia de nucleótidos que aparece en la secuencia de nucleótidos del gen de anticuerpo a una baja frecuencia. Además, se introduce preferentemente un sitio de restricción correspondiente a una enzima que produce un extremo pegajoso en un vector para introducir un fragmento digerido de una sola copia en la orientación correcta. El ADNc que codifica la región V del anticuerpo anti-GPC3 es digerido según se describe anteriormente y lo anterior se introduce en un vector de expresión apropiado para construir un vector de expresión de anticuerpo. En este caso, de haber un gen que codifica la región constante del anticuerpo (región C) y un gen que codifica la región V citada anteriormente fundidos en marco, se obtiene un anticuerpo quimérico. En el presente documento, "anticuerpo quimérico" significa que el origen de la región constante es diferente del origen de la región variable. Por ende, además de anticuerpos heteroquiméricos humanos/de ratón, se incluyen anticuerpos aloquiméricos humano/humano en los anticuerpos quiméricos de la presente invención. Se puede construir un vector de expresión de anticuerpo quimérico mediante la introducción del gen de región V citado anteriormente en un vector de expresión que ya tiene la región constante.

Específicamente, por ejemplo, una secuencia de reconocimiento correspondiente a una enzima de restricción que extirpa el gen de la región V citado anteriormente puede colocarse de manera apropiada en el lado 5' de un vector de expresión que transporta
5 un ADN que codifica una región constante de anticuerpo deseado (región C). Un vector de expresión de anticuerpo quimérico se construye mediante la fusión dentro del marco de dos genes digeridos con la misma combinación de enzimas de restricción.

Para producir un anticuerpo monoclonal anti-GPC3, se
10 introducen genes de anticuerpo en un vector de expresión de modo que los genes son expresados con el control de una región reguladora de expresión. La región reguladora de expresión correspondiente a la expresión de anticuerpos incluye, por ejemplo, reforzadores y promotores. Además, se puede unir una
15 secuencia de señales apropiada al extremo amino de modo que el anticuerpo expresado sea segregado hacia la parte exterior de las células. En los Ejemplos descritos más adelante, se usa un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos MGWSCIILFLVATATGVHS (SEQ ID NO: 3) como una secuencia de señales. Entretanto, se pueden
20 unir otras secuencias de señales apropiadas. El polipéptido expresado es segmentado en el extremo carboxilo de la secuencia citada anteriormente y el polipéptido obtenido es segregado hacia la parte exterior de las células como polipéptido maduro. Seguidamente, se transforman las células hospederas apropiadas
25 con el vector de expresión y se obtienen células recombinantes

que expresan el ADN que codifica anticuerpo anti-GPC3.

Los ADN que codifican la cadena pesada (cadena H) y cadena ligera (cadena L) del anticuerpo se introducen por separado en vectores de expresión diferentes para expresar el gen de anticuerpo. Una molécula de anticuerpo que tiene las cadenas H y L pueden ser expresadas transfectando simultáneamente la misma célula hospedera con vectores en los cuales se introducen respectivamente genes de cadena H y cadena L. De manera alternativa, se pueden transformar células hospederas con un solo vector de expresión en el cual se introducen los ADN que codifican las cadenas H y L (véase documento WO 94/11523).

Existen varias combinaciones conocidas de célula hospedera/vector de expresión para la preparación de anticuerpos mediante la introducción de genes de anticuerpos aislados en huéspedes apropiados. Todos estos sistemas de expresión son aplicables al aislamiento del dominio de unión a antígenos y el dominio de unión a CD3s de la presente invención. Las células eucariotas apropiadas usadas como células hospederas incluyen células de animales, células de plantas y células de hongos. Específicamente, las células de animales incluyen, por ejemplo, las células siguientes.

(1) células de mamíferos: CHO, COS, mieloma, riñón de hámster bebé (BHK), HeLa, Vero u otros semejantes;

(2) células de anfibios: Oocitos Xenopus u otros semejantes; y

(3) células de insectos: sf9, sf21, Tn5 u otros semejantes.

Adicionalmente, como célula de planta, se conoce un sistema de expresión de genes de anticuerpo que usa células
5 derivadas del género *Nicotiana* como por ejemplo *Nicotiana tabacum*. Células cultivadas en callos pueden usarse de manera apropiada para transformar las células de plantas.

Además, las células siguientes pueden usarse como células de hongos:

10 levaduras: género *Saccharomyces* como por ejemplo *Saccharomyces cerevisiae*, género *Pichia* como por ejemplo *Pichia pastoris*; y

hongos filamentosos: género *Aspergillus* como por ejemplo *Aspergillus niger*.

15 Además, se conocen también aquellos sistemas de expresión de anticuerpos que utilizan células procariotas. Por ejemplo, cuando se usan células bacterianas, se pueden utilizar adecuadamente células *E. coli*, células *Bacillus subtilis* y otras semejantes en la presente invención. Los vectores de expresión
20 que portan los genes de anticuerpos son introducidos a estas células mediante transfección. Las células transfectadas se cultivan *in vitro* y el anticuerpo deseado puede prepararse a partir del cultivo de células transformadas.

Además de las células hospederas citadas anteriormente,
25 pueden usarse también los animales transgénicos para producir un

anticuerpo recombinante. Es decir, el anticuerpo puede obtenerse de un animal al cual se introduce el gen que codifica el anticuerpo de interés. Por ejemplo, se puede construir el gen de anticuerpo como un gen de fusión mediante la introducción dentro del marco
5 en un gen que codifica una proteína producida específicamente en la leche. Se puede usar β -caseína de cabra u otros semejantes, por ejemplo, como la proteína segregada en la leche. Se introducen los fragmentos de ADN que contiene el gen fusionado introducido con el gen de anticuerpo en un embrión de cabra y seguidamente
10 se introduce este embrión en una cabra hembra. Los anticuerpos deseados pueden obtenerse como una proteína fusionada con la proteína de leche producida por la cabra transgénica nacida de la cabra receptora del embrión (o descendencia de la misma). Adicionalmente, para incrementar el volumen de leche que contiene
15 el anticuerpo deseado producido por la cabra transgénica, se puede administrar hormonas a la cabra transgénica según sea necesario (Ebert, K. M. *et al.*, *Bio/Technology* (1994) 12 (7), 699-702).

Cuando se administra a un humano una molécula que se une al antígeno descrita en el presente documento, puede usarse
20 de manera apropiada como el dominio de unión a antígeno del complejo un dominio de unión a antígeno derivado de un anticuerpo recombinante genéticamente que ha sido modificado artificialmente para reducir la antigenicidad heteróloga contra el humano y otros semejantes. Tales anticuerpos recombinantes
25 genéticamente incluyen, por ejemplo, anticuerpos humanizados.

Estos anticuerpos modificados se producen de manera apropiada a través de métodos conocidos.

Una región variable de anticuerpo usada para producir el dominio de unión a antígeno de una molécula que se une al antígeno descrita en el presente documento generalmente está formado por tres regiones de determinación de complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés) separadas por cuatro regiones de armazón (FR, por sus siglas en inglés). La CDR es una región que determina sustancialmente la especificidad de unión de un anticuerpo. Las secuencias de aminoácidos de las CDR son altamente diversas. Por otro lado, las secuencias de aminoácido que forman la FR a menudo tienen una identidad alta incluso en anticuerpos con diferentes especificidades de unión. En consecuencia, generalmente, la especificidad de unión de cierto anticuerpo puede ser introducida en otro anticuerpo mediante injerto de CDR.

Se denomina también al anticuerpo humanizado como anticuerpo humano reformado. Específicamente, se conocen los anticuerpos humanizados preparados mediante injerto de CDR de un anticuerpo animal no humano, como por ejemplo un anticuerpo de ratón en un anticuerpo humano y otros semejantes. Se conocen también las técnicas de ingeniería genética de uso común para obtener anticuerpos humanizados. Específicamente, por ejemplo, se conoce la extensión por solapamiento PCR como un método de injerto de anticuerpo de ratón CDR en FR humano. En la extensión por solapamiento PCR, se agrega a los cebadores una secuencia de

nucleótidos que codifica a anticuerpo de ratón CDR a ser injertado para sintetizar un anticuerpo humano FR. Se preparan cebadores para cada una de las cuatro FR. Generalmente se considera que cuando se realiza el injerto de CDR de ratón en un FR humano, la
5 selección de una FR humano que tiene una alta identidad con una FR de ratón resulta ventajosa para mantener la función CDR. Es decir, generalmente es preferible usar un FR humano que comprende una secuencia de aminoácidos la cual tiene una alta identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de la FR adyacente al CDR
10 de ratón a ser injertado.

Las secuencias de nucleótidos a ser ligadas se diseñan de modo que se conectan entre sí dentro del marco. Las FR humanas se sintetizan por separado usando los cebadores respectivos. Como resultado, se obtienen productos en los cuales el ADN que codifica
15 CDR de ratón está conectado al ADN individual que codifica la FR. Las secuencias de nucleótidos que codifican CDR de ratón de cada producto se diseñan de modo que se traslapan entre sí. Seguidamente, se realiza una reacción de síntesis de cadena complementaria para aparearse con las regiones CDR de traslape
20 de los productos sintetizados usando un gen de anticuerpo humano como plantilla. Las FR humanas se ligan *por medio de* secuencias CDR de ratón mediante esta reacción.

El gen de la región V de longitud completa, en la cual se ligan tres CDR y cuatro FR en última instancia, se amplifica
25 usando cebadores que se aparean con su extremo 5' o 3', los cuales

se agregan con secuencias de reconocimiento de enzimas de restricción adecuadas. Un vector de expresión para anticuerpo humanizado puede producirse mediante la introducción del ADN obtenido según se describe anteriormente y un ADN que codifica
5 una región C de anticuerpo humano en un vector de expresión de modo que los mismos se ligarán dentro del marco. Después de transfectar el vector recombinante en una célula hospedera para establecer células recombinantes, las células recombinantes se cultivan, y el ADN que codifica el anticuerpo humanizado es
10 expresado para producir el anticuerpo humanizado en el cultivo celular (véase, Patente Europea Publicación No. EP 239400 y Publicación de Patente Internacional No. WO 1996/02576).

Mediante la medición y la evaluación cualitativa o cuantitativa de la actividad de unión a antígeno de los anticuerpos
15 humanizados producidos según se describe anteriormente, se pueden seleccionar de manera adecuada las FR de anticuerpo humano que permitan a las CDR formar un sitio favorable de unión a antígeno cuando se ligan a través de las CDR. Los residuos de aminoácido en las FR pueden sustituirse según sea necesario, de modo que las
20 CDR de un anticuerpo humano reformado forman un sitio apropiado de unión a antígeno. Por ejemplo, las mutaciones de secuencia de aminoácidos pueden ser introducidas en las FR mediante la aplicación del método PCR usado para injertar una CDR de ratón en un FR humano. Más específicamente, se pueden introducir
25 mutaciones parciales de secuencia de nucleótidos en cebadores que

se aparean con la FR. Se introducen las secuencias de nucleótidos en las FR sintetizadas mediante otros cebadores semejantes. Las secuencias mutantes que tienen las características deseadas pueden seleccionarse midiendo y evaluando la actividad del anticuerpo mutante sustituido en el aminoácido para unirse al antígeno mediante el método citado anteriormente (Sato, K. *et al.*, Cancer Res. (1993) 53: 851-856).

De manera alternativa, los anticuerpos humanos deseados pueden obtenerse inmunizando animales transgénicos que tienen el repertorio completo de genes de anticuerpos humanos (véase documentos WO 1993/012227; WO 1992/003918; WO 1994/002602; WO 1994/025585; WO 1996/034096; WO 1996/033735) a través de la inmunización con ADN.

Además, se conocen también las técnicas de preparación de anticuerpos humanos por criba usando bibliotecas de anticuerpos humanos. Por ejemplo, la región V de un anticuerpo humano es expresada como un anticuerpo de cadena única (scFv) en la superficie del fago a través del método de despliegue de fagos. Se pueden seleccionar aquellos fagos que expresan un scFv que se une al antígeno. La secuencia de ADN que codifica la región V del anticuerpo humano que se une al antígeno puede ser determinada analizando los genes de los fagos seleccionados. Se determina la secuencia de ADN de los scFv que se une al antígeno. Se prepara un vector de expresión mediante la fusión de la secuencia de región V dentro del marco con la secuencia de la región C de un anticuerpo

humano deseado y la introducción de lo anterior en un vector de expresión apropiado. El vector de expresión se introduce en las células apropiadas para la expresión como por ejemplo aquellas descritas anteriormente. El anticuerpo humano puede ser producido
 5 mediante la expresión de genes que codifican el anticuerpo humano en las células. Estos métodos son conocidos en la actualidad (véase documentos WO 1992/001047; WO 1992/020791; WO 1993/006213; WO 1993/011236; WO 1993/019172; WO 1995/001438; WO 1995/015388).

Un dominio que comprende una región variable de anticuerpo que tiene actividad de unión a glipicano-3 (GPC3)
 10

En el presente documento, la frase "un dominio que comprende una región variable de anticuerpo que tiene actividad de unión a glipicano-3 (GPC3)", se refiere a una porción de anticuerpo que comprende una región que se une específicamente
 15 a la proteína GPCR mencionada anteriormente, o a toda o una porción de un péptido parcial de la proteína GPC3, y también es complementaria a esta. Los dominios que comprenden una región variable de anticuerpo pueden ser proporcionados a partir de dominios variables de uno o una pluralidad de anticuerpos.
 20 Preferiblemente, los dominios que comprenden una región variable de anticuerpo comprenden regiones variables de cadena ligera y cadena pesada de anticuerpo (VL y VH). Ejemplos adecuados de tales dominios que comprenden regiones variables de anticuerpo incluyen
 25 "Fv de cadena única (scFv)", "anticuerpo de cadena única", "Fv", "Fv 2 de cadena única (scFv2)", "Fab", "F(ab')₂", etc.

Un dominio que comprende una región variable de anticuerpo que tiene actividad de unión al complejo receptor de células T

En la presente, la frase “un dominio que comprende una
5 región variable de anticuerpo que tiene actividad de unión al
complejo receptor de células T”, se refiere a una porción de
anticuerpo que se une al complejo del receptor de células T que
comprende una región que se une específicamente a toda o a una
porción de un complejo receptor de células T y también es
10 complementaria a esta. El complejo receptor de células T puede
ser un receptor de células T mismo, o una molécula adaptadora que
constituye un complejo receptor de células T junto con un receptor
de células T. La CD3 es adecuada como una molécula adaptadora.

**Un dominio que comprende una región variable de
15 anticuerpo que tiene actividad de unión al receptor de células
T**

En la presente, la frase “un dominio que comprende una
región variable de anticuerpo que tiene actividad de unión al
receptor de células T”, se refiere a una porción de anticuerpo
20 que se une al receptor de células T, producidas incluyendo una
región que se une específicamente a toda o una porción de un
receptor de células T y también es complementaria a esta.

La porción de un receptor de células T al cual el dominio
de la presente invención se une, puede ser una región variable
25 o una región constante, pero se prefiere un epítipo presente en

la región constante. Ejemplos de la secuencia de región constante incluye la cadena α del receptor de células T del Acceso de la RefSeq No. CAA26636.1 (SEQ ID NO:4), la cadena β del receptor de células T del Acceso de RefSeq No. C25777 (SEQ ID NO:5), la cadena $\gamma 1$ del receptor de células T del Acceso de RefSeq No. A26659 (SEQ ID NO:6), la cadena $\gamma 2$ del receptor de células T del Acceso de RefSeq No. AAB63312.1 (SEQ ID NO:7), y la cadena δ del receptor de células T del Acceso de RefSeq No. AAA61033.1 (SEQ ID No:8).

Un dominio que comprende una región variable de anticuerpo que tiene actividad de unión a CD3

En la presente, la frase "un dominio que comprende una región variable de anticuerpo que tiene actividad de unión a CDR3", se refiere a una porción de anticuerpo que se une a CD3 producida incluyendo una región que se une específicamente a toda o una porción de CD3 y es también complementaria a esta. Preferiblemente, el dominio comprende las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera (VL y VH) de un anticuerpo anti-CD3. Ejemplos adecuados de tal dominio incluyen una "Fv de cadena única (scFv)", "anticuerpo de cadena única", "Fv", "Fv 2 de cadena única (scFv2)", "Fab", "F(ab')₂", etc.

El dominio que comprende una región variable de anticuerpo que tiene actividad de unión a CD3 de la presente invención, puede ser cualquier dominio que se une al epítipo en la medida en que el epítipo existe en la secuencia de la cadena- γ , cadena- δ , o cadena- ϵ que constituye la CD3 humana. En la presente

invención, preferiblemente, un dominio que comprende una región variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo anti-CD3 y una región variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo anti-CD3 que se une a un epítipo presente en la región extracelular de la cadena ϵ del complejo CD3 humano, es adecuadamente usada. Además de la

5 región variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo anti-CD3 y región variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo anti-CD3 descrita en los Ejemplos, varios dominios de unión a CD3 conocidos que contienen una región variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo que se une a CD3 y una región variable de cadena pesada

10 (VH) de anticuerpo que se une a CD3, y aquellas del anticuerpo OKT3 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, 4914-4917), son adecuadamente usadas como tales dominios. Se puede usar apropiadamente un dominio que contiene la región variable de anticuerpo derivado del anticuerpo anti-CD3 que tiene las

15 propiedades deseadas, el cual se obtiene inmunizando un animal deseado por el método mencionado anteriormente usando la cadena- γ , cadena- δ o cadena- ϵ , que constituyen el CD3 humano. Los anticuerpos humanos y anticuerpos apropiadamente humanizados como se describe anteriormente, pueden ser apropiadamente usados como el anticuerpo anti-CD3 para dar origen al dominio que contiene la región variable del anticuerpo que tiene actividad de unión a CD3. Con respecto a la estructura de la cadena- γ , cadena- δ , o

20 cadena- ϵ , que constituye la CD3, sus secuencias de polinucleótido se muestran en las SEQ ID NOs: 9 (NM_000073.2), 10 (NM_000732.4),

25

y 11 (NM_000733.33), y sus secuencias de polipéptido se muestran en las SEQ ID NOs: 12 (NP_000064.1), 13 (NP_000723.1), y 14 (NP_000724.1) (el número de acceso RefSeq se muestra en paréntesis).

5 Los dominios que contienen la región variable de anticuerpo en las moléculas que se unen al antígeno de la presente invención, pueden unirse al mismo epítipo. En la presente, el mismo epítipo puede estar presente en una proteína que comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO:2 o 14. Alternativamente,
10 los dominios que contienen la región variable de anticuerpo en las moléculas que se unen al antígeno de la presente invención, pueden unirse a diferentes epítopos, respectivamente. En la presente, los diferentes epítopos pueden estar presentes en una proteína que comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID
15 NO:2 o 14.

Especificidad

El término “específico” significa que una molécula involucrada en la unión específicamente no muestra unión significativa a moléculas distintas de una molécula única o un
20 número de moléculas asociadas a la unión. Además, el término también se usa cuando un dominio que contiene una región variable de anticuerpo es específico a un epítipo particular entre epítopos múltiples en un antígeno. Cuando un epítipo unido por un dominio que contiene una región variable de anticuerpo está incluido en
25 un número de diferentes antígenos, las moléculas que se unen al

antígeno que comprenden el dominio que contiene la región variable de anticuerpo, pueden unirse a varios antígenos que tienen el epítopo.

Epítopo

5 “Epítopo” significa un determinante antigénico en un antígeno y se refiere a un sitio de antígeno al cual se une un dominio de una molécula que se une al antígeno que incluye una región variable de anticuerpo descrita en la presente. De este modo, por ejemplo, el epítopo puede ser definido de conformidad
10 con su estructura. De manera alternativa, el epítopo puede ser definido de conformidad con la actividad de unión a antígeno de una molécula que se une al antígeno que reconoce el epítopo. Cuando el antígeno es un péptido o polipéptido, el epítopo puede ser especificado por residuos de aminoácido que forman el epítopo.
15 De manera alternativa, cuando el epítopo es una cadena de azúcar, el epítopo puede ser especificado mediante su cadena específica de estructura de azúcar.

Un epítopo lineal es un epítopo que contiene un epítopo cuya secuencia primaria de aminoácido es reconocida. Tal epítopo
20 lineal normalmente contiene al menos tres y, más frecuentemente, al menos cinco, por ejemplo, aproximadamente 8 a 10 o 6 a 20 aminoácidos en su secuencia específica.

En contraste al epítopo lineal, “epítopo conformacional” es un epítopo en el cual la secuencia primaria
25 de aminoácido que contiene el epítopo no es el único determinante

de los epítomos reconocidos (por ejemplo, la secuencia primaria de aminoácido de un epítomo conformacional no es reconocida necesariamente por un anticuerpo que define epítomos). Los epítomos conformacionales pueden contener un número mayor de aminoácidos en comparación con los epítomos lineales. Un anticuerpo que reconoce epítomos conformacionales reconoce la estructura tridimensional de un péptido o proteína. Por ejemplo, cuando una molécula de proteína se dobla y forma una estructura tridimensional, las cadenas principales de aminoácidos y/o polipéptidos que forman un epítomo conformacional se alinean y el epítomo se vuelve reconocible para el anticuerpo. Los métodos para determinar las conformaciones de epítomo incluyen, por ejemplo, cristalografía de rayos X, resonancia magnética nuclear bidimensional, marcado giratorio específico de sitio y resonancia paramagnética de electrones, pero no son ejemplos taxativos. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology (1996), Vol. 66, Morris (ed.).

Se ejemplifica más adelante un método para confirmar la unión a un epítomo por una molécula que se une al antígeno que comprende un dominio que contiene una región variable de anticuerpo que tiene actividad de unión a GPC3, y un método para confirmar la unión a un epítomo por una molécula que se une al antígeno de prueba que comprende un dominio que contiene una región variable de anticuerpo que tiene actividad de unión al complejo receptor de células T, también puede ser realizado adecuadamente

de conformidad con los ejemplos siguientes.

Por ejemplo, se puede confirmar el reconocimiento de un epítipo lineal presente en la molécula de GPC3 por una molécula que se une al antígeno de prueba que comprende un dominio que

5 contiene una región variable de anticuerpo que tiene actividad de unión a GPC3. Se sintetiza un péptido lineal que comprende una secuencia de aminoácidos que forma el dominio extracelular de GPC3 para el objetivo citado anteriormente. El péptido puede sintetizarse químicamente. Alternativamente, se puede obtener

10 mediante técnicas de ingeniería genética usando una región que codifica la secuencia de aminoácidos correspondiente al dominio extracelular en un ADNc de GPC3. Seguidamente, se evalúa la actividad de unión entre un péptido lineal que comprende la secuencia de aminoácido que constituye el dominio extracelular

15 y la molécula que se une al antígeno de prueba que comprende un dominio que contiene una región variable de anticuerpo que tiene la actividad de unión a GPC3. Por ejemplo, ELISA el cual usa un péptido lineal inmovilizado como el antígeno, puede permitir la evaluación de la actividad de unión de la molécula de unión al

20 antígeno hacia el péptido. De manera alternativa, la actividad de unión hacia un péptido lineal puede ser elucidada con base en el nivel de inhibición causado por el péptido lineal en la unión de la molécula que se une al antígeno a células que expresan GPC3. Estas pruebas pueden elucidar la actividad de unión de las

25 moléculas que se unen al antígeno hacia el péptido lineal.

Además, el reconocimiento de la estructura tri-dimensional del epítipo por una molécula que se une al antígeno de prueba que comprende un dominio que contiene una región variable de anticuerpo que tiene actividad de unión a GPC3 puede ser
5 confirmado abajo. Se preparan las células que expresan GPC3 para el propósito citado anteriormente. Por ejemplo, cuando la molécula que se une al antígeno de prueba que comprende un dominio que contiene una región variable de anticuerpo que tiene actividad de unión a GPC3 contacta células que expresan GPC3, se une
10 fuertemente a las células, pero por otro lado, existen casos cuando la molécula que se une al antígeno no se une sustancialmente al péptido lineal inmovilizado que comprende la secuencia de aminoácido que constituye el dominio extracelular de GPC3. En estos casos, "no se une sustancialmente", se refiere a una
15 actividad de unión de 80% o menos, en general 50% o menos, preferiblemente 30% o menos, y particularmente preferiblemente 15% o menos, con relación a la actividad de unión hacia células que expresan GPC3 humano.

Los métodos para someter a prueba la actividad de unión
20 de una molécula que se une al antígeno de prueba que contiene un dominio de unión a antígeno GPC3 hacia células que expresan GPC3 incluyen, por ejemplo, los métodos descritos en Antibodies: A Laboratory Manual (Ed Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988) 359-420). Específicamente, la evaluación puede
25 realizarse con base en el principio de ELISA o mediante

clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) usando células que expresan GPC3 como antígeno.

En el formato ELISA, la actividad de unión de una molécula que se une al antígeno de prueba que contiene un dominio de unión a antígeno GPC3 hacia células que expresan GPC3 puede ser evaluada de manera cuantitativa comparando los niveles de señales generadas por la reacción enzimática. Específicamente, se agrega una molécula que se une al antígeno de prueba a una placa ELISA sobre la cual las células que expresan GPC3 han sido inmovilizadas. Seguidamente, se detecta la molécula que se une al antígeno de prueba unida a las células usando un anticuerpo marcado por enzima que reconoce la molécula que se une al antígeno de prueba. De manera alternativa, cuando se usa FACS, se prepara una serie de dilución de una molécula que se une al antígeno de prueba y el titulador de unión a anticuerpo para las células que expresan GPC3 puede ser determinado para comparar la actividad de unión de la molécula que se une al antígeno de prueba hacia células que expresan GPC3.

La unión de una molécula que se une al antígeno de prueba hacia un antígeno expresado en la superficie de células suspendidas en amortiguador u otros semejantes puede detectarse usando un citómetro de flujo. Entre los citómetros de flujo conocidos se incluyen, por ejemplo, los dispositivos siguientes:

FACSCanto™ II

25

Falsaria™

FACSArray™

FACSVantage™ SE

FACSCalibur™ (todos son marcas comerciales de BD Biosciences)

5 EPICS ALTRA HyPerSort

Cytomics FC 500

EPICS XL-MCL ADC EPICS XL ADC

Cell Lab Quanta/Cell Lab Quanta SC (todos son marcas comerciales de Beckman Coulter)

10 Los métodos preferibles para someter a ensayo la actividad de unión de una molécula que se une al antígeno de prueba que contiene un dominio de unión a antígeno GPC3 hacia un antígeno incluyen, por ejemplo, el método siguiente. Primero, las células que expresan GPC3 reaccionan con una molécula que se une al

15 antígeno de prueba y seguidamente lo anterior se marca con un anticuerpo secundario marcado con FITC que reconoce el complejo de polipéptidos. La molécula que se une al antígeno de prueba será diluida de manera apropiada con un amortiguador adecuado para preparar el complejo a una concentración deseada. Por ejemplo,

20 el complejo puede usarse a una concentración dentro del intervalo de 10 µg/ml hasta 10 µg/ml. Seguidamente, se determina la intensidad de fluorescencia y contenido en células usando FACSCalibur (BD). La intensidad de fluorescencia obtenida mediante análisis usando el software CELL QUEST (BD), es decir,

25 el valor de media geométrica, refleja la cantidad de anticuerpo

unido a células. Es decir, la actividad de unión de una molécula que se une al antígeno de prueba, la cual está representada por la cantidad de la molécula que se une al antígeno de prueba unida, puede ser determinada midiendo el valor de media geométrica.

5 El hecho de que una molécula que se une al antígeno de prueba que contiene un dominio de unión a antígeno GPC3 comparte o no un epítipo común con otra molécula que se une al antígeno, puede ser evaluada con base en la competencia entre los dos complejos por el mismo epítipo. La competencia entre moléculas
10 que se unen al antígeno puede detectarse mediante la prueba de bloqueo cruzado u otros semejantes. Por ejemplo, la prueba competitiva ELISA es una prueba de bloqueo cruzado preferida.

 Específicamente, en una prueba de bloqueo cruzado, la proteína GPC3 inmovilizada en los pocillos de una placa de
15 microtitulación es incubada previamente en presencia o ausencia de una molécula que se une al antígeno competidor candidato y seguidamente se agrega al mismo una molécula que se une al antígeno de prueba. La cantidad de la molécula que se une al antígeno de prueba unida a la proteína GPC3 en los pocillos está indirectamente
20 correlacionada con la capacidad de unión de la molécula que se une al antígeno competidor candidato que compite por la unión al mismo epítipo. Es decir, a mayor afinidad de la molécula que se une al antígeno competidor por el mismo epítipo, menor será la actividad de unión de la molécula que se une al antígeno de prueba
25 hacia los pocillos cubiertos de proteína GPC3.

La cantidad de la molécula que se une al antígeno de prueba unida a los pocillos mediante la proteína GPC3, puede ser determinada fácilmente mediante el marcado de la molécula que se une al antígeno con antelación. Por ejemplo, se mide una molécula
5 que se une al antígeno marcado con biotina usando un conjugado de avidina/peroxidasa y un sustrato apropiado. En particular, la prueba de bloqueo cruzado que usa etiquetas de enzima, como por ejemplo peroxidasa se denomina "prueba competitiva ELISA". La molécula que se une al antígeno también puede marcarse con otras
10 sustancias de marcado que permitan detección o medición. Específicamente, se conocen las marcas radioactivas, las marcas fluorescentes y otras semejantes.

Cuando la molécula que se une al antígeno competidor candidato puede bloquear la unión mediante una molécula que se
15 une al antígeno de prueba que contiene un dominio de unión a antígeno GPC3 en al menos 20%, preferentemente al menos 20 a 50% y, más preferentemente, al menos 50% en comparación con la actividad de unión en un experimento control realizado en ausencia de la molécula que se une al antígeno competidor, se determina
20 que la molécula que se une al antígeno de prueba se une considerablemente al mismo epítipo unido por la molécula que se une al antígeno competidor o compite por la unión al mismo epítipo.

Cuando se ha identificado previamente la estructura de un epítipo unido por una molécula que se une al antígeno de prueba
25 que contiene un dominio de unión a antígeno GPC3, el hecho de que

los moléculas que se unen al antígeno de prueba y control comparten o no un epítipo común puede ser evaluado mediante la comparación de las actividades de unión de los dos moléculas que se unen al antígeno hacia un péptido preparado mediante la introducción de mutaciones de aminoácido en el péptido que forma el epítipo.

Para medir las actividades de unión citadas anteriormente, por ejemplo, se comparan las actividades de unión de las moléculas que se unen al antígeno de prueba y control hacia un péptido lineal al cual se introduce una mutación en el formato ELISA citado anteriormente. Además de los métodos ELISA, la actividad de unión hacia el péptido mutante unido a una columna puede ser determinada haciendo circular las moléculas que se unen al antígeno de prueba y control en la columna y cuantificando seguidamente la molécula que se une al antígeno eluido en la solución de elución. Se conocen métodos para absorber un péptido mutante en una columna, por ejemplo, en forma de un péptido de fusión GST.

De manera alternativa, cuando el epítipo identificado es un epítipo conformacional, el hecho de que las moléculas que se unen al antígeno de prueba y control compartan o no un epítipo común puede ser evaluado con ayuda del método siguiente. Primero, se preparan células que expresan GPC3 y células que expresan GPC3 con una mutación introducida en el epítipo. Se agregan las moléculas que se unen al antígeno de prueba y control a una suspensión celular preparada mediante suspensión de estas células

en un amortiguador apropiado, como por ejemplo PBS. Seguidamente, se lavan de manera apropiada las suspensiones celulares con un amortiguador y se agrega a la misma un anticuerpo marcado con FITC que reconoce a las moléculas que se unen al antígeno de prueba y control. La intensidad de fluorescencia y el número de células marcadas con el anticuerpo marcado se determinan usando FACSCalibur (BD). Las moléculas que se unen al antígeno de prueba y control se diluyen de manera apropiada usando un amortiguador adecuado y a concentraciones deseadas. Por ejemplo, pueden usarse a una concentración dentro del intervalo de 10 µg/ml hasta 10 ng/ml. La intensidad de fluorescencia determinada por el análisis con el software CELL QUEST (BD), es decir, el valor de media geométrica, refleja la cantidad de anticuerpo unido a células marcado. Es decir, las actividades de unión de moléculas que se unen al antígeno de prueba y control, representadas por la cantidad de anticuerpo marcado unido, pueden ser determinadas midiendo el valor de la media geométrica.

En el método citado anteriormente, el hecho de que una molécula que se une al antígeno “no se une considerablemente a las células que expresan GPC3 mutante” puede ser evaluado, por ejemplo, con el método siguiente. Primero, las moléculas que se unen al antígeno de prueba y control unidos a las células que expresan GPC3 mutante son marcados con un anticuerpo marcado. Seguidamente, se determina la intensidad de fluorescencia de las células. Cuando se usa FACSCalibur para la detección de

fluorescencia mediante citometría de flujo, la intensidad de fluorescencia determinada puede analizarse con el software CELL QUEST. De los valores de media geométrica en presencia y ausencia de la molécula que se une al antígeno, se puede calcular el valor de comparación (Media Δ -geométrica) de conformidad con la fórmula siguiente para determinar la relación de incremento en la intensidad de fluorescencia como resultado de la unión por la molécula que se une al antígeno.

Media Δ -geométrica = Media geométrica (en presencia de la molécula que se une al antígeno)/Media geométrica (en ausencia de la molécula que se une al antígeno)

El valor de comparación de la media geométrica (valor Media Δ -geométrica para la molécula mutante GPC3) determinado por el análisis citado anteriormente, el cual refleja la cantidad de una molécula que se une al antígeno de prueba unido a las células que expresan GPC3 mutante, se compara con el valor de comparación Media Δ -geométrica que refleja la cantidad de la molécula que se une al antígeno de prueba unido a células que expresan GPC3. En este caso, las concentraciones de la molécula que se une al antígeno de prueba usado para determinar los valores de comparación de la Media Δ -geométrica correspondientes a las células que expresan GPC3 y las células que expresan GPC3 mutante se ajustan preferentemente de manera particular para que sean iguales o considerablemente iguales. Se usa una molécula que se une al antígeno del cual se ha confirmado que reconoce un epítopo

en GPC3 como una molécula que se une al antígeno color.

Si el valor de comparación de Media Δ -geométrica de una molécula que se une al antígeno de prueba correspondiente a células que expresan GPC3 mutante es inferior al valor de comparación de la Media Δ -geométrica de la molécula que se une al antígeno de prueba para células que expresan GPC3 en al menos 80%, preferentemente 50%, más preferentemente 30% y particularmente preferentemente 15%, luego la molécula que se une al antígeno de prueba “no se une considerablemente a las células que expresan GPC3 mutante”. La fórmula para determinar el valor media geométrica (Media geométrica) se describe en la Guía del Usuario del software CELL QUEST (BD Biosciences). Cuando la comparación muestra que los valores de comparación son considerablemente equivalentes, se puede determinar que el epítipo para las moléculas que se unen al antígeno de prueba y control sea igual.

Fragmento variable (Fv)

En el presente documento, el término “fragmento variable (Fv)” se refiere a la unidad mínima de un dominio de unión a antígeno derivado de anticuerpo que está compuesto de un par de la región variable de cadena ligera de anticuerpo (VL) y la región variable de cadena pesada de anticuerpo (VH). En 1988, Skerra and Pluckthun hallaron que se pueden preparar anticuerpos homogéneos y activos a partir de la fracción de periplasma de *E. coli* mediante la introducción de un gen de anticuerpos aguas debajo de la secuencia de señales bacterianas e induciendo la expresión

del gen en *E. coli* (Science (1988) 240(4855), 1038-1041). En el Fv preparado de la fracción de periplasma, VH se vincula con VL de manera que se une a un antígeno.

En el presente documento, Fv preferentemente incluye,
5 por ejemplo, un par de Fv el cual es una molécula que se une al antígeno u otros semejantes que comprende:

(1) un dominio de unión a antígeno bivalente el cual es un scFv bivalente, donde un scFv monovalente de los scFv bivalentes está enlazado a un polipéptido que forma un dominio
10 Fc mediante un fragmento Fv de cadena pesada que forma un dominio de unión a CD3 y el otro scFv monovalente está enlazado al otro polipéptido que forma un dominio Fc mediante un fragmento Fv de cadena ligera que forma un dominio de unión a CD3;

(2) un dominio que comprende un dominio Fc que no tiene
15 actividad de unión a receptor $Fc\gamma$ el cual es derivado de aminoácidos que forman el dominio Fc de IgG1, IgG2a, IgG3 o IgG4;
y

(3) al menos un dominio de unión a CD3 monovalente,
en donde los fragmentos de Fv de cadena ligera y cadena
20 pesada se vinculan para formar un dominio de unión a CD3 de manera que se une al antígeno CD3.

scFv, anticuerpo de cadena única y sc(Fv)2

En el presente documento, los términos "scFv",
"anticuerpo de cadena única" y "sc(Fv)2" se refieren todos a un
25 fragmento de anticuerpo de una cadena de polipéptido única que

contiene regiones variables derivadas de las cadenas pesadas y cadenas ligeras, pero no la región constante. En general, un anticuerpo de cadena única también contiene un enlazador de polipéptido entre los dominios VH y VL, lo cual permite la
5 formación de una estructura deseada que se piensa permite las uniones a antígeno. El anticuerpo de cadena única se expone en detalle en Pluckthun, "The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, Vol. 113, Rosenberg y Moore, eds., Springer-Verlag, Nueva York, 269-315 (1994)". Véase también la Publicación de Patente
10 Internacional WO 1988/001649; Patentes estadounidenses No. 4,946,778 y 5,260,203. En una modalidad particular, el anticuerpo de cadena única puede ser biespecífico y/o humanizado.

scFv es un dominio de unión a antígeno en el cual VH y VL que forman Fv están enlazados por un enlazador peptídico
15 (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85(16), 5879-5883). VH y VL pueden ser retenidos de manera muy cercana por el enlazador peptídico.

sc(Fv)₂ es un anticuerpo de cadena única en el cual cuatro regiones variables de dos VL y dos VH están enlazadas
20 mediante enlazadores como por ejemplo enlazadores peptídicos para formar una sola cadena (J Immunol. Métodos (1999) 231(1-2), 177-189). Las dos VH y dos VL pueden derivarse de diferentes anticuerpos monoclonales. Tales sc(Fv)₂ preferentemente incluyen, por ejemplo, un biespecífico sc(Fv)₂ que reconoce dos
25 epítomos presentes en un solo antígeno según se describe en Journal

of Immunology (1994) 152(11), 5368-5374. Sc(Fv)₂ puede ser producido mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, sc(Fv)₂ puede ser producido mediante enlaces de scFv con un enlazador como por ejemplo un enlazador peptídico.

5 En el presente documento, la forma de un dominio de unión a antígeno que forma un sc(Fv)₂ incluyen un anticuerpo en el cual las dos unidades VH y dos unidades VL se disponen en el orden de VH, VL, VH y VL ([VH]-enlazador-[VL]-enlazador-[VH]-enlazador-[VL]) comenzando
10 por el N-terminal de un polipéptido de una sola cadena. El orden de las dos unidades VH y las dos unidades VL no se limita a la forma citada anteriormente y pueden disponerse en cualquier orden. A continuación se muestra el orden ejemplo de la forma.

15 [VL]-enlazador-[VH]-enlazador-[VH]-enlazador-[VL]
 [VH]-enlazador-[VL]-enlazador-[VL]-enlazador-[VH]
 [VH]-enlazador-[VH]-enlazador-[VL]-enlazador-[VL]
 [VL]-enlazador-[VL]-enlazador-[VH]-enlazador-[VH]
 [VL]-enlazador-[VH]-enlazador-[VL]-enlazador-[VH]

20 La forma molecular de sc(Fv)₂ se describe también en detalle en el documento WO 2006/132352. De conformidad con estas descripciones, los expertos en la técnica pueden preparar de manera apropiada el sc(Fv)₂ para producir las moléculas que se unen al antígeno descritos en el presente documento.

25 Además, las moléculas que se unen al antígeno de la presente invención pueden conjugarse con un polímero de soporte

como por ejemplo PEG o un compuesto orgánico como por ejemplo un agente anticancerígeno. De manera alternativa, se introduce preferentemente una secuencia de cadena de azúcar en las moléculas que se unen al antígeno de manera que la cadena de azúcar produce
5 un efecto deseado.

Los enlazadores a usar para enlazar las regiones variables de un anticuerpo comprenden enlazadores arbitrarios de péptidos que pueden ser introducidos mediante ingeniería genética, enlazadores sintéticos y enlazadores descritos en, por
10 ejemplo, Protein Engineering, 9(3), 299-305, 1996. Sin embargo, en la presente invención se prefieren los enlazadores peptídicos. La longitud de los enlazadores peptídicos no se encuentra particularmente limitada y puede ser seleccionada de manera adecuada por los expertos en la técnica de conformidad con el
15 propósito. La longitud es preferentemente cinco aminoácidos o más (sin limitación particular, el límite superior es generalmente 30 aminoácidos o inferior, preferentemente 20 aminoácidos o inferior) y particularmente se prefieren 15 aminoácidos. Cuando sc(Fv)₂ contiene tres enlazadores peptídicos, su longitud pueden
20 ser iguales para todos o diferentes.

Por ejemplo, tales enlazadores peptídicos incluyen:

Ser

Gly·Ser

Gly·Gly·Ser

25 Ser·Gly·Gly

- Gly·Gly·Gly·Ser (SEQ ID NO: 15)
- Ser·Gly·Gly·Gly (SEQ ID NO: 16)
- Gly·Gly·Gly·Gly·Ser (SEQ ID NO: 17)
- Ser·Gly·Gly·Gly·Gly (SEQ ID NO: 18)
- 5 Gly·Gly·Gly·Gly·Gly·Ser (SEQ ID NO: 19)
- Ser·Gly·Gly·Gly·Gly·Gly (SEQ ID NO: 20)
- Gly·Gly·Gly·Gly·Gly·Gly·Ser (SEQ ID NO: 21)
- Ser·Gly·Gly·Gly·Gly·Gly·Gly (SEQ ID NO: 22)
- (Gly·Gly·Gly·Gly·Ser (SEQ ID NO: 7))n
- 10 (Ser·Gly·Gly·Gly·Gly (SEQ ID NO: 8))n
- en donde n es un número entero de 1 o superior. La longitud o secuencias de enlazadores peptídicos pueden seleccionarse de manera acorde por expertos en la técnica dependiendo del propósito.
- 15 Los enlazadores sintéticos (agentes de reticulación química) se usan de manera rutinaria para entrecruzar péptidos y por ejemplo:
- N-hidroxi succinimida (NHS),
- disuccinimidil suberato (DSS),
- 20 bis(sulfosuccinimidil) suberato (BS³),
- ditriobis(succinimidil propionato) (DSP),
- ditriobis(sulfosuccinimidil propionato) (DTSSP),
- glicol etilénico bis(succinimidil succinato) (EGS),
- glicol etilénico bis(sulfosuccinimidil succinato)
- 25 (sulfo-EGS),

disuccinimidil tartrato (DST),
 disulfosuccinimidil tartrato (sulfo-DST),
 bis[2-(succinimidoxycarboniloxy)etil]sulfona
 (BSOCOES),

5 y bis[2-(sulfosuccinimidoxycarboniloxy)etil] sulfona
 (sulfo-BSOCOES). Estos agentes de reticulación están disponibles
 comercialmente.

En general, se requieren tres enlazadores para enlazar
 cuatro regiones variables de anticuerpo. Los enlazadores a usar
 10 pueden ser del mismo tipo o de tipos diferentes.

Fab, F(ab')₂ y Fab'

"Fab" consiste en una cadena ligera única y un dominio
 CH1 y región variable de una cadena pesada única. La cadena pesada
 de la molécula Fab no puede formar uniones de disulfuro con otra
 15 molécula de cadena pesada.

"F(ab')₂" o "Fab" es producido para tratar una
 inmunoglobulina (anticuerpo monoclonal) con una proteasa como por
 ejemplo pepsina y papaína y se refiere a un fragmento de anticuerpo
 generado por digestión de una inmunoglobulina (anticuerpo
 20 monoclonal) en un sitio cercano a las uniones de disulfuro
 presentes entre las regiones de articulación en cada una de las
 dos cadenas H. Por ejemplo, la papaína segmenta IgG en corriente
 arriba de las uniones de disulfuro presentes entre las regiones
 de articulación en cada una de los dos cadenas H para generar dos
 25 fragmentos de anticuerpo homólogos, en los cuales una cadena L

que comprende VL (región variable de cadena L) y CL (región constante de cadena L) está enlazada a un fragmento de cadena H que comprende VH (región variable de cadena H) y CH1 (región 1 en la región constante de cadena H) *por medio de* una unión de
5 disulfuro en sus regiones C-terminal. Cada uno de estos dos fragmentos de anticuerpo homólogos es denominado Fab'.

"F(ab')₂" consiste en dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas que comprenden la región constante de un dominio CH1 y una porción de dominios CH2 de modo que se forman uniones de
10 disulfuro entre las dos cadenas pesadas. El F(ab')₂ que forma una molécula que se une al antígeno descritos en el presente documento puede ser preferentemente producido de la manera siguiente. Un anticuerpo monoclonal completo u otros semejantes que comprenden un dominio de unión a antígeno deseado es parcialmente digerido
15 con una proteasa como por ejemplo pepsina; y los fragmentos de Fc son retirados por absorción en una columna de proteína A. La proteasa no está particularmente limitada siempre que pueda segmentar el anticuerpo entero de una manera selectiva para producir F(ab')₂ en una condición de reacción de enzima de
20 configuración apropiada como por ejemplo pH. Tales proteasas incluyen, por ejemplo, pepsina y ficina.

Dominio Fc

Un dominio Fc que forma una molécula que se une al antígeno descrita en la presente puede ser preferiblemente
25 producida de la siguiente manera. Un anticuerpo tal como un

anticuerpo monoclonal es parcialmente digerido con una proteasa tal como pepsina. Después, el fragmento resultante es adsorbido en una columna de la Proteína A o Proteína G y se eluye con un amortiguador de elución apropiado. La proteasa no es parcialmente
5 limitada, mientras que puede desdoblar anticuerpos tal como anticuerpos monoclonales bajo una condición de reacción de enzima de ajuste apropiado tal como pH. Tales proteasas incluyen, por ejemplo, pepsina y ficina.

Las moléculas que se unen al antígeno descritas en la
10 presente comprenden un dominio Fc con actividad que se une al receptor Fc γ reducida, lo cual incluye aminoácidos que forman el dominio Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.

Se determina el isotipo del anticuerpo de conformidad con la estructura de la región constante. Las regiones constantes
15 de los isotipos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 son llamados C γ 1, C γ 2, C γ 3 y C γ 4, respectivamente. Las secuencias de aminoácido de los polipéptidos de dominio Fc que forman C γ 1, C γ 2, C γ 3 y C γ 4 humanos ejemplificados en la SEQ ID N0: 23, 24, 25 y 26, respectivamente. La relación entre los residuos de aminoácido que forman cada
20 secuencia de aminoácido y numeración EU de Kabat (aquí también referida como EU INDEX) se muestra en la Fig. 12.

El dominio Fc se refiere a la región demás de F(ab')₂ la cual comprende dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas que comprenden una porción de la región constante que comprende un
25 dominio CH1 y una región entre los dominios CH1 y CH2 de manera

que los enlaces de disulfuro se forman entre las dos cadenas pesadas. El dominio Fc que forma una molécula que se une al antígeno descrito en la presente puede ser preferiblemente producido como sigue. Un anticuerpo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 monoclonal o similares
 5 es parcialmente diferido con una proteasa tal como pepsina, seguido por elución de la fracción absorbida en una columna de Proteína A. La proteasa no es particularmente limitada, mientras que puede desdoblar el anticuerpo completo en una manera selectiva para producir F(ab')₂ en una condición de reacción de la enzima
 10 de ajuste apropiada tal como pH. Tales proteasas incluyen, por ejemplo, pepsina y ficina.

Receptor Fc γ

El receptor Fc se refiere a un receptor capaz de unirse al dominio Fc de anticuerpos monoclonales IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4
 15 e incluye a todos los miembros que pertenecen a la familia de proteínas considerablemente codificadas por un gen receptor Fc γ . En el ser humano, la familia incluye Fc γ RI (CD64) incluyendo la isoformas Fc γ RIa, Fc γ RIb y Fc γ RIc; Fc γ RII (CD32) incluyendo la isoformas Fc γ RIIa (incluyendo el alotipo H131 y R131), Fc γ RIIb
 20 (incluyendo Fc γ RIIb-1 y Fc γ RIIb-2) y Fc γ RIIc; y Fc γ RIII (CD16) incluyendo la isoforma Fc γ RIIIa (incluyendo el alotipo V158 y F158) y Fc γ RIIIb (incluyendo el alotipo Fc γ RIIIb-NA1 y Fc γ RIIIb-NA2); así como todas las isoformas Fc γ Rs, Fc γ R humanas no identificadas y alotipos de las mismas. Sin embargo, el receptor
 25 Fc γ no se limita a estos ejemplos. Sin limitarse a ello, Fc γ R

incluye aquellos derivados de seres humanos, ratones, ratas, conejos y monos. El Fc γ R puede derivarse de cualquier organismo. El ratón Fc γ R incluye, sin ser limitado a, Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32), Fc γ RIII (CD16) y Fc γ RIII-2 (CD16-2), así como todas las

5 Fc γ Rs de ratón, isoformas Fc γ R no identificadas y alotipos de las mismas. Tales receptores de Fc γ preferidos incluyen, por ejemplo, Fc γ I (CD64), Fc γ IIA (CD32), Fc γ IIB (CD32), Fc γ IIIA (CD16) y/o Fc γ IIIB humano (CD16). La secuencia de polinucleótido y la secuencia de aminoácidos de Fc γ I se muestran en SEQ ID NO: 27

10 (NM_000566.3) y 28 (NP_000557.1), respectivamente; la secuencia de polinucleótido y la secuencia de aminoácidos de Fc γ IIA se muestran en SEQ ID NO: 29 (BC020823.1) y 30 (AAH20823.1), respectivamente; la secuencia de polinucleótido y la secuencia de aminoácidos de Fc γ IIB se muestran en SEQ ID NO: 31 (BC146678.1)

15 y 32 (AAI46679.1), respectivamente; la secuencia de polinucleótido y la secuencia de aminoácidos de Fc γ IIIA se muestra en SEQ ID NO: 3 (BC033678.1) y 34 (AAH33678.1), respectivamente; y la secuencia de polinucleótido y la secuencia de aminoácidos de Fc γ IIIB se muestra en SEQ ID NO: 35 (BC128562.1) y 36

20 (AAI28563.1), respectivamente (el número de acceso de RefSeq se muestra en cada paréntesis). El hecho de que un receptor Fc γ tiene actividad de unión al dominio Fc de un anticuerpo monoclonal IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 puede ser evaluado mediante tamiz ALPHA (Prueba Homogénea de Proximidad Luminiscente Amplificada), método

25 BIACORE con base en resonancia de plasmón de superficie (SPR) y

otros (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2006) 103(11), 4005-4010), además de los formatos citados anteriormente FACS y ELISA.

Entretanto, “ligando Fc” o “ligando efector” se refiere a una molécula y preferentemente un polipéptido que se une a un dominio de anticuerpo Fc, que forma un complejo de ligandos Fc/Fc. Las moléculas pueden derivarse de cualquier organismo. La unión de un ligando Fc a Fc preferentemente induce uno o más funciones efectoras. Tales ligandos Fc incluyen, sin ser limitado a, receptores Fc, Fc γ R, Fc γ R, Fc γ R, FcRn, C1q y C3, lectina de unión a manana, receptor de manosa, Proteína A *Staphylococcus*, Proteína G *Staphylococcus* y Fc γ Rs virales. Los ligandos Fc también incluyen homólogos de receptor Fc (FcRH) (Davis y otros, (2002) Immunological Reviews 190, 123-136), los cuales son una familia de receptores homólogos Fc de Fc γ R. Los ligandos Fc también incluyen moléculas sin identificar que se unen a Fc.

Actividad de unión a receptor Fc γ

La actividad de unión deteriorada de dominio Fc a cualquiera de los receptores Fc γ Fc γ I, Fc γ IIA, Fc γ IIB, Fc γ IIIA y/o Fc γ IIIB puede ser evaluada mediante el uso de los formatos FACS y ELISA descrito anteriormente, así como el tamiz ALPHA (Prueba Homogénea de Proximidad Luminiscente Amplificada) y método BIACORE con base en resonancia de plasmón de superficie (SPR, por sus siglas en inglés) (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2006) 103(11), 4005-4010).

El tamizado ALPHA se realiza mediante tecnología ALPHA

con base en los principios descritos más adelante usando dos tipos de microesferas: microesferas donantes y receptoras. Se detecta una señal luminiscente únicamente cuando moléculas enlazadas a las microesferas donantes interactúan biológicamente con moléculas enlazadas a las microesferas receptoras y cuando las dos microesferas están ubicadas de manera sumamente cercana. Excitado por el rayo láser, el fotosensibilizador de una microesfera donante convierte el oxígeno que rodea la microesfera en oxígeno singlete excitado. Cuando el oxígeno singlete se difunde alrededor de las microesferas donantes y alcanza a las microesferas receptoras ubicadas de manera sumamente cercana, se induce una reacción quimioluminiscente dentro de las microesferas receptoras. Esta reacción en última instancia conlleva a la emisión de luz. De no interactuar las moléculas enlazadas a las microesferas donantes con las moléculas enlazadas a las microesferas receptoras, el oxígeno singlete producido por las microesferas donantes no alcanzan las microesferas receptoras y la reacción quimioluminiscente no tiene lugar.

Por ejemplo, una molécula que se une al antígeno etiquetada con biotina es inmunizada por las microesferas donadoras y el receptor $\text{Fc}\gamma$ marcado con glutatión S-transferasa (GST) es inmovilizado en las microesferas receptoras. En ausencia de una molécula que se une al antígeno que comprende un dominio Fc mutante competitivo, el receptor $\text{Fc}\gamma$ interactúa con una molécula que se une al antígeno que comprende un dominio Fc de

tipo silvestre, induciendo una señal de 520 a 620 nm como un resultado. La molécula que se une al antígeno que tiene un dominio Fc mutante no marcado compite con la molécula que se une al antígeno que comprende un dominio Fc de tipo silvestre para la interacción con el receptor Fc γ . La afinidad de unión relativa puede determinarse mediante la cuantificación de la reducción de fluorescencia como resultado de la competencia. Se conocen métodos para la biotinylation de los complejos de polipéptidos, como por ejemplo anticuerpos con sulfo-NHS-biotina u otros semejantes.

Entre los métodos apropiados para agregar la marca GST a un receptor Fc γ se incluyen métodos que suponen fusionar polipéptidos que codifican Fc γ y GST dentro del marco, que expresan el gen fusionado usando células introducidas con un vector que transporta el gen y seguidamente la purificación con columna de glutatión.

La señal inducida puede analizarse preferentemente, por ejemplo, mediante su ajuste a un modelo de competencia de un sitio con base en el análisis de regresión no lineal con un software como por ejemplo GRAPHPAD PRISM (GraphPad; San Diego).

Una de las sustancias para observar su interacción es inmovilizada es un ligando en la capa fina de oro de un chip detector. Cuando se ilumina en la superficie trasera de los chips detectores de modo que ocurra una reflexión total en la interfaz entre la capa fina de oro y el vidrio, la intensidad de la luz reflejada se reduce parcialmente en un cierto sitio (señal SPR).

La otra sustancia para observar su interacción como un analito

sobre la superficie de los chips detectores. La masa inmovilizada de la molécula de ligando se incrementa cuando el analito se une al ligando. Lo anterior altera el índice de refracción del solvente en la superficie del chip detector. El cambio en el índice de refracción causa un cambio de posición de la señal SPR (a la inversa, la disociación desplaza la señal de regreso a su posición original). En el sistema Biacore, la cantidad de desplazamiento descrito anteriormente (*es decir*, el cambio de masa en la superficie del chip detector) se traza sobre el eje vertical y por ende el cambio de masa en el tiempo aparece como datos medidos (sensograma). Se determinan los parámetros cinéticos (constante de velocidad de asociación (k_a) y la constante de velocidad de disociación (k_d)) a partir de la curva de sensograma y se determina la afinidad (K_D) de la relación entre estas dos constantes. Se usa la prueba de inhibición preferentemente en los métodos BIACORE. Los ejemplos de tal prueba de inhibición se describen en Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2006) 103(11), 4005-4010.

En el presente documento, "la actividad de unión a receptor $Fc\gamma$ " significa, por ejemplo, que con base en el método de análisis descrito anteriormente la actividad competitiva de un complejo de polipéptidos de prueba es 50% o inferior, preferentemente 45% o inferior, 40% o inferior, 35% o inferior, 30% o inferior, 20% o inferior o 15% o inferior y particularmente preferentemente 10% o inferior, 9% o inferior, 8% o inferior, 7% o inferior, 6% o inferior, 5% o inferior, 4% o inferior, 3% o

inferior, 2% o inferior o 1% o inferior que la actividad competitiva de un complejo de polipéptidos control.

Los complejos de polipéptidos que comprenden el dominio Fc de un anticuerpo monoclonal IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 pueden
5 usarse de manera apropiada como moléculas que se unen al antígeno de control. Las estructuras de dominio Fc se muestran en SEQ ID NO: 37 (A se agrega al N-terminal de Número de acceso de RefSeq AAC82527.1), 38 (A se agrega al N-terminal del Número de acceso de RefSeq AAB59393.1), 25 (A se agrega al N-terminal del Número
10 de acceso de RefSeq CAA27268.1) y 39 (A se agrega al N-terminal del Número de acceso de RefSeq AAB59394.1). Además, cuando se usa una molécula que se une al antígeno que comprende un dominio Fc mutante de un anticuerpo de un isotipo particular como una sustancia de prueba, el efecto de la mutación del mutante en la
15 actividad de unión al receptor Fc γ se evalúa usando como control una molécula que se une al antígeno que comprende un dominio Fc del mismo isotipo. Según se describe anteriormente, se preparan de manera apropiada los complejos de polipéptidos que comprenden un dominio Fc mutante cuya actividad de unión a receptor Fc γ se
20 juzga reducida.

Tales mutantes conocidos incluyen, por ejemplo, mutantes que tienen una eliminación de aminoácidos 231A-238S (Numeración EU) (WO 2009/011941), así como mutantes C226S, C229S, P238S, (C220S) (J. Rheumatol (2007) 34, 11); C226S y C229S (Hum.
25 Antibod. Hybridomas (1990) 1(1), 47-54); C226S, C229S, E233P,

L234V y L235A (Blood (2007) 109, 1185-1192).

Específicamente, las moléculas que se unen al antígeno preferidas que comprenden un dominio Fc con una sustitución del aminoácido en la posición 220, 226, 229, 231, 232, 233, 234, 235, 5 236, 237, 238, 239, 240, 264, 265, 266, 267, 269, 270, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 325, 327, 328, 329, 330, 331 o 332 (Numeración EU) en los aminoácidos que forman el dominio Fc de un anticuerpo de un isotipo particular. El isotipo de anticuerpo a partir del cual se origina el dominio Fc apropiado derivado de un anticuerpo 10 monoclonal IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. Es preferible usar dominios Fc derivados de anticuerpos IgG1.

Las moléculas que se unen al antígeno preferidas incluyen, por ejemplo, aquellos que comprenden un dominio Fc el cual tiene cualquiera de las sustituciones que se muestran más adelante, 15 cuyas posiciones se especifican de conformidad con la Numeración EU (cada número representa una posición de residuos de aminoácido en la Numeración EU; y el símbolo de aminoácido de una letra antes del número representa el residuo de aminoácido antes de la sustitución, mientras que el símbolo de aminoácido de una letra 20 después del número representa el residuo de aminoácido antes de la sustitución) en los aminoácidos que forman el dominio Fc del anticuerpo IgG1:

(a) L234F, L235E, P331S;

(b) C226S, C229S, P238S;

25 (c) C226S, C229S; o

(d) C226S, C229S, E233P, L234V, L235A;

(e) L234A, L235A o L235R, N297A;

(f) L235A o L235R, S239K, N297A

así como aquellos que tienen un dominio Fc el cual tiene
 5 una eliminación de la secuencia de aminoácidos en las posiciones
 231 a 238.

Además, las moléculas que se unen al antígeno preferidas
 también incluyen aquellas que comprenden un dominio Fc que tiene
 cualquiera de las sustituciones que se muestran más adelante,
 10 cuyas posiciones se especifican de conformidad con la Numeración
 EU en los aminoácidos que forman el dominio Fc de un anticuerpo
 IgG2:

(g) H268Q, V309L, A330S y P331S;

(h) V234A;

15 (i) G237A;

(j) V234A y G237A;

(k) A235E y G237A; o

(l) V234A, A235E y G237A. Cada número representa la
 posición de residuos de aminoácido en la Numeración EU; y el
 20 símbolo de aminoácido de una letra antes del número representa
 el residuo de aminoácido antes de la sustitución, mientras que
 el símbolo de aminoácido de una letra después del número representa
 el residuo de aminoácido antes de la sustitución.

Además, las moléculas que se unen al antígeno preferidas
 25 también incluyen aquellas que comprenden un dominio Fc que tiene

cualquiera de las sustituciones que se muestran más adelante, cuyas posiciones se especifican de conformidad con la Numeración EU en los aminoácidos que forman el dominio Fc de un anticuerpo IgG3:

5 (m) F241A;

(n) D265A;

(o) V264A. Cada número representa la posición de residuos de aminoácido en la Numeración EU; y el símbolo de aminoácido de una letra antes del número representa el residuo de aminoácido antes de la sustitución, mientras que el símbolo de aminoácido de una letra después del número representa el residuo de aminoácido antes de la sustitución.

Además, las moléculas que se unen al antígeno preferidas también incluyen aquellas que comprenden un dominio Fc que tiene cualquiera de las sustituciones que se muestran más adelante, cuyas posiciones se especifican de conformidad con la Numeración EU en los aminoácidos que forman el dominio Fc de un anticuerpo IgG4:

(p) L235A, G237A y E318A;

20 (q) L235E; o

(r) F234A y L235A. Cada número representa la posición de residuos de aminoácido en la Numeración EU; y el símbolo de aminoácido de una letra antes del número representa el residuo de aminoácido antes de la sustitución, mientras que el símbolo de aminoácido de una letra después del número representa el residuo

de aminoácido antes de la sustitución.

Los otros complejos de polipéptidos preferidos incluyen, por ejemplo, aquellos que comprenden un dominio Fc en el cual cualquier aminoácido en la posición 233, 234, 235, 236, 5 237, 327, 330 o 331 (Numeración EU) en los aminoácidos que forman el dominio Fc de un anticuerpo IgG1 es sustituido con un aminoácido de la posición correspondiente en la Numeración EU en el correspondiente IgG2 o IgG4.

Las moléculas que se unen al antígeno preferidas también 10 incluyen, por ejemplo, aquellas que comprenden un dominio Fc en el cual cualesquiera uno o más de los aminoácidos en las posiciones 234, 235 y 297 (Numeración EU) en los aminoácidos que forman el dominio Fc de un anticuerpo IgG1 es sustituido con otros aminoácidos. El tipo de aminoácido después de la sustitución no 15 está particularmente limitado; sin embargo, se prefieren particularmente los complejos de polipéptidos que comprenden un dominio Fc en el cual cualesquiera uno o más de los aminoácidos en las posiciones 234, 235 y 297 son sustituidos con la alanina.

Las moléculas que se unen al antígeno preferidas también 20 incluyen, por ejemplo, aquellas que comprenden un dominio Fc en el cual un aminoácido en la posición 265 (Numeración EU) en los aminoácidos que forman el dominio Fc de un anticuerpo IgG1 es sustituido con otro aminoácido. El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se 25 prefieren particularmente las moléculas que se unen al antígeno

que comprenden un dominio Fc en el cual un aminoácido en la posición 265 es sustituido con la alanina.

Molécula multiespecífica de unión al antígeno

Ejemplos de una modalidad preferida de la “molécula multiespecífica de unión al antígeno” de la presente invención incluye anticuerpos multiespecíficos. Cuando una región Fc con actividad reducida de unión al receptor Fc γ se usa como región Fc de anticuerpo multiespecíficos, una región Fc derivada del anticuerpo multiespecífico se puede usar apropiadamente. Los anticuerpos biespecíficos son particularmente preferidos como anticuerpos multiespecíficos de la presente invención. En este caso, un anticuerpo biespecífico es un anticuerpo que tiene dos diferentes especificidades. Los anticuerpos biespecíficos tipo IgG pueden ser secretados de un hibridoma híbrido (cuadroma) producido fusionando dos tipos de hibridomas que producen anticuerpos IgG (Milstein et al., Nature (1983) 305, 537-540).

Además, los anticuerpos biespecíficos tipo IgG son secretados introduciendo los genes de cadenas L y cadenas H que constituyen dos tipos de IgGs de interés, es decir, un total de cuatro genes, en las células y que las co-expresan. Sin embargo, el número de combinaciones de las cadenas H y L de IgG que pueden ser producidas por estos métodos es teóricamente de diez combinaciones. Por lo tanto, es difícil purificar un IgG que comprende la combinación deseada de cadenas H y L de diez tipos de IgGs. Además, teóricamente la cantidad de secreción del IgG

que tiene la combinación deseada puede disminuir notablemente, y por lo tanto el cultivo a gran escala será necesario, y los costos de producción se incrementarían adicionalmente.

Por lo tanto, las técnicas para promover la asociación
5 entre las cadenas H y entre las cadenas L y H que tienen las combinaciones deseadas pueden ser aplicadas a las moléculas multiespecíficas que se unen al antígeno de la presente invención.

Por ejemplo, las técnicas para suprimir la asociación de la cadena H no deseada introduciendo repulsión electrostática
10 en la interfaz de la segunda región constante o la tercera región constante de la cadena H del anticuerpo (CH2 o CH3) puede ser aplicada a la asociación del anticuerpo multiespecífico (W02006/106905).

En la técnica de suprimir la asociación de la cadena
15 H involuntaria introduciendo repulsión electrostática en la interfaz de CH2 o CH3, ejemplos de residuos de aminoácido en contacto en la interfaz de la otra región constante de la cadena H incluye regiones que corresponden a los residuos en las posiciones 356, 439, 357, 370, 399 y 409 en la numeración EU de
20 la región CH3.

Más específicamente, los ejemplos incluyen un anticuerpo que comprende dos tipos de regiones CH3 de la cadena H, en las cuales uno a tres pares de residuos de aminoácido en la primera región CH3 de la cadena H seleccionada de los pares
25 de residuos de aminoácido indicados en (1) a (3) a continuación,

portando el mismo tipo de carga: (1) residuos de aminoácido comprendidos en la región CH3 de la cadena H en las posiciones 356 y 439 de la numeración EU; (2) residuos de aminoácido comprendidos en la región CH3 de la cadena H en las posiciones 357 y 370 de la numeración EU; y (3) residuos de aminoácido comprendidos en la región CH3 de la cadena H en las posiciones 399 y 409 de la numeración EU.

Además, el anticuerpo puede ser un anticuerpo en tales pares de los residuos de aminoácido en la segunda región CH3 de la cadena H la cual es diferente de la primera región CH3 de la cadena H mencionadas anteriormente, se seleccionan de los pares antes mencionados de residuos de aminoácido de (1) a (3), en donde uno de los tres pares de residuos de aminoácido que corresponde a los pares antes mencionados de residuos de aminoácido de (1) a (3) portando el mismo tipo de cargas en la primera región CH3 de la cadena H mencionada anteriormente portando cargas opuestas de los residuos de aminoácido correspondientes en la primera región CH3 de la cadena H mencionada anteriormente.

Cada uno de los aminoácidos indicados en (1) a (3) anteriormente llega a cerrarse entre sí durante la asociación. Aquellos expertos en la técnica pueden encontrar posiciones que corresponden a los residuos de aminoácido mencionados anteriormente de (1) a (3) en una región CH3 de la cadena H deseada o región constante de la cadena H por modelado de homología y como tal usando el software comercialmente disponible, y residuos de

aminoácido de estas posiciones pueden ser apropiadamente sometidas a modificación.

En los anticuerpos mencionados anteriormente, los “residuos de aminoácido cargados” son preferiblemente
5 seleccionados, por ejemplo, de residuos de aminoácido incluidos en cualquiera de uno de los siguientes grupos:

- (a) ácido glutámico (E) y ácido aspártico (D); y
- (b) lisina (K), arginina (R); e histidina (H).

En los anticuerpos mencionados anteriormente, la frase
10 “que porta la misma carga” significa, por ejemplo, que todos los dos o más de residuos de aminoácido se seleccionan de los residuos de aminoácidos incluidos en cualquiera de uno de los grupos (a) y (b) mencionados anteriormente. La frase “que porta cargas opuestas” significa, por ejemplo, que cuando al menos uno de los
15 residuos de aminoácido entre dos o más residuos de aminoácido se seleccionan de los residuos de aminoácido incluidos en cualquiera de uno de los grupos de (a) y (b) mencionados anteriormente, los restantes residuos de aminoácido se seleccionan de los residuos de aminoácido incluidos en el otro grupo.

20 En una modalidad preferida, los anticuerpos mencionados anteriormente pueden tener su primera región CH3 de la cadena H y la segunda región CH3 de la cadena H reticulada por enlaces de disulfuro.

En la presente invención, los residuos de aminoácido
25 sometidos a modificación no se limitan a los residuos de aminoácido

mencionados anteriormente de las regiones variables del anticuerpo o regiones constantes del anticuerpo. Aquellos expertos en la técnica pueden identificar los residuos de aminoácido que forman una interfaz en polipéptidos mutantes o
5 heteromultímeros por modelado de homología y como tal usando el software comercialmente disponible; y residuos de aminoácido de estas posiciones pueden entonces ser sometidos a modificación para regular la asociación.

Otras técnicas conocidas también se pueden usar para
10 la asociación de anticuerpos multiespecíficos de la presente invención. Los polipéptidos que contienen la región Fc que comprenden diferentes aminoácidos pueden estar eficientemente asociados entre sí sustituyendo una cadena lateral de aminoácido presente en una de las regiones Fc de la cadena H del anticuerpo
15 con una cadena lateral grande (botón), y sustituyendo la cadena lateral de aminoácido presente en la región Fc correspondiente de la otra cadena H con una cadena lateral más pequeña (ojal) para permitir la colocación del botón dentro del ojal (W01996/027011; Ridgway JB *et al.*, Protein Engineering (1996) 9, 617-621; Merchant
20 A. M. *et al.* Nature Biotechnology (1998) 16, 677-681; y US20130336973).

Además, otras técnicas conocidas también se pueden usar para la formación de anticuerpos multiespecíficos de la presente invención. La asociación de polipéptidos que tienen diferentes
25 secuencias puede ser inducidos eficientemente por asociación

complementaria de CH3 usando un dominio de CH3 diseñado por ingeniería de intercambio de hebra producido cambiando la parte de uno de los CH3 de la cadena H de un anticuerpo a una secuencia derivada de IgA correspondiente e introduciendo una secuencia derivada de IgA correspondiente en la porción de complementariedad de otro CH3 de la cadena H (Protein Engineering Design & Selection, 23; 195-202, 2010). Esta técnica conocida puede también ser usada para eficientemente formar anticuerpos multiespecíficos de interés.

Además, las técnicas para la producción del anticuerpo usando asociación del anticuerpo CH1 y CL y asociación de VH y VL como se describe en los documentos W0 2011/028952, W02014/018572 y Nat Biotechnol. 2014 Feb; 32(2):191-8; tecnologías para producir anticuerpos biespecíficos usando anticuerpos monoclonales preparados separadamente en combinación (Intercambio de Rama Fab) como se describe en los documentos W02008/119353 y W02011/131746; tecnologías para regular la asociación entre los CH3 de cadena pesada del anticuerpo como se describe en W02012/058768 y W02013/063702; tecnologías para producir anticuerpos biespecíficos compuestos de dos tipos de cadenas ligeras y un tipo de cadena pesada como se describe en W02012/023053; tecnologías para producir anticuerpos biespecíficos usando dos cepas de célula bacteriana que individualmente expresan una de las cadenas de un anticuerpo que comprende una cadena H singlete y una cadena L singlete como se

describe por Christoph *et al.* (Nature Biotechnology Vol. 31, p 753-758 (2013)); y tal se puede usar para la formación de anticuerpos multiespecíficos.

Alternativamente, aún cuando un anticuerpo multiespecífico de interés no puede ser formado eficientemente, un anticuerpo multiespecífico de la presente invención puede ser obtenido separando y purificando el anticuerpo multiespecífico de interés de los anticuerpos producidos. Por ejemplo, un método para permitir la purificación de dos tipos de formas homoméricas y el anticuerpo heteromérico de interés por cromatografía de intercambio iónico impartiendo una diferencia en puntos isoeléctricos introduciendo sustituciones de aminoácido en las regiones variables de los dos tipos de cadenas H que se han reportado (W02007114325). Hasta la fecha, ya que un método para purificar anticuerpos heteroméricos, los métodos usando la Proteína A para purificar un anticuerpo heterodimérico que comprende una cadena IgG2a de ratón que se une a la Proteína A y una cadena H de IgG2b de rata que no se une a la Proteína A se ha reportado (W098050431 y W095033844). Además, un anticuerpo heterodimérico puede ser purificado eficientemente por su propia cuenta usando las cadenas H que comprende la sustitución de residuos de aminoácido en las posiciones 435 y 436 de la numeración EU, el cual es un sitio de unión a la Proteína A de IgG, con Tyr, His o tales son aminoácidos que proporcionan una afinidad de la Proteína A diferente, o usando cadenas H con una afinidad de

proteína A diferentes obtenidas de conformidad con el método del Ejemplo de Referencia 5, para cambiar la interacción de cada una de las cadenas H con la Proteína A, y después usar una columna de la Proteína A.

5 Alternativamente, una cadena L común que puede proporcionar capacidad de unión a una pluralidad de diferentes cadenas H puede ser obtenida y usada como la cadena L común de un anticuerpo multiespecífico. La expresión eficiente de un IgG multiespecífico puede ser lograda introduciendo los genes de tal
10 cadena L común y una pluralidad de diferentes cadenas H en células para expresar el IgG (Nature Biotechnology (1988) 16, 677-681). Un método para seleccionar una cadena L común que muestra una fuerte capacidad de unión a cualquiera de las diferentes cadenas H pueden también ser usadas cuando se selecciona de la cadena H
15 común (WO 2004/065611).

 Además, una región Fc cuya heterogeneidad de C terminal de la región Fc ha sido mejorada puede ser apropiadamente usada como una región Fc de la presente invención. Más específicamente, la presente invención proporciona regiones Fc producidos por
20 suprimir glicina en la posición 446 y lisina en posición 447 como se especifica por la numeración de EU de las secuencias de aminoácido de dos polipéptidos que constituyen una región Fc derivada de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.

 Una pluralidad, tal como dos o más, de estas tecnologías
25 pueden ser usadas en combinación. Además, estas tecnologías pueden

ser apropiadamente o separadamente aplicadas a las dos cadenas H a ser asociadas. Además, estas técnicas pueden ser usadas en combinación con la región Fc antes mencionada las cuales han reducido la actividad de unión a un receptor Fc γ . Además, una
5 molécula que se une al antígeno de la presente invención puede ser una molécula producida separadamente de manera que tenga la misma secuencia de aminoácido, con base a la molécula que se une al antígeno sometida a las modificaciones descritas anteriormente.

10 Una molécula multiespecífica que se une al antígeno apropiada de la presente invención comprende (1) un dominio que comprende una región variable del anticuerpo que tiene actividad de unión a glipicano-3; (2) un dominio que comprende una región variable del anticuerpo que tiene actividad de unión al complejo
15 del receptor de la célula T; y (3) un dominio que comprende una región Fc con una actividad de unión al receptor Fc γ reducida mencionada anteriormente, sin limitación a su estructura.

En la presente invención, cada uno de los dominios mencionados anteriormente puede estar unidos directamente por
20 enlaces de péptido. Por ejemplo, cuando se usa F(ab')₂ como el dominio que comprende una región variable del anticuerpo de (1) y (2), y estas regiones Fc como el dominio que comprende una región Fc con actividad de unión al receptor Fc γ reducida de (3), los polipéptidos formados enlazando los dominios que contienen la
25 región variable del anticuerpo de (1) y (2) y el dominio que

contiene la región Fc de (3) por uniones del péptido puede formar una estructura del anticuerpo. Tales anticuerpos pueden ser producidos por purificación del medio de cultivo de hibridoma mencionado anteriormente, y también purificando anticuerpos del
5 medio de cultivo de las células hospederas deseadas que establemente portan polinucleótidos que codifican los polipéptidos que constituyen el anticuerpo.

Ejemplos de una región variable de cadena H del anticuerpo preferida de la presente invención contiene una región
10 variable del anticuerpo que tiene actividad de unión a glipicano-3 que comprende las regiones variables de cadena H del anticuerpo en la Tabla 1, o regiones variables de cadena H del anticuerpo que tienen secuencias H cuyas secuencias de aminoácido CDR1, CDR2 y CDR3 son las mismas como las secuencias de aminoácido CDR1, CDR2
15 y CDR3 contenidas en las regiones variables de cadena H de la Tabla 1, o regiones variables de cadena H del anticuerpo las cuales son funcionalmente equivalentes a las regiones variables antes mencionadas.

Tabla 1

Nombre de Secuencia	SEQ ID NO:	Nombre de Secuencia	SEQ ID NO:
H0000	40	GCH042	193
GCH003	170	GCH043	194
GCH005	171	GCH045	195
GCH006	172	GCH053	196
GCH007	173	GCH054	197
GCH008	174	GCH055	198
GCH010	175	GCH056	199
GCH012	176	GCH057	200
GCH013	177	GCH059	201
GCH014	178	GCH060	202
GCH015	179	GCH061	203
GCH016	180	GCH062	204
GCH019	181	GCH064	205
GCH022	182	GCH065	206
GCH023	183	GCH066	207
GCH025	184	GCH067	208
GCH026	185	GCH068	209
GCH027	186	GCH073	210
GCH029	187	GCH094	211
GCH032	188	GCH098	212
GCH034	189	GCH099	213
GCH035	190	GCH100	214
GCH039	191	H0610	215
GCH040	192		

Ejemplos de una región variable del anticuerpo preferido que tiene una actividad de unión al complejo del receptor de la célula T de la presente invención incluye regiones variables del anticuerpo que tienen actividad de unión al receptor de la célula T. De los receptores de la célula T, el CD3 es preferido, y el CD3 ϵ es particularmente preferido. Ejemplos de una región

variable de cadena H del anticuerpo contenida en tales regiones variables del anticuerpo incluyen las regiones variables de cadena H del anticuerpo de la Tabla 2, las regiones variables de cadena H del anticuerpo que tienen
5 secuencias CDR cuyas secuencias de aminoácido CDR1, CDR2 y CDR3 son las mismas como las secuencias de aminoácido de CDR1, CDR2 y CDR3 contenidas en las regiones variables de cadena H del anticuerpo de la Tabla 2, y regiones variables de cadena H del anticuerpo que son
10 funcionalmente equivalentes a las regiones variables antes mencionadas.

Tabla 2

5	Nombre de Secuencia	SEQ ID NO:	Nombre de Secuencia	SEC ID NO:	Nombre de Secuencia	SEC ID NO:
	hCE115HA	52	TR01H036	99	TR01H074	135
	CE115HA177	64	TR01H037	100	TR01H075	136
	CE115HA178	65	TR01H038	101	TR01H076	137
	CE115HA179	66	TR01H039	102	TR01H077	138
10	CE115HA180	67	TR01H040	103	TR01H079	139
	hCE115HAa	68	TR01H041	104	TR01H080	140
	TR01H006	69	TR01H042	105	TR01H081	141
	TR01H007	70	TR01H043	106	TR01H082	142
	TR01H008	71	TR01H044	107	TR01H083	143
15	TR01H009	72	TR01H045	108	TR01H084	144
	TR01H010	73	TR01H046	109	TR01H090	145
	TR01H011	74	TR01H047	110	TR01H091	146
	TR01H012	75	TR01H048	111	TR01H092	147
	TR01H013	76	TR01H049	112	TR01H093	148
20	TR01H014	77	TR01H050	113	TR01H094	149
	TR01H015	78	TR01H051	114	TR01H095	150
	TR01H016	79	TR01H052	115	TR01H096	151
	TR01H017	80	TR01H053	116	TR01H097	152
	TR01H018	81	TR01H054	117	TR01H098	153
25	TR01H019	82	TR01H055	118	TR01H099	154
	TR01H020	83	TR01H056	119	TR01H100	155
	TR01H021	84	TR01H057	120	TR01H101	156
	TR01H022	85	TR01H058	121	TR01H102	157
	TR01H023	86	TR01H061	122	TR01H103	158
	TR01H024	87	TR01H062	123	TR01H104	159
	TR01H025	88	TR01H063	124	TR01H105	160
	TR01H026	89	TR01H064	125	TR01H106	161
	TR01H027	90	TR01H065	126	TR01H107	162
	TR01H028	91	TR01H066	127	TR01H108	163
	TR01H029	92	TR01H067	128	TR01H109	164
	TR01H030	93	TR01H068	129	TR01H110	165
	TR01H031	94	TR01H069	130	TR01H111	166
	TR01H032	95	TR01H070	131	TR01H112	167
	TR01H033	96	TR01H071	132	TR01H113	168
	TR01H034	97	TR01H072	133	TR01H114	169
	TR01H035	98	TR01H073	134	TR01H001	420
					TR01H002	421
					TR01H003	422
					TR01H004	423
					rCE115H	424
					CE115HA121	425
					CE115HA122	426
					CE115HA124	427
					CE115HA192	428
					CE115HA236	429
					CE115HA251	430
					CE115HA252	431

La relación entre las regiones CDR y los residuos de aminoácido que constituye la secuencia de aminoácido de cadena H del anticuerpo y la numeración Kabat es como se muestra en las Figs. 13a-13b.

5 Para las regiones variables de cadena L del anticuerpo contenidas en la región variable del anticuerpo que tiene actividad de unión al glipicano-3 y la región variable del anticuerpo que tiene actividad de unión al complejo del receptor de la célula T de la presente invención, es preferible para obtener una cadena L común
10 que puede proporcionar una actividad de unión a la cadena H que tiene actividad de unión al glipicano-3 y una actividad de unión a la cadena H que tiene el complejo del receptor de la célula T, y para usar esto como la región variable de cadena L común de la molécula multiespecífica que se une al antígeno.

15 Ejemplos de la región variable de cadena L común para ser usada en la presente invención incluye las regiones variables de cadena L de la Tabla 3, las regiones variables de cadena L del anticuerpo que tienen secuencias CDR cuyas secuencias de aminoácido CDR1, CDR2 y CDR3 son las mismas como las secuencias
20 de aminoácido CDR1, CDR2 y CDR3 contenidas en las regiones variables de cadena L del anticuerpo de la Tabla 3, y las regiones variables de cadena L del anticuerpo que son funcionalmente equivalentes a las regiones variables antes mencionadas.

Tabla 3

5	Nombre de Secuencia		SEQ ID NO:	Nombre de Secuencia		SEQ ID NO:	Nombre de Secuencia		SEQ ID NO:	
	L0000		53	L0125		264	L0214		312	
	L0002		217	L0126		265	L0215		313	
	L0003		218	L0127		266	L0216		314	
	L0006		219	L0129		267	L0217		315	
	L0007		220	L0132		268	L0218		316	
	L0008		221	L0134		269	L0219		317	
	L0009		222	L0136		270	L0220		318	
	L0011		223	L0137		271	L0222		319	
	L0012		224	L0138		272	L0223		320	
	L0013		225	L0139		273	L0224		321	
	L0014		226	L0140		274	L0226		322	
	L0015		227	L0141		275	L0227		323	
	L0016		228	L0143		276	L0228		324	
	L0032		229	L0144		277	L0229		325	
	10	L0038		230	L0145		278	L0230		326
L0039		231	L0147		279	L0231		327		
L0041		232	L0148		280	L0232		328		
L0042		233	L0149		281	L0233		329		
L0043		234	L0151		282	L0234		330		
L0044		235	L0152		283	L0235		331		
L0045		236	L0154		284	L0236		332		
L0046		237	L0155		285	L0237		333		
L0047		238	L0157		286	L0238		334		
L0062		239	L0160		287	L0239		335		
L0063		240	L0161		288	L0240		336		
L0064		241	L0163		289	L0241		337		
L0065		242	L0167		290	L0242		338		
L0066		243	L0168		291	L0243		339		
L0069		244	L0173		292	L0246		340		
15		L0075		245	L0175		293	L0247		341
	L0079		246	L0180		294	L0248		342	
	L0082		247	L0181		295	L0249		343	
	L0085		248	L0186		296	L0250		344	
	L0089		249	L0187		297	L0258		345	
	L0090		250	L0200		298	L0259		346	
	L0091		251	L0201		299	L0260		347	
	L0093		252	L0202		300	L0261		348	
	L0104		253	L0203		301	L0262		349	
	L0106		254	L0204		302	L0263		350	
	L0107		255	L0205		303	L0264		351	
	L0109		256	L0206		304	L0265		352	
	L0113		257	L0207		305	L0266		353	
	L0115		258	L0208		306	L0267		354	
	L0117		259	L0209		307	L0268		355	
	20	L0120		260	L0210		308	L0269		356
L0122		261	L0211		309	L0270		357		
L0123		262	L0212		310	L0271		358		
L0124		263	L0213		311	L0272		359		
25										

La relación entre las regiones CDR de los residuos de aminoácido que constituye la secuencia de aminoácido de cadena L del anticuerpo y numeración Kabat es como se muestra en la Fig. 14.

5 En la presente invención, la frase “funcionalmente equivalente” significa que las afinidades de unión para un antígeno son equivalentes, o alternativamente, significa que las actividades citotóxicas contra las células que expresan glipicano-3 o tejidos que contienen estas células son equivalentes
10 cuando se usan como una molécula multiespecífica que se une al antígeno. La afinidad de unión y actividad citotóxica pueden ser medidas con base a la descripción en la presente. Las células usadas para medición de actividad citotóxica pueden ser las células deseadas que expresan GPC3 o un tejido deseado que contiene
15 estas células, y por ejemplo, se pueden usar PC-10 o NCI-H446 las cuales son líneas de célula de cáncer humano que expresa GPC3. Con respecto a las regiones constantes del anticuerpo, la frase puede significar que la disminución en la actividad de unión del receptor $Fc\gamma$ son equivalentes.

20 Por ejemplo, una región variable de cadena H del anticuerpo funcionalmente equivalente a la región variable de cadena H del anticuerpo descrita en la presente (es decir, la región variable de cadena H original) significa que esta región tiene la misma afinidad de unión cuando se combina con la región
25 variable de cadena L del anticuerpo descrita en la presente la

cual forma un par con la cadena H original, o alternativamente de la región que tiene la misma actividad citotóxica hacia las células que expresan glipicano-3 o un tejido que contiene estas células cuando se usa para una molécula multiespecífica que se une al antígeno. Además, una región variable de cadena L del anticuerpo funcionalmente equivalente a la región variable de cadena L del anticuerpo descrita en la presente (es decir, la región variable de cadena L original) significa que esta región tiene la misma afinidad de unión cuando se combina con la región variable de cadena H del anticuerpo descrita en la presente la cual forma un par con la cadena L original, o alternativamente la región que tiene la misma actividad citotóxica hacia células que expresan glipicano-3 o un tejido que contiene estas células cuando se usa para una molécula multiespecífica que se une al antígeno.

El término "equivalente" no necesariamente tiene que significar el mismo grado de actividad, y la actividad puede ser mejorada. Específicamente, para la afinidad de unión al antígeno, los ejemplos incluyen el caso en donde el valor (valor KD/valor KD precursor) obtenido por comparación a la afinidad de unión de la región variable del anticuerpo que sirve como el control (valor KD precursor) es 1.5 o menor. El valor del valor KD/valor KD precursor es preferiblemente 1.3 o menor, más preferiblemente 1.2 o menor, 1.1 o menor, 1.0 o menor, 0.9 o menor, 0.8 o menor, 0.7 o menor, 0.6 o menor, o 0.5 o menor. Mientras no existe límite

inferior, los ejemplos incluyen 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} o 10^{-6} . Más específicamente, en la presente invención, el valor del valor KD/valor KD precursor es preferiblemente 10^{-6} o 1.5×10^{-0} , más preferiblemente 10^{-6} a 10^{-1} , aún más preferiblemente 10^{-6} a 10^{-2} ,
5 y aún más preferiblemente 10^{-6} a 10^{-3} . Para actividad citotóxica, los ejemplos incluyen el caso en donde el valor (velocidad de inhibición del crecimiento de la celular/velocidad de inhibición del crecimiento de la célula precursora) obtenido por comparación a la velocidad de inhibición del crecimiento de la célula de la
10 molécula multiespecífica que se une al antígeno que sirve como el control (velocidad de inhibición de crecimiento de la célula precursora) es 0.7 o más. La concentración de la molécula multiespecífica que se une al antígeno puede ser determinada apropiadamente, pero es preferiblemente, por ejemplo, 0.01 nM,
15 0.05 nM, 0.1 nM, 0.5 nM o 1 nM; y preferiblemente, se toman las mediciones a 0.05 nM o 0.1 nM. El valor la velocidad de inhibición del crecimiento de la célula/velocidad de inhibición del crecimiento de la célula precursora es preferiblemente 0.8 o mayor, más preferiblemente 0.9 o mayor, 1.0 o mayor, 1.2 o mayor,
20 1.5 o mayor, 2 o mayor, 3 o mayor, 5 o mayor, 10 o mayor, o 20 o mayor. Mientras no existe límite superior, el valor puede ser 10, 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 o 10^6 .

Además, para actividad citotóxica, los ejemplos incluyen el caso en donde el valor (concentración para 50% de
25 inhibición del crecimiento celular/concentración del precursor

para 50% de inhibición del crecimiento celular) obtenido por comparación a la concentración de la molécula multiespecífica que se une al antígeno para 50% de inhibición del crecimiento de la célula (concentración del precursor para 50% de inhibición del crecimiento de la célula) es 1.5 o menor. La concentración para 50% de inhibición de crecimiento se refiere a la concentración de la molécula multiespecífica que se une al antígeno necesariamente para reducir la relación de proliferación de la célula a una mitad comparada cuando la molécula multiespecífica que se une al antígeno no se agrega. El valor de "concentración para 50% de inhibición del crecimiento de la célula/concentración del precursor para 50% de inhibición del crecimiento de la célula" es preferiblemente 1.3 o menor, más preferiblemente 1.2 o menor, 1.1 o menor, 1.0 o menor, 0.9 o menor, 0.8 o menor, 0.7 o menor, 0.6 o menor, o 0.5 o menor. Mientras no existe límite inferior, el valor puede ser, por ejemplo 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} o 10^{-6} . Específicamente, el valor es preferiblemente 10^{-6} a 1.5×10^{-0} , más preferiblemente 10^{-6} a 10^{-1} , aún más preferiblemente 10^{-6} a 10^{-2} , y aún todavía más preferiblemente 10^{-6} a 10^{-3} .

Con respecto al dominio que comprende una región variable del anticuerpo que tiene actividad de unión al GPC3, el valor KD hacia GPC3 (por ejemplo, GPC3 humano) puede ser, por ejemplo, 5×10^{-9} M o menor, preferiblemente 4×10^{-9} M o menor, tal como 3×10^{-9} M o menor, 2×10^{-9} M o menor, 1×10^{-9} M o menor, 8×10^{-10} M o menor, 5×10^{-10} M o menor, 4×10^{-10} M o menor, 3×10^{-10} M o menor, 2×10^{-10} M o menor,

1×10^{-10} M o menor, 8×10^{-11} M o menor, 5×10^{-11} M o menor, 4×10^{-11}
 M o menor, 3×10^{-11} M o menor, 2×10^{-11} M o menor, 1×10^{-11} M o menor,
 8×10^{-12} M o menor, 5×10^{-12} M o menor, 4×10^{-12} M o menor, 3×10^{-12}
 M o menor, 2×10^{-12} M o menor, 1×10^{-12} M o menor, 8×10^{-13} M o menor,
 5 5×10^{-13} M o menor, 4×10^{-13} M o menor, 3×10^{-13} o menor, 2×10^{-13} M
 o menor, o 1×10^{-13} M o menor.

Con respecto al dominio que comprende una región variable
 del anticuerpo que tiene actividad de unión al complejo del receptor
 de la célula T, el valor KD hacia un complejo del receptor de la célula
 10 T humana tal como un receptor de la célula T humana, o más
 específicamente por ejemplo CD3 ϵ humano puede ser, por ejemplo, 2
 $\times 10^{-7}$ M o menor, preferiblemente 1.5×10^{-7} M o menor, tal como 1.4
 $\times 10^{-7}$ M o menor, 1.3×10^{-7} M o menor, 1.2×10^{-7} M o menor, 1×10^{-7}
 M o menor, 3×10^{-8} M o menor, 2×10^{-8} M o menor, 1×10^{-8} M o menor,
 15 8×10^{-9} M o menor, 5×10^{-9} M o menor, 4×10^{-9} M o menor, 3×10^{-9}
 M o menor, 2×10^{-9} M o menor, 1×10^{-9} M o menor, 8×10^{-10} M o menor,
 5×10^{-10} M o menor, 4×10^{-10} M o menor, 3×10^{-10} M o menor, 2×10^{-10}
 M o menor, 1×10^{-10} M o menor, 8×10^{-11} M o menor, 5×10^{-11} M o menor,
 4×10^{-11} M o menor, 3×10^{-11} M o menor, 2×10^{-11} M o menor, 1×10^{-11}
 20 M o menor, 8×10^{-12} M o menor, 5×10^{-12} M o menor, 4×10^{-12} M o menor,
 3×10^{-12} M o menor, 2×10^{-12} M o menor, 1×10^{-12} M o menor.

Las moléculas multiespecíficas que se unen al antígeno
 de la presente invención preferiblemente tiene valores KD hacia
 GPC3 humano y complejo del receptor de la célula T (por ejemplo,
 25 cadena CD3 ϵ humana) que son 5×10^{-9} M o menor y 2×10^{-7} M o menor,

respectivamente, y más preferiblemente 1×10^{-9} M o menor y 5×10^{-8} M o menor, respectivamente.

En la presente invención, las regiones variables del anticuerpo que son "funcionalmente equivalente" no son particularmente limitadas siempre y cuando sean cadena H del anticuerpo y/o regiones variables de cadena L del anticuerpo que satisfacen las condiciones descritas anteriormente. Ejemplos de tales regiones variables del anticuerpo incluyen regiones producidas introduciendo sustitución, supresión, adición y/o inserción de uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o 10 aminoácidos) en las secuencias de aminoácido de las regiones variables de las Tablas 1 a 3 mencionadas anteriormente. Un método bien conocido por aquellos expertos en la técnica para introducir una o más sustituciones, supresiones, adiciones y/o inserciones de aminoácido en una secuencia de aminoácido es un método para introducir mutaciones en las proteínas. Por ejemplo, aquellos expertos en la técnica pueden preparar regiones variables que son funcionalmente equivalentes a las regiones variables del anticuerpo que tiene las funciones antes mencionadas introduciendo apropiadamente mutaciones en secuencias de aminoácido usando métodos tales como mutagénesis dirigida al sitio (Hashimoto-Gotoh, T., Mizuno, T., Ogasahara, Y., and Nakagawa, M. (1995) An oligodeoxyribonucleotide-directed dual amber method for site-directed mutagenesis. *Gene* 152, 271-275; Zoller, M.J., and Smith, M. (1983) Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA

fragments cloned into M13 vectors. *Methods Enzymol.* 100, 468-500; Kramer, W., Drutsa, V., Jansen, H.W., Kramer, B., Pflugfelder, M., and Fritz, H.J. (1984) The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction. *Nucleic Acids Res.* 12, 9441-9456; Kramer, W., and Fritz, H.J. (1987) Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex ADN *Methods. Enzymol.* 154, 350-367; and Kunkel, T.A. (1985) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc Natl Acad. Sci U S A.* 82, 488-492).

10 Cuando un residuo de aminoácido es alterado, el aminoácido es preferiblemente mutado en un diferente aminoácido que conserva las propiedades de la cadena lateral de aminoácido. Ejemplos de las propiedades de la cadena lateral de aminoácido son: aminoácidos hidrofóbicos (A, I, L, M, F, P, W, Y y V),
 15 aminoácidos hidrofílicos (R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S y T), aminoácidos que contienen cadenas laterales alifáticas (G, A, V, L, I y P), aminoácidos que contienen cadenas laterales que contienen el grupo hidroxilo (S, T y Y), aminoácidos que contienen cadenas laterales que contienen un átomo de azufre (C y M),
 20 aminoácidos que contienen cadenas laterales que contienen amida y ácido carboxílico (D, N, E y Q), aminoácidos que contienen cadenas laterales básicas (R, K y H), y aminoácidos que contienen cadenas laterales aromáticas (H, F, Y y W)(los aminoácidos son representados por códigos de una letra en paréntesis). Las
 25 sustituciones de aminoácido dentro de cada uno de estos grupos

son llamadas sustituciones conservativas. Ya se conoce que un polipéptido que contiene una secuencia de aminoácido modificada en la cual uno o más residuos de aminoácido en una secuencia de aminoácido dado son eliminados, agregados y/o sustituidos con
5 otros aminoácidos pueden retener la actividad biológica original (Mark, D.F. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA; (1984)81: 5662-6; Zoller, M.J. and Smith, M., Nucleic Acids Res. (1982) 10: 6487-500; Wang, A. *et al.*, Science (1984) 224: 1431-3; Dalbadie-McFarland, G. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982) 79: 6409-13). Las
10 regiones variables de la presente invención que contienen tales modificaciones de aminoácido tienen una identidad de secuencia de aminoácido de al menos 70%, más preferiblemente al menos 75%, aún más preferible al menos 80%, todavía más preferible al menos 85%, aún más preferible al menos 90%, y más preferible al menos
15 95%, con la secuencia de aminoácido de las secuencias CDR, secuencias FR, o regiones variables completas de la región variable antes de la modificación. En la presente, la identidad de la secuencia se define como el porcentaje de residuos idénticos a aquellos en la secuencia de aminoácido original de la región
20 variable de cadena H o región variable de cadena L determinada después de que las secuencias son alineadas, y los huecos son apropiadamente introducidos para maximizar la identidad de secuencia como sea necesario. La identidad de las secuencias de aminoácido puede ser determinada por el método descrito a
25 continuación.

Además, una "región variable del anticuerpo funcionalmente equivalente" se puede obtener, por ejemplo, de ácidos nucleicos que se hibridizan bajo condiciones rigurosas con ácidos nucleicos que comprenden una secuencia de nucleótido que

5 codifica la secuencia de aminoácido de una región variable en las Tablas 1 a 3 mencionadas anteriormente. Las condiciones de hibridización rigurosas para aislar un ácido nucleico que se hibridiza bajo condiciones rigurosas con un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótido que codifica la secuencia

10 de aminoácido de una región variable incluye, por ejemplo, las condiciones de urea 6 M, 0.4% de SDS, 0.5x SSC y 37°C, o condiciones de hibridización con una equivalencia estricta a las mismas. El aislamiento de los ácidos nucleicos con una homología mucho mayor puede ser esperada con condiciones más rigurosas, por ejemplo,

15 las condiciones de urea 6M, 0.4% de SDS, 0.1x SSC y 42°C. Las condiciones de lavado después de la hibridización son, por ejemplo, lavado usando 0.5x SSC (1x SSC en NaCl 0.15 M y citrato de sodio 0.015 M a pH 7.0) y 0.1% de SDS a 60°C, más preferiblemente el lavado usando 0.2x SSC y 0.1% SDS a 60°C, aún más preferiblemente

20 el lavado usando 0.2x SSC y 0.1% SDS a 62°C, todavía aún más preferible el lavado usando 0.2x SSC y 0.1% SDS a 65°C, y aún más preferible el lavado usando 0.1x SSC y 0.1% SDS a 65°C. Las secuencias de los ácidos nucleicos aislados pueden ser determinadas por los métodos conocidos descritos a continuación.

25 La homología de la secuencia de nucleótido total del ácido nucleico

aislado es al menos 50% o mayor, preferiblemente 70% o mayor, y más preferiblemente 90% o mayor (por ejemplo, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o mayor) de la identidad de secuencia.

Los ácidos nucleicos que se hibridizan bajo condiciones
5 rigurosas a un ácido nucleico que comprenden una secuencia de nucleótido que codifica la secuencia de aminoácido de una región variable puede también ser aislada usando, en lugar de los métodos descritos anteriormente usando técnicas de hibridización, métodos de amplificación del gen tal como reacción en cadena de
10 polimerasa (PCR) que usa cebadores sintetizados con base en la información de la secuencia de nucleótido que codifica la secuencia de aminoácido de región variable.

La identidad de una secuencia de nucleótido o secuencia de aminoácido a otra puede ser determinada usando el algoritmo
15 BLAST, por Karlin and Altschul (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) 90: 5873-7). Los programas llamados BLASTN y BLASTX se desarrollaron con base a este algoritmo (Altschul *et al.*, J. Mol. Biol. (1990) 215: 403-10). Para analizar las secuencias de conformidad con BLASTN con base a BLAST, los parámetros se fijan,
20 por ejemplo, como calificación=10 y largo de palabra=12. Por otra parte, los parámetros usados para el análisis de las secuencias de aminoácido por BLASTX con base en BLAST incluye, por ejemplo, calificación = 50 y largo de palabra = 3. Se usaron parámetros predeterminados cuando se usan los programas BLAST y BLAST
25 Ahuecado. Se conocen técnicas específicas para tales análisis en

la técnica (véase el sitio en red del Centro Nacional para Información de Biotecnología (NCBI), Herramienta de Búsqueda de Alineación Local Básica (BLAST); <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

5 La combinación de la región variable del anticuerpo que tiene actividad de unión al glipicano-3 y la región variable del anticuerpo que tiene actividad de unión el complejo receptor de la célula T comprendida en la molécula multiespecífica que se une al antígeno de la presente invención no está particularmente

10 limitada mientras tiene las actividades descritas anteriormente. Sin embargo, en la presente invención, la actividad citotóxica de la molécula multiespecífica que se une al antígeno es preferiblemente equivalente a o mayor que la del anticuerpo

15 biespecífico GPC3_ERY22_rCE115 descrito en el Ejemplo 3. Aquí, el término "equivalente" no necesariamente tiene el significado del mismo grado de actividad como se describe anteriormente, y la actividad puede ser mejorada. Siendo equivalente a GPC3_ERY22_rCE115 es, por ejemplo, cuando el valor de (velocidad de inhibición de crecimiento celular/velocidad de inhibición de

20 crecimiento celular (GPC3_ERY22_rCE115)) con relación a la velocidad de inhibición de GPC3_ERY22_rCE115 (velocidad de inhibición de crecimiento celular (GPC3_ERY22_rCE115)) es 0.7 o mayor, preferiblemente 0.8 o mayor, 0.9 o mayor, 1.0 o mayor, 1.2 o mayor, 1.5 o mayor, 2 o mayor, 3 o mayor, 5 o mayor, 10 o mayor

25 o 20 o mayor. Mientras no existe límite superior, el valor puede

ser, por ejemplo, 10 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 o 10^6 . La concentración de la molécula multiespecífica que se une al antígeno para ser agregada puede ser determinada apropiadamente, pero es preferiblemente, por ejemplo, 0.01 nM, 0.05 nM, 0.1 nM, 0.5 nM o 5 1 nM; y preferiblemente, las mediciones se toman a 0.05 nM o 0.1 nM.

Además, los ejemplos incluyen el caso en donde el valor (concentración para 50% de inhibición de crecimiento celular/concentración para 50% de inhibición de crecimiento 10 celular (GPC3_ERY22_rCE115)) obtenida por comparación a la concentración para 50% de inhibición de crecimiento de las células GPC3-ERY22_rCE115 (concentración para 50% de inhibición de crecimiento celular (GPC3_ERY22_rCE115)) es 1.5 o menor. El valor para "concentración para 50% de inhibición de crecimiento 15 celular/concentración para 50% de inhibición de crecimiento celular (GPC3_ERY22_rCE115)" es preferiblemente 1.3 o menor, más preferiblemente 1.2 o menor, 1.1 o menor, 1.0 o menor, 0.9 o menor, 0.8 o menor, 0.7 o menor, 0.6 o menor, o 0.5 o menor. Mientras no existe límite inferior, el valor puede ser por ejemplo, 10^{-1} , 10^{-2} , 20 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , o 10^{-6} . Específicamente, el valor es preferiblemente 10^{-6} a 5×10^{-0} , más preferiblemente 10^{-6} a 10^{-1} , aún más preferiblemente 10^{-6} a 10^{-2} , y todavía aún más preferiblemente 10^{-6} a 10^{-3} .

Los valores K_D específicos preferidos para GPC3 y 25 complejo del receptor de la célula T humana (por ejemplo, cadena

CD3ε humana) son también como se indican anteriormente. Las células deseadas que muestran la expresión GPC3 o tejidos deseados que contienen estas células pueden ser usadas por las células, y, por ejemplo, se pueden usar PC-10 o NCI-H446 las cuales son
 5 líneas de células de cáncer humano que expresan GPC3.

Ejemplos de tal combinación de la región variable del anticuerpo que tiene actividad de unión a glipicano-3 y la región variable del anticuerpo que tiene actividad de unión al complejo del receptor de la célula T, incluye las combinaciones de regiones
 10 variables de cadena H del anticuerpo mostradas en la Tabla 4, combinaciones de regiones variables de cadena H del anticuerpo que tiene secuencias CDR cuyas secuencias de aminoácido CDR1, CDR2 y CDR3 son las mismas como las secuencias de aminoácido CDR1, CDR2 y CDR3 portadas por las regiones variables de cadena H del
 15 anticuerpo de la Tabla 4, y combinaciones de las regiones variables de cadena H del anticuerpo funcionalmente equivalente a estas regiones variables. Aquí, "funcionalmente equivalente" tiene el mismo significado descrito anteriormente.

Tabla 4

20	Lado GPC3/lado del complejo receptor de célula T	SEQ ID NO:
	H0000/hCE115HA	40/52
	H0000/CE115HA251	40/500
	H0000/CE115HA236	40/429
	H0000/TR01H002	40/421
	H0000/CE115HA122	40/426
	H0610/rCE115H	215/424
	H0610/TR01H040	215/103
25	H0610/TR01H061	215/122
	H0610/TR01H068	215/129
	H0610/TR01H071	215/132

Tabla 4 (cont.)

	Lado GPC3/lado del complejo receptor de célula T	SEQ ID NO:
5	GCH054/TR01H067	197/128
	GCH094/TR01H082	211/142
	GCH094/TR01H084	211/144
	GCH065/TR01H084	206/144
	GCH065/TR01H082	206/142
	GCH094/TR01H109	211/164
	GCH065/TR01H109	206/164
10	GCH094/TR01H113	211/168
	GCH065/TR01H113	206/168

Una cadena L común preferida para tales combinaciones de una región variable del anticuerpo que tiene actividad de unión al glipicano-3 y una región variable del anticuerpo que tiene actividad de unión al complejo del receptor de la célula T incluye, por ejemplo, L0000, L0011, L0201, L0203, L0204, L0206, L0208, L0209, L0211, L0212, L0222, y una cadena L común que tiene secuencias CDR (secuencias de aminoácido CDR1, CDR2 y CR3) idénticas a las secuencias de aminoácido CDR1, CDR2 y CDR3 como en la anterior cadena L común. Las combinaciones específicas incluyen, por ejemplo, las combinaciones de las regiones variables de cadena H del anticuerpo y una cadena L común en mostradas en la Tabla 5, las combinaciones de las regiones variables del anticuerpo que tienen secuencias CDR (secuencias de aminoácido CDR1, CDR2 y CDR3) idénticas a las secuencias de aminoácido de

CDR1, CDR2 y CDR3 portadas por regiones variables del anticuerpo y una cadena L común de la Tabla 5, y combinaciones de las regiones variables de cadena H y una cadena L común funcionalmente equivalente a estas regiones variables. Aquí, “funcionalmente
 5 equivalente” tiene el mismo significado como se describe anteriormente.

Tabla 5

	Lado GPC3/lado del complejo de receptor de célula T/cadena L común	SEQ ID NO:
	H0610/rCE115H/L0000	215/424/53
	H0610/TR01H040/L0000	215/103/53
10	H0610/TR01H040/L0201	215/103/299
	H0610/TR01H040/L0203	215/103/301
	H0610/TR01H040/L0204	215/103/302
	H0610/TR01H040/L0206	215/103/304
	H0610/TR01H040/L0208	215/103/306
	H0610/TR01H040/L0209	215/103/307
	H0610/TR01H040/L0211	215/103/309
	H0610/TR01H061/L0000	215/122/53
	H0610/TR01H068/L0000	215/129/53
15	H0610/TR01H071/L0000	215/132/53
	GCH054/TR01H067/L0201	197/128/299
	GCH054/TR01H067/L0212	197/128/310
	GCH054/TR01H067/L0222	197/128/319
	GCH054/TR01H067/L0000	197/128/53
	GCH094/TR01H082/L0201	211/142/299
	GCH094/TR01H082/L0011	211/142/223
	GCH094/TR01H084/L0011	211/144/223
20	GCH065/TR01H084/L0011	206/144/223
	GCH065/TR01H082/L0011	206/142/223
	GCH094/TR01H109/L0011	211/164/223
	GCH065/TR01H109/L0011	206/164/223
	GCH094/TR01H113/L0011	211/168/223
	GCH065/TR01H113/L0011	206/168/223

La región Fc comprendida en la molécula multiespecífica
 25 que se une al antígeno de la presente invención no está

particularmente limitada mientras que sea una región Fc que tiene actividad que se une al receptor Fc γ reducida, pero ejemplos de una región Fc preferida de la presente invención incluye una combinación de la porción de la región Fc de E22Hh y la porción
5 de la región Fc de E22Hk, una combinación de la porción de la región Fc de E22702GsKsc y la porción de la región Fc de E2704sEosc, y una combinación de la porción de la región Fc de E2702sKsc y la porción de la región Fc de E2704sEpsc.

Ejemplos de una molécula multiespecífica que se une al
10 antígeno de la presente invención incluyen anticuerpos biespecíficos que comprenden una región variable del anticuerpo que tiene actividad de unión a glipicano-3 y una región variable del anticuerpo que tiene actividad de unión a CD3 ϵ . Más preferiblemente, la actividad citotóxica es la misma o mayor que
15 la del anticuerpo biespecífico GPC3_ERY22_rCE115. Ejemplos de tales anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos biespecíficos que comprenden cadenas H y L descritas en la Tabla 13, y anticuerpos biespecíficos que se unen a epítipo que se traslapa con un epítipo unido por los anteriores anticuerpos, y
20 los cuales contienen una región Fc con actividad de unión al receptor Fc γ reducida.

Si un anticuerpo reconoce un epítipo que se traslapa con un epítipo reconocido por otro anticuerpo puede ser conformado por la competición entre los dos anticuerpos contra el epítipo.
25 La competición entre los anticuerpos puede ser evaluada por

ensayos de unión de competitividad usando medios tales como ensayo de inmunosorbente enlazado a la enzima (ELISA), método de transferencia de energía fluorescente (FRET), y tecnología de ensayo de microvolumen fluorométrico (FMAT (nombre comercial
5 registrado)). La cantidad de un anticuerpo unido a un antígeno indirectamente se correlaciona con la capacidad de unión de un anticuerpo competidor candidato (un anticuerpo de prueba) que competitivamente se une al epítipo traslapado. En otras palabras, ya que la cantidad de un anticuerpo de prueba contra el epítipo
10 traslapado se incrementa, la cantidad del anticuerpo unido al antígeno disminuye, y la cantidad del anticuerpo de prueba que se une al antígeno se incrementa. Específicamente, el anticuerpo etiquetado apropiadamente y el anticuerpo a ser evaluado son simultáneamente agregados al antígeno, y el anticuerpo unido como
15 un resultado se detecta usando la etiqueta. La cantidad del anticuerpo que se une al antígeno puede ser fácilmente determinada etiquetando el anticuerpo de antemano. Esta etiqueta no es particularmente limitada, y el método de etiquetado se selecciona de conformidad con la técnica de ensayo usada. Específicamente,
20 el método de etiquetado incluye etiquetado fluorescente, radioetiquetado, etiquetado enzimático y similares.

Por ejemplo, el anticuerpo fluorescentemente etiquetado y el anticuerpo no etiquetado, o el anticuerpo de prueba son simultáneamente agregados a microcápsulas con GPC3 o CD3 ϵ ,
25 y el anticuerpo etiquetado es detectado por tecnología de ensayo

de microvolumen fluorométrico.

Aquí, el "anticuerpo que se une al epítopo traslapado" se refiere a un anticuerpo de prueba que puede reducir la cantidad del anticuerpo etiquetado unido por al menos 50% a una
5 concentración que es usualmente 100 veces mayor, preferiblemente 80 veces mayor, más preferiblemente 50 veces mayor, aún más preferible 30 veces mayor, y todavía más preferible 10 veces mayor que la concentración a la cual el anticuerpo no etiquetado se reduce a 50% de la cantidad del anticuerpo etiquetado unido (IC_{50}).

10 Las moléculas multiespecíficas que se unen al antígeno, las cuales tienen los sitios de unión al antígeno de anticuerpos que se unen a epítomos traslapados con epítomos unidos por los anticuerpos mencionados anteriormente, pueden proporcionar excelente actividad citotóxica.

15 Las moléculas multiespecíficas que se unen al antígeno de la presente invención se producen por la misma técnica como el método para producir anticuerpos recombinantes mencionados anteriormente.

La presente invención también se refiere a
20 polinucleótidos que codifican las moléculas que se unen al antígeno de la presente invención, y se pueden insertar en vectores de expresión discrecional. Los hospederos adecuados pueden ser transformados con los vectores de expresión para producir células que expresan las moléculas que se unen al antígeno. Las moléculas
25 que se unen al antígeno por los polinucleótidos pueden ser

obtenidos cultivando las células que expresan las moléculas que se unen al antígeno, y recolectar los productos de expresión de los sobrenadantes del cultivo. Esto es, la presente invención se refiere a vectores que comprenden un polinucleótido que codifica una molécula que se une al antígeno, los cuales comprenden cultivar las células y recolectar las moléculas que se unen al antígeno de los sobrenadantes del cultivo. Estos pueden ser obtenidos por técnicas similares a aquellas para anticuerpos recombinantes mencionadas anteriormente.

10 **Composiciones farmacéuticas**

Desde otros puntos de vista, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden como el ingrediente activo una molécula multiespecífica que se une al antígeno que comprende: (1) un dominio que comprende una región variable del anticuerpo que tiene actividad de unión a glipicano-3, (2) un dominio que comprende una región variable del anticuerpo que tiene actividad de unión al complejo del receptor de la célula T, y (3) un dominio que comprende una región Fc con actividad de unión reducida hacia un receptor Fc γ . Además, la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que inducen lesión celular, lo cual comprende la molécula que se une al antígeno como un ingrediente activo. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención las cuales inducen la lesión celular descrita, particularmente citotoxicidad celular dependiente de la célula T, son preferiblemente administradas a

un sujeto que sufre de una enfermedad para la cual las actividades son necesarias para prevención o tratamiento, o un sujeto en el cual la enfermedad sea posible que recaiga.

Además, en la presente invención, los agentes que
5 inducen citotoxicidad y los agentes que inhiben el crecimiento que comprenden como el ingrediente activo una molécula multiespecífica que se une al antígeno que comprende:

(1) un dominio que comprende una región variable del anticuerpo que tiene actividad de unión,

10 (2) un dominio que comprende una región variable del anticuerpo que tiene actividad de unión al complejo del receptor de la célula T, y

(3) un dominio que comprende una región Fc con actividad de unión reducida hacia un receptor Fc γ puede ser presentado como
15 un método para inducir lesión celular la cual comprende las etapas de administrar la molécula que se une al antígeno a un sujeto, o puede ser presentado como uso de la molécula que se une al antígeno en la manufactura de un agente que induce citotoxicidad y un agente que inhibe crecimiento.

20 En la presente invención "comprende como el ingrediente específico una molécula multiespecífica que se une al antígeno que comprende (1) un dominio que comprende una región variable del anticuerpo que tiene actividad de unión a glipicano-3, (2) un dominio que comprende una región variable del anticuerpo que
25 tiene actividad de unión al complejo del receptor de la célula

T, y (3) un dominio que comprende una región Fc con actividad de unión reducida hacia un receptor Fc γ " significa que comprende la molécula que se une al antígeno como un componente activo principal, sin limitación a la relación de contenido de la molécula
5 que se une al antígeno.

De ser necesario, las moléculas multiespecíficas que se unen al antígeno de la presente invención pueden ser encapsulados en microcápsulas (por ejemplo, aquellas hechas de hidroximetilcelulosa, gelatina, y poli[metilmetacrilato) o
10 incorporadas como componentes de un sistema de suministro de fármaco coloidal (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas)(véase, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edición, Olso ed. (1980)). Los métodos para preparar
15 los agentes farmacéuticos como agentes farmacéuticos de liberación controlada también son bien conocidos, y similares métodos pueden ser aplicados a las moléculas multiespecíficas que se une al antígeno de la presente invención (J. Biomed. Mater. Res. (1981) 15:267-277; Chemtech. (1982) 12: 98-105; Patente
20 Estadounidense No. 3,773,719; Publicación de Solicitud de Patente Europea Nos. EP 58,481 y EP 133,988; Biopolymers (1983) 22: 547-556).

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención o agentes que inducen citotoxicidad y agentes que
25 inhiben crecimiento celular se pueden administrar a pacientes por

administración oral o parenteral, y se prefiere administración parenteral. Ejemplos específicos del método de administración incluyen administración por inyección, administración transnasal, administración transpulmonar y administración transdermal. Ejemplos de administración por inyección incluyen inyección intravenosa, inyección intramuscular, inyección intraperitoneal e inyección subcutánea. Una composición farmacéutica de la presente invención o agente que induce citotoxicidad y un agente que inhibe el crecimiento celular pueden ser administrados sistemáticamente o localmente, por ejemplo, a través de administración por inyección. El método de administración puede ser seleccionado apropiadamente de conformidad con la edad y síntomas del paciente. La dosis puede ser seleccionada del intervalo de 0.0001 mg a 1000 mg por kilogramo de peso corporal para una administración única. Alternativamente, por ejemplo, la dosis puede ser seleccionada del intervalo de 0.001 mg/cuerpo a 100000 mg/cuerpo por paciente. Sin embargo, las composiciones farmacéuticas de la presente invención o un agente que induce citotoxicidad y agente que inhibe el crecimiento celular no se limitan a estas dosis.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención o agentes que inducen citotoxicidad y agentes que inhiben el crecimiento celular pueden ser formuladas de conformidad con métodos convencionales (por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Product Science, última edición, Mark Publishing

Company, Easton, U.S.A.) y pueden contener también portadores y aditivos farmacéuticamente aceptables. Entre los ejemplos se incluyen, sin ser limitado a, tensioactivos, excipientes, agentes colorantes, perfumes, conservadores, estabilizadores, amortiguadores, agentes de suspensión, agentes de isotonización, aglutinantes, lubricantes, agentes que promueven la fluidez y agentes saborizantes; y otros portadores comúnmente usados pueden adecuadamente ser usados. Ejemplos específicos de los portadores incluyen ácido silícico anhidro, lactosa, celulosa cristalina, manitol, almidón, carmelosa de sodio, hidroxipropil celulosa, hidroxipropil metil celulosa, dietilaminoacetato de polivinilacetal, polivinilpirrolidona, gelatina, triglicéridos de ácido graso de cadena media, aceite de ricino 60 endurecido con polioxietileno, sacarosa, carboximetil celulosa, almidón de maíz, sal inorgánica y similares.

La presente invención también proporciona métodos para dañar células que expresan antígeno glipicano 3 o tejidos de tumor que contienen células que expresan el antígeno, o métodos para suprimir el crecimiento estas células o tejidos de tumor poniendo en contacto las células que expresan el antígeno glipicano 3 con una molécula multiespecífica que se une al antígeno de la presente invención que se une al antígeno. La molécula multiespecífica que se une al antígeno que se une al antígeno es como se describe anteriormente por una molécula que se une al antígeno de la presente invención que se une al antígeno, el cual es comprendido

en los agentes que inducen citotoxicidad y agentes que inhiben el crecimiento celular de la presente invención. Las células unidas por una molécula multiespecífica que se une al antígeno de la presente invención que se une al antígeno no son particularmente limitadas mientras que estas son células que expresan el antígeno.

En la presente invención, el "contacto" se lleva a cabo, agregando una molécula multiespecífica que se une el antígeno al medio de cultivo de las células que expresan el antígeno GPC3 cultivadas *in vitro*. En este caso, un líquido o sólido obtenido por secado por congelamiento o similar puede ser adecuadamente usado como la forma de la molécula agregada que se une al antígeno. Cuando se agrega como una solución acuosa, puede ser una solución acuosa que simplemente contiene solamente la molécula multiespecífica que se une al antígeno de la presente invención, o puede ser una solución que contiene también, por ejemplo, los tensioactivos, excipientes, agentes colorantes, perfumes, conservadores, estabilizadores, amortiguadores, agentes de suspensión, agentes de isotonización, aglutinantes, desintegrantes, lubricantes, agentes que promueven la fluidez y agentes saborizantes antes mencionados. La concentración a la cual la adición se realiza no es particularmente limitada, pero una concentración final adecuada en la solución de cultivo es preferiblemente en el intervalo de 1 pg/ml a 1 g/ml, más preferiblemente 1 ng/ml a 1 mg/ml, y aún más preferible 1 µg/ml

a 1 mg/ml.

Además, en otra modalidad de la presente invención, el “contacto” puede realizarse también mediante la administración de la molécula que se une al antígeno de la presente invención a animales no humanos con células que expresan el antígeno GPC3 trasplantado en sus cuerpos, y a animales que portan las células que intrínsecamente expresan el antígeno. El método de administración puede ser oral o parenteral, y la administración parenteral es particularmente preferida. Ejemplos específicos del método de administración incluye administración por inyección, administración transnasal, administración transpulmonar y administración transdermal. Ejemplos de administración por inyección incluye inyección intravenosa, inyección intramuscular, inyección intraperitoneal e inyección subcutánea. Una composición farmacéutica de la presente invención o un agente que induce citotoxicidad y un agente que inhibe el crecimiento celular pueden ser administrados sistemáticamente o localmente, por ejemplo, a través de la administración por inyección. El método de administración puede ser seleccionado apropiadamente de conformidad con la edad y síntomas del animal de prueba. Cuando se administra como una solución acuosa, se puede usar una solución acuosa que contiene simplemente únicamente una molécula multiespecífica que se une al antígeno de la presente invención, o una solución que contiene los tensioactivos, excipientes, agentes colorantes, perfumes, conservadores,

estabilizadores, amortiguadores, agentes de suspensión, agentes de isotonización, aglutinantes, desintegrantes, lubricantes, agentes que promueven la fluidez, agentes saborizantes y similares se pueden usar. La dosis puede ser seleccionada del intervalo de
5 0.0001 mg a 1000 mg por kilogramo de peso corporal para una administración única.

Alternativamente, por ejemplo, la dosis se puede seleccionar del intervalo de 0.001 mg/cuerpo a 100000 mg/cuerpo por paciente. Sin embargo, la cantidad de molécula multiespecífica
10 que se une al antígeno de la presente invención administrada no se limita a estas dosis.

El siguiente método es adecuadamente usado como un método para evaluar o medir la lesión celular inducida en células que expresan el antígeno glipicano 3 el cual se une por un domino
15 que porta una región variable del anticuerpo que tiene actividad de unión a glipicano 3 que constituye la molécula que se une al antígeno como un resultado de poner en contacto las células con una molécula multiespecífica que se une al antígeno de la presente invención. Ejemplos de un método para evaluar o medir la actividad
20 citotóxica *in vitro* incluyen métodos para medir la actividad de la célula T citotóxica. Si o no una molécula multiespecífica que se une al antígeno de la presente invención tiene citotoxicidad de la célula T puede ser medida por métodos conocidos (por ejemplo, Current protocols in Immunology, Capítulo 7. Immunologic studies
25 in humans, Editor, John E. Coligan *et al.*, John Wiley & Sons, Inc.,

(1993) y similares). Para mediciones de actividad, una molécula que se une al antígeno que se une a un antígeno diferente de glipicano 3, el cual es un antígeno no expresado en las células usadas para la examinación, puede ser usada como un control de la misma manera como una molécula multiespecífica que se une al antígeno de la presente invención, y la actividad puede ser determinada por la presente cuando la molécula multiespecífica que se une al antígeno de la presente invención muestra una actividad citotóxica más fuerte que cuando se usa la molécula que se une al antígeno como un control.

Para evaluar o medir la actividad citotóxica *in vivo*, por ejemplo, las células que expresan un antígeno glipicano 3 son intradermalmente o subcutáneamente trasplantadas a un animal de prueba no humano, y después una molécula de prueba que se une al antígeno es intravenosamente o intraperitonealmente administrada diariamente o con un intervalo de pocos días, partiendo del día de trasplante o al siguiente día. La actividad citotóxica puede ser determinada por medición diaria del tamaño de tumor y observando diferencia en el cambio de tamaño del tumor. En una manera similar a la evaluación *in vitro*, la actividad citotóxica de una molécula que se une al antígeno de la presente invención puede ser determinada por estar presente cuando la administración de moléculas de control que se unen al antígeno muestran que el tamaño de tumor en el grupo sometido a la administración de una molécula que se une al antígeno de la presente invención es

significativamente más pequeña que el tamaño de tumor en el grupo sometido a la administración de la molécula de control que se une al antígeno.

Como un método para evaluar o medir el efecto supresor
5 en la proliferación de células que expresan un antígeno glipicano 3, un método para medir la absorción de timidina etiquetada con el isótopo en células o el método MTT puede ser adecuadamente usado. Como un método para evaluar o medir la actividad de proliferación-supresora de la célula *in vivo*, el mismo método
10 descrito anteriormente para evaluar o medir la actividad citotóxica *in vivo* puede ser adecuadamente usado.

La presente invención también proporciona kits para uso en los métodos de la presente invención, los cuales comprenden una molécula multiespecífica que se une al antígeno de la presente
15 invención o una molécula multiespecífica que se une al antígeno producida por un método de producción de la presente invención. Adicionalmente el kit puede incluir en su envase, un portador, solvente farmacéuticamente aceptable, e instrucciones que describen el método de uso.

20 La presente invención también se refiere a una molécula multiespecífica que se une al antígeno de la presente invención o una molécula multiespecífica que se une al antígeno producida por un método de producción de la presente invención para uso en un método de la presente invención.

25 La presente invención también se refiere a moléculas

que tienen actividad que se une a GPC3, la cual contiene un dominio que comprende una región variable del anticuerpo que tiene actividad que se une al antígeno de la molécula multiespecífica que se une al antígeno de la presente invención. Además, la

5 presente invención se refiere a una molécula que tiene actividad que se une a GPC3, la cual comprende las regiones variables del anticuerpo de las cadenas H y L respectivamente que comprenden las tres CDRs de las cadenas H y L (total de seis CDRs) contenidas en la molécula. La presente invención también se refiere a las

10 moléculas que tienen actividad que se une al complejo del receptor de la célula T, las cuales contienen un dominio que comprende una región variable del anticuerpo que tiene actividad que se une al complejo del receptor de la célula T de la molécula multiespecífica que se une al antígeno de la presente invención. Además, la

15 presente invención se refiere a una molécula que tiene actividad que se une al complejo del receptor de la célula T que comprende las regiones variables del anticuerpo de las cadenas H y L respectivamente que comprende las tres CDRs de las cadenas H y L (total de seis CDRs) contenidas en la molécula. Tales moléculas

20 pueden ser anticuerpos o polipéptidos que comprenden fragmentos que se unen al antígeno de un anticuerpo. La presente invención también se refiere a anticuerpos que se unen a epítopos traslapados o que compiten con estas moléculas o polipéptidos que contienen los fragmentos del mismo que se unen al antígeno. Ejemplos

25 adecuados de tales polipéptidos que comprenden fragmentos que se

unen al antígeno de un anticuerpo incluye scFv, anticuerpos de cadena única, Fv, cadena Fv 2 única (scFv2), Fab y F(ab')₂. Además, estas moléculas no pueden ser multiespecíficas (biespecíficas), y pueden unirse solamente ya sea por GPC3 o un complejo del receptor de la célula T (por ejemplo, la cadena CD3ε).

Estas moléculas incluyen una molécula que comprende un dominio que comprende una región variable del anticuerpo que tiene actividad que se une a GPC3 de la molécula multiespecífica que se une al antígeno ejemplificado en detalle en los Ejemplos en la presente (la cual comprende las regiones variables de cadena H que tienen actividad que se una a GPC3 y la región variable común de cadena L), una molécula que comprende un dominio que comprende una región variable del anticuerpo que tiene actividad que se une al complejo del receptor de la célula T de la molécula multiespecífica que se une al antígeno ejemplificada en que los Ejemplos en la presente (los cuales comprenden la región variable de cadena L), y también una molécula que tiene una actividad que une la proteína antigénica (GPC3 o complejo del receptor de la célula T), la cual comprende las tres CDRs de cada una de las cadenas H y L (total de seis CDRs) contenidas en la molécula anterior.

Estas moléculas tienen CDRs que están en común con aquella molécula multiespecífica que se une al antígeno de la presente invención; y por lo tanto, se espera que se unan a un epítipo traslapado con un epítipo para la molécula multiespecífica

que se una al antígeno de la presente invención. Por lo tanto, estas moléculas pueden competir con moléculas multiespecíficas que se unen al antígeno de la presente invención cuando co-existen con las moléculas multiespecíficas que se unen al antígeno de la presente invención. En consecuencia, estas moléculas pueden ser usadas, por ejemplo, como agentes reguladores para actividades de supresión (tal como actividad que se une al antígeno, actividad citotóxica y actividad antitumoral) de las moléculas multiespecíficas que se unen al antígeno de la presente invención.

Además, tal molécula se puede unir a una proteína objetivo (GPC3 o complejo del receptor de la célula T) por adelantado, y cuando se agrega una molécula multiespecífica que se une al antígeno de la presente invención, pueden ser detectadas las moléculas que se disocian a través de la competencia. De esta manera, la molécula es útil como un agente para detectar la unión de una molécula multiespecífica que se une al antígeno de la presente invención a una proteína objetivo. Aquí, tales moléculas pueden ser etiquetadas apropiadamente con sustancias fluorescentes o similares. Alternativamente, estas moléculas son útiles para seleccionar nuevos anticuerpos que se unen a epítopos traslapados con los epítopos unidos por las moléculas multiespecíficas que se unen al antígeno de la presente invención. Como se describe anteriormente, tales moléculas pueden ser unidas a una proteína objetivo (GPC3 o complejo del receptor de la célula T) por adelantado, y cuando se agrega un anticuerpo, si la molécula unida

se disocia, después el anticuerpo de prueba es un candidato para un anticuerpo que se une a un epítopo traslapado con el epítopo unido por la molécula multiespecífica que se une al antígeno de la presente invención. Esto permitirá selección eficiente de
5 nuevas moléculas multiespecíficas que se unen al antígeno.

Las combinaciones presentadas como ejemplos en la presente como combinaciones de cada una CDR de las moléculas multiespecíficas que se unen al antígeno de la presente invención pueden ser directamente usadas como combinaciones específicas de
10 CDRs de las regiones variables de cadena H y cadena L en estas moléculas. La afinidad del antígeno de estas moléculas (valores KD) es preferiblemente un valor ejemplificado en la presente como el valor KD de una molécula multiespecífica que se une al antígeno de la presente invención, pero no se limita a esto.

15 La presente invención también se refiere a ácidos nucleicos que codifican estas moléculas, vectores que comprenden los ácidos nucleicos, células que comprenden los ácidos nucleicos o los vectores, métodos para producir las moléculas cultivando las células, y las moléculas producidas por estos métodos.

20 Todas las referencias de la técnica anteriores citadas en la presente son incorporadas por referencia en esta descripción.

EJEMPLOS

Aquí a continuación, la presente descripción será
25 específicamente descrita con referencia a los siguientes

Ejemplos, pero no son contruidos para limitar esta.

Ejemplo 1 - Producción de GPC3_ERY22rCE115 y medición de actividad citotóxica

(1-1) Producción de GPC3_ERY22_rCE115

5 Una molécula en la cual uno los Fabs han sido reemplazados con un dominio que se une a épsilon CD3 se produce usando IgG contra un antígeno cancerígeno (GPC3) como la estructura base. En este caso, el FC de IgG usado como la estructura básica fue un Fc silente con afinidad atenuada por FcγR (un
10 receptor Fcγ(Fc gama)). Un anticuerpo anti-GPC3, H0000 (SEQ ID NO)/GLA (SEQ ID NO: 41), se usó como el dominio que se une a GPC3. Un anticuerpo anti-CD3, rCE115H/rCE115L (SEQ ID NO. 42/SEQ ID NO: 43), se usó como el dominio que se une a CD3.

El G1d producido removiendo Gly y Lys en el C término
15 de IgG1 se usó como la región constante de cadena H del anticuerpo, esto se usó en combinación con H0000/GL4 y rCE115H/rCE115L. Cuando la región constante de cadena H del anticuerpo se nombró H1, la secuencia que corresponde a la cadena H del anticuerpo que porta H0000 en la región variable se muestra como H0000-H1. Aquí, se
20 muestra una alteración de aminoácido, por ejemplo, como D356K. La primera letra (que corresponde a D en D356K) es la representación del código de una letra para el residuo de aminoácido antes de la modificación, el número que sigue (que corresponde a 356 de D356K) es la posición de la modificación
25 indicada por la numeración EU, y la letra final (que corresponde

a K de D356K) es la representación de código de una letra para el residuo de aminoácido después de la modificación. G1dh (SEQ ID NO: 44) producido removiendo Gly y Lys en el C término de IgG1, ERY22_Hk (SEQ ID NO: 45) producido introduciendo las mutaciones

5 L234A/L235A/Y349C/T366W en G1dh, y ERY22_Hh (SEQ ID NO: 46) producido introduciendo las mutaciones L234A/l235A/D356C/T366S/L368A/Y407V en G1dh se prepararon de conformidad con el método del Ejemplo de Referencia 1. Las mutaciones L234A y L235A se introdujeron en las cadenas H

10 respectivas para atenuar la afinidad para FcγR (un receptor Fcγ), y las mutaciones Y349C/T366W y D356C/T366S/L368A/Y407V se introdujeron para eficientemente formar heterómeros de cada cadena H cuando se producen los anticuerpos heterodiméricos que comprenden dos tipos de cadena H.

15 El anticuerpo heterodimérico, GPC3_ERY22_rCE225, producido por sustitución con los dominios VH y VL de Fac contra GPC3 se preparó de conformidad con el Ejemplo de Referencia 1 (Fig. 1a).

Una serie de vectores de expresión insertados con un

20 polinucleótido que codifica uno de GL4-ERY22Hk (SEQ ID NO: 47), H0000-ERY22_L (SEQ ID NO: 48), rCE115H-ERY22_Hh (SEQ ID NO: 49), y rCE115L-k0 (SEQ ID NO: 50) se produjeron por métodos bien conocidos por aquellos expertos en la técnica, tal como métodos de PCR usando cebadores agregados con una secuencia apropiada

25 similar a aquella en el método descrita anteriormente.

La siguiente combinación de los vectores de expresión se introdujo en células FreeStyle 293-F por expresión temporal de cada molécula objetivo.

La molécula objetivo: GPC3_ERY22_rCE115

5 Los polipéptidos codificados por los polinucleótidos insertados en los vectores de expresión: GL4-ERY22_Hk, H0000-ERY22_L, rCE115H-ERY22_Hh, rCE115L-k0.

(1-2) Purificación de GPC3_ERY22_rCE115

Se agregó el sobrenadante de cultivo obtenido a una
10 columna anti-FLAG M2 (Sigma) y después la columna se lavó, seguido por elución usando 0.1 mg/ml de un péptido FLAG (Sigma). Las fracciones que contienen la molécula de interés se agregaron a una columna HisTrap HP (GE Healthcare), y después la columna se lavó, seguido por elución usando un gradiente de concentración
15 de imidazol. Las fracciones que contienen la molécula de interés se concentraron usando una membrana de filtración, después las fracciones se agregaron a una columna Superdex 200 (GE Healthcare), y cada una de las moléculas purificadas de interés se obtienen recolectando solamente las fracciones monoméricas de
20 la solución eluida.

(1-3) Medición de la actividad citotóxica de GPC3_ERY22_rCE115 usando células mononucleares de sangre periférica

La actividad citotóxica *in vitro* de GPC3_ERY22_rCE115
25 se valoró.

(1-3-1) Preparación de una solución de célula mononuclear de sangre periférica (PBMC).

Usando una jeringa precargada con 100 μ l de 1000 unidades/mL de solución de heparina (Novo Heparin para inyección, 5 5000 unidades, Novo Nordisk), 50 ml de sangre periférica se recolectó de cada voluntario saludable (individuo adulto). Esta sangre periférica se diluyó dos veces en PBS(-), se dividió en cuatro alícuotas y se agregó en un tubo Laucosep para separación de linfocito (Cat. No. 227290, Greiner Bio-One) que ha sido cargado 10 con 15 ml de Ficoll-Paque PLUS y se sometió a centrifugación por adelantado. Este tubo de separación se centrifugó (a 2150 rpm por diez minutos a temperatura ambiente), y después se recolectó la fracción de la célula mononuclear. Las células en la fracción de célula mononuclear se lavaron una vez con el Medio de Eagle 15 Modificado por Dulbecco que contiene 10% de FBS (manufacturado por SIGMA, en lo sucesivo referido como 10% de FBS/D-MEM), y después se prepara por tener una densidad de célula de 4×10^6 células/ml usando 10% de FBS/D-MEM. La suspensión celular preparada por esta forma se usó como la solución PBMC de humano 20 en el experimento de abajo.

(1-3-2) Medición de actividad citotóxica

Se midió la actividad citotóxica por la relación de inhibición de crecimiento celular usando el Analizador de Célula en Tiempo Real xCELLigence (Roche Diagnostic). La línea de célula 25 de cáncer humano NCI-H446 o la línea de célula de cáncer humano

PC-10, la cual expresa GPC3 humano, se usó como la célula objetivo. La NCI-H446 o PC-10 se separaron del disco, después las células se colocaron en la E-Placa 96 (Roche Diagnostics) en alícuotas de 100 µl/pocillo ajustando las células a 1×10^4 células/pocillo, y la medición de células vivas se inició usando el Analizador de Célula en Tiempo Real xCELLigence. Al siguiente día, la placa se removi6 del Analizador de Célula en Tiempo Real xCELLigence, y 50 µl de los anticuerpos respectivos preparados en cada concentración (0.004, 0.04, 0.4, o 40 nM) se agregaron a la placa. Después de 15 minutos de reacción a temperatura ambiente, 50 µl de la solución PBMC de humano preparada en (1-2) se agregó (2×10^5 células/pocillo), y la medición de las células vivas se inició ajustando la placa en el Analizador de Célula en Tiempo Real xCELLigence nuevamente. La reacción se llevó a cabo bajo las condiciones de 5% de gas de di6xido de carbono a 37°C, y del valor de Índice Celular obtenido 72 horas después de la adición del PBMC de humano, la relación de inhibición de crecimiento celular (%) se determin6 usando la siguiente ecuación. El valor de Índice Celular usada en el cálculo fue un valor normalizado en donde el valor de Índice Celular inmediatamente antes de la adición del anticuerpo se define como 1.

$$\text{Relación de inhibición de crecimiento celular (\%)} = (A-B) \times 100 / (A-1)$$

A representa el valor medio de los valores del Índice Celular en pocillos sin la adición del anticuerpo (que contiene

solamente las células objetivo y PBMC de humano), y B representa el valor medio de los valores del Índice Celular en cada pocillo. Los exámenes se realizaron por triplicado.

Cuando las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) preparadas de sangre humana se usaron como la célula 5 efectora para medir la citotoxicidad de GPC3_ERY22_rCE115, se observó una actividad muy fuerte (Fig. 2).

Ejemplo 2 - Humanización de la cadena H del anticuerpo anti-CD3, rCE115, y uso compartido de una cadena L común.

10 (2-1) Diseño de hCE115HA, la región variable de cadena H de rCE115.

La región variable de cadena H del anticuerpo anti-CD3 de rCE115 (SEQ ID NO: 42) se humanizó. Se determinaron CDR y FR como se define por Kabat (numeración Kabat).

15 Primero, una secuencia FR humana se seleccionó comparando las secuencias de la región variable del anticuerpo humano en una base de datos para la secuencia de región variable de rata rCE115. La Base de datos IMGT (<http://www.imgt.org/>) y GenBank HCN1 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) se usaron 20 para la base de datos. Una secuencia de región variable de cadena H humanizada se diseñó enlazando la secuencia CDR de cadena H de la región variable rCE115 con la secuencia FR humana seleccionada. Esto proporcionó una secuencia de región variable de cadena H humanizada, hVCE115HL (SEQ ID NO: 51).

25 El residuo de aminoácido en la posición 93 indicado por

la numeración Kabat es Ala en la secuencia FR3 de cadena H humana, pero es Arg en la secuencia de región variable rCE115. Usando la base de datos de secuencias de línea germinal de rata y humana (Base de datos IMGT (<http://www.imgt.org/>)), solamente pocas
5 secuencias se encontraron que contienen Arg en este sitio. Se reportó que el residuo de aminoácido en la posición 94 indicada por la numeración Kabat contribuye a estabilización de la estructura del anticuerpo por formación del centro superior (Ewert *et al.* Methods, 2004 Oct; 34(2): 184-99). Con base a tal
10 información, una secuencia de región variable de cadena H humanizada, en la cual los residuos de aminoácido en posiciones Kabat 93 y 94 en el FR3 de cadena H se sustituyeron con aquellos residuos presentes en la secuencia de región variable de rCE115, fue nuevamente diseñada. Esto fue la secuencia de región variable
15 de cadena H humanizada, hCE115HA (SEQ ID NO: 52).

(2-2) Diseño de la cadena L común, L0000, para el anticuerpo anti-CD3 de rCE115 y el anticuerpo anti-GPC3.

Se realizó la lanzadera FR/CDR de la región variable de cadena L rCE115L (SEQ ID NO: 43) del anticuerpo anti-CD3 de
20 rCE115 y la región variable de cadena L GL4 (SEQ ID NO: 41) del anticuerpo anti-GPC3.

La secuencia FR de GL4 se seleccionó como la secuencia FR de cadena L. La CDR2 de la cadena L fue la misma para rCE115 y GL4. La CDR1 de cadena L se seleccionó de las secuencias CDR
25 de GL4, y la CDR3 de cadena L se seleccionó de las secuencias CDR

de rCE115L, respectivamente. Además, la CDR3 de cadena L producida sustituyendo el residuo de aminoácido Asp en posición Kabat 94 de la CDR3 de cadena L seleccionada con el residuo Val presente en GL4 fue nuevamente diseñada.

5 Una secuencia de la región variable de cadena L se diseñó enlazando FR y CDR seleccionadas anteriormente. Esto proporcionó una secuencia de la región variable de cadena L, L0000 (SEQ ID NO: 53).

(2-3) Evaluación de la afinidad para GPC3 humano.

10 Se evaluó la actividad de unión de GPC3 humano cuando se usa GL4 (SEQ ID NO: 41) y L0000 (SEQ ID NO: 53) como las regiones variables de cadena L. Esto se realizó usando la forma molecular de un anticuerpo de una sola rama que tiene un Fab en la región Fc de un IgG1 humano heterodimerizado por la técnica botón en el
15 ojal. Se usó H0000 (SEQ ID NO: 40) para la región variable de cadena H del anticuerpo anti-GPC3.

Las constantes de relación de afinidad y unión de un anticuerpo anti-GPC3 para un antígeno se midieron por el método de cinéticas de ciclo múltiple de un ensayo de resonancia de
20 plasmón de la superficie usando Biacore™-T200 (GE Healthcare Japón). Se usó HBS-EP+ (GE Healthcare Japón) por el amortiguador de corrida, y se usó un kit de acoplamiento de amina (GE Healthcare Japón) para covalentemente unir la proteína A/G al chip CM5 (chip recubierto con carboximetil dextrano). Cada anticuerpo anti-GPC3
25 se preparó de manera que aproximadamente 100 RU será capturado

por la Proteína A/G. El GPC3 humano usado como el analito se preparó a 8, 16, 16, 32, 64 y 128 nM usando HBS-EP+. Las mediciones se llevaron a cabo primero permitiendo que la Proteína A/G capturara la solución del anticuerpo, y después inyectando la solución GPC3 humana a una velocidad de flujo de 30 µl/min por tres minutos para permitir que la reacción se lleve a cabo. Después, la solución se cambió a HBS-EP+ y la fase de disociación se midió por 15 minutos. Después del término de la medición de la fase de disociación, el chip sensor se regeneró por lavado con Gly-HCl 10 mM a pH 1.5. La medición en la concentración de 0 fue similarmente llevada a cabo permitiendo a la Proteína A/G capturar a solución del anticuerpo, realizando una inyección de HBS-EP+ de tres minutos para permitir que la reacción se lleve a cabo, y después cambiar a HBS-EP+ para medir la fase de disociación por 15 minutos. Después del término de la medición de la fase de disociación, el chip sensor se regeneró por lavado con Gly-HCl 10 mM a pH 1.5. Se usó un software para análisis de datos exclusivamente por Biacore. Se usó el software Evaluation T200 Biacore Versión 1.0, para realizar los análisis de cinética para calcular la constante de relación de unión (k_a), constante de relación de disociación (k_d) y la proporción de la constante de relación de los sensogramas obtenidos. Los resultados se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6

Región Variable		Afinidad para GPC3 humano		
Región variable de cadena H	Región variable de cadena L	KD (M)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)
H0000	GL4	4.2×10^{-9}	4.3×10^5	1.8×10^{-3}
H0000	L0000	3.6×10^{-8}	3.0×10^5	1.1×10^{-2}

(2-4) Evaluación de la afinidad para CD3 humano

5 Se evaluó la actividad para unir CD3 humano cuando se
usa hCE115HA (SEQ ID NO: 52) como la región variable de cadena
H y L0000 (SEQ ID NO: 53) como la región variable de cadena L.
Esto se realizó usando la forma molecular de un anticuerpo de una
rama única que tiene un Fab único en la región Fc de un IgG1 humano
10 heterodimerizado por la técnica botón en el ojal.

Las constantes de relación de afinidad y unión de un
anticuerpo anti-CD3 para un antígeno se midieron por el método de
cinéticas de un ciclo de un ensayo de resonancia del plasmón de
la superficie usando Biacore™-T200 (GE Healthcare Japón). Se usó
15 HBS-EP+ (GE Healthcare Japón) para el amortiguador de corrida, y
se usó un kit de acoplamiento de amina (GE Healthcare Japón) para
covalentemente unir CD3 humano al chip CM4 (chip recubierto con
carboximetil dextrano). El anticuerpo anti-CD3 usado como el
analito se preparó a 5 y 20 µg/ml usando HBS-EP+. Las mediciones
20 se llevaron a cabo primero inyectando cada uno de 5 y 20 µg/ml de
las soluciones del anticuerpo anti-CD3 por tres minutos
continuamente a una velocidad de flujo de 20 µl/min para permitir
que la reacción se lleve a cabo. Después, la solución se cambió
a HBS-EP+ y la fase de disociación se midió por 3 minutos. Después
25 del término de la medición de la fase de disociación, el chip sensor

se regeneró por lavado con Gly-HCl 10 mM a pH 1.5. La medición a la concentración de 0 se llevó a cabo realizando cada una de las dos inyecciones de HBS-EP+ por tres minutos sucesivamente para permitir que la reacción se lleve a cabo, y después cambiando a HBS-EP+ para medir la fase de disociación por 3 minutos. Después del término de medición de la fase de disociación, el chip sensor se regeneró por lavado con Gly-HCl 10 mM a pH 1.5. Se usó un software para análisis de datos exclusivamente por el Software de Evaluación T200 Biacore Versión 1.0, para realizar los análisis de cinética para calcular la constante de relación de unión (k_a), constante de relación de disociación (k_d), y la proporción de la constante de relación de los sensogramas obtenidos. Los resultados se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7

Región Variable		Afinidad para CD3 humano		
región variable de cadena H	región variable de cadena L	KD (M)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)
rCE115H	rCE115L	1.0×10^{-7}	5.9×10^4	6.0×10^{-3}
hCE115HA	L0000	1.2×10^{-7}	1.9×10^5	2.3×10^{-2}

(2-5) Preparación de GPC3-ERY27_hCE115

Se usó el IgG4 contra un antígeno de cáncer (GPC3) como la estructura básica para producir la molécula ERY27 (Fig. 1b), en la cual la región variable de cadena H de uno de los Fabs ha sido reemplazada con un dominio que se une a épsilon CD3, y la cadena L es común a ambos Fabs. En este caso, el Fc de IgG4 usado como la estructura básica fue un Fc silente con afinidad atenuada

por Fc γ R (un receptor Fc γ). Se usó H0000 (SEQ ID NO: 40) como la región variable de cadena H del dominio que se une a GPC3, y se usó hCE115HA (SEQ ID NO: 52) como la región variable del dominio que se une a CD3. Se usó L0000 (SEQ ID NO: 53) como la región variable
 5 de cadena L. Las mutaciones D356K y K439E introducidas en las cadenas H respectivas se introdujeron para formación de heterómero eficiente de cada cadena H cuando se producen anticuerpos heterodiméricos que comprenden dos tipos de cadenas H (W02006/106905). H435R es una modificación que interrumpe la unión
 10 a la Proteína A, y se introdujo por separación eficiente del heterómero y homómero (W0/2011/078332).

Unas series de vectores de expresión insertados con un polinucleótido que codifica cada uno de H0000-ERY27_HK (SEQ ID NO: 54), hCE115HA-ERY27_HE (SEQ ID NO: 55), y L0000-k0 (SEQ ID
 15 NO: 56) se produjeron por métodos bien conocidos.

La siguiente combinación de los vectores de expresión se introdujo en células FreeStyle 293-F para expresión temporal de cada molécula objetivo.

Molécula Objetivo: GP3_ERY27_hCE115

20 Polipéptidos codificados por los polinucleótidos insertados en los vectores de expresión: H0000-ERY27_HK, hCE115HA-ERY27_HE y L0000-k0.

(2-6) Purificación de GPC3_ERY27_hCE115.

Cada molécula de interés se purificó por el método
 25 descrito en el Ejemplo 1-2.

(2-7) Medición de actividad citotóxica usando células mononucleares de sangre periférica humanas.

(2-7-1) Preparación de una solución de célula mononuclear de sangre periférica.

5 La solución se preparó por el método descrito en el Ejemplo 1-3-1.

(2-7-2) Medición de actividad citotóxica.

Se midió la actividad citotóxica por el método en el Ejemplo 1-3-2.

10 Cuando las PBMCs preparadas de sangre humana se usaron como la célula efectora para medir la citotoxicidad de GPC3_ERY27_hCE115, se observó reducción de actividad como un resultado de humanización de la cadena H de rCE115 y compartir una cadena L común (Fig. 2).

15 **Ejemplo 3 - Producción y evaluación de variantes del anticuerpo biespecífico humanizado para mejorar varias propiedades**

La actividad citotóxica dependiente de la célula T del CD3 ϵ anti-humano humanizado (cadena épsilon CD3 y anticuerpo biespecífico GPC3 anti-humano obtenido en el Ejemplo 2, GPC3_ERY27_hCE115 (SEQ ID NO: 54, 55 Y 56) fue menor que la actividad citotóxica dependiente de la célula T de GPC3_ERY22_rCE115 (SEQ ID NOs: 47, 48, 49 y 50). Esto puede ser debido a la atenuación de la afinidad para GPC3 y la cadena

20

25 CD3 ϵ como un resultado de humanización y compartir una cadena

L común. Con respecto a GPC3 y los antígenos de la cadena CD3 ϵ los cuales tienen secuencia independiente, no se ha reportado hasta aquí en anticuerpos biespecíficos humanizados cuya actividad citotóxica dependiente de la célula T ha sido
5 aumentada y cuya afinidad para ambos antígenos ha sido mejorada usando una cadena L del anticuerpo común. Por lo tanto, se ha considerado difícil obtener anticuerpos con especificidades dobles que muestran una eficacia del fármaco equivalente a o mayor que del de GPC3_ERY22_rCE115.

10 Bajo tales circunstancias, los Solicitantes producen anticuerpos biespecíficos humanizados con afinidad modificada para GPC3 humano y cadena CD3 ϵ humana por métodos conocidos por aquellos expertos en la técnica, lo cual involucra residuos de aminoácido comprensivamente sustituidos codificados por el
15 gen del anticuerpo para producir variantes del anticuerpo contra tanto GPC3 humano como antígenos de cadena CD3 ϵ humana, y realizando varias evaluaciones de selección. Además, se usaron métodos similares para producir anticuerpos biespecíficos humanizados modificados con propiedades
20 fisicoquímicas modificadas. Además, combinando las sustituciones de residuos de aminoácido efectivas para modificar la afinidad y las propiedades fisicoquímicas, se producen anticuerpos biespecíficos optimizados que tienen una actividad TDCC equivalente a o mayor que la citotoxicidad
25 celular dependiente de la célula T de GPC3_ERY22_rCE115 antes

de la humanización.

La introducción de mutaciones de puntos, expresión y purificación de anticuerpos, mediciones de afinidad del antígeno y determinación de citotoxicidad celular dependiente
 5 de la célula T en la optimización de anticuerpos biespecíficos humanizados se realizaron por métodos similares a aquellos en los Ejemplos 1 y 2. Se determinaron CDR y FR de conformidad con la definición Kabat (numeración Kabat).

Dependiendo del objetivo, los siguientes se usaron
 10 como las regiones constantes de cadena H del anticuerpo (los números indican la numeración EU): E22Hh (SEQ ID NO: 57) producida introduciendo las mutaciones L234A/L235A/N297A/D356C/T366S/L368A/Y407V/eliminación G446/supresión K447 en IgG1 humano; E22Hk (SEQ ID NO: 58)
 15 producida introduciendo mutaciones L234A/L235A/N297A/Y349C/T366W/supresión G446/supresión K447 y una mutación de inserción Ser-Ser inmediatamente antes de la posición 118 en IgG1 humano; G1dh producida introduciendo mutaciones D356C/T366S/L368A/Y407V/supresión G446/supresión
 20 K447 en IgG1 humano; ninguno-Hi-Kn010G3 producida introduciendo eliminaciones 118-215 y mutaciones C220S/Y349C/T366W/H435R en IgG1 humano; E279GsKsc (SEQ ID NO: 60) producida introduciendo mutaciones L235R/S239K/N297A/E356K/R409K/H435R/L445P/supresión
 25 G446/supresión K447 en IgG4 humano; E270sEpSc (SEQ ID NO: 61)

producida introduciendo K196Q/L235R/S239K/N297A/R409K/K439E/L445P/supresión G446/supresión K447 en IgG4 humano; y E270sKsc (SEQ ID NO: 62) producida introduciendo L235R/S239K/N297A/E356K/R409K/L445P/

5 supresión G446/supresión K447 en IgG4 humano. Además, la cadena κ humana (kappa) SEQ ID NO: 63) y E22L (SEQ ID NO: 432) producida introduciendo mutaciones R108A/T1098 en la cadena κ humana se usaron como las regiones constantes de la cadena L del anticuerpo.

10 La mutación que sustituye Cys por Asp en la posición 356 de la numeración EU, la mutación que sustituye Ser por The en la posición 366 de la numeración EU, la mutación que sustituye Ala por Leu en la posición 368 de la numeración EU, la mutación que sustituye Val por Tyr en la posición 407 de la numeración

15 EU, la mutación que sustituye Cys por Tyr en la posición 349 en la numeración EU, la mutación que sustituye Trp por Thr en la posición 366 de la numeración EU, y la mutación que inserta Ser-Ser inmediatamente antes de la posición 118 son mutaciones para formación eficiente de moléculas heterodiméricas para

20 cada cadena H cuando se producen anticuerpos heteroméricos. Similarmente, la mutación que sustituye Lys por Glu en la posición 356 de la numeración EU y la mutación que sustituye Glu por Lys en la posición 439 en la numeración EU también son mutaciones para la formación eficiente de las moléculas

25 heterodiméricas para cada cadena H cuando se producen

anticuerpos heteroméricos. Se espera que mejoren la eficiencia de la producción del anticuerpo biespecífico.

La mutación que sustituye Ala por Leu en la posición 234 de la numeración EU, la mutación que sustituye Ala o Arg por Leu en la posición 235 de la numeración EU, la mutación que sustituye Lys por Ser en la posición 239 en la numeración EU, y la mutación que sustituye Ala por Asn en la posición 297 de la numeración EU son mutaciones que disminuyen la afinidad por un receptor $\text{Fc}\gamma$ y un complemento (C1q). Se espera que supriman la unión de Fab a CD3 y el reticulado mediado por Fc de un receptor $\text{Fc}\gamma$ o un complemento, y evita el síndrome que libera citocina que acompaña el mejoramiento de funciones efectoras no específicas.

La cadena H introducida con mutaciones de supresión en las posiciones 118 a 215 de la numeración EU puede ser combinada con una secuencia de cadena H de longitud completa para producir un anticuerpo que tiene únicamente un Fab (anticuerpo monovalente), y es útil para evaluación de afinidad.

La mutación que sustituye Lys por Arg en la posición 409 de la numeración EU y la mutación que sustituye Arg por His en la posición 435 de la numeración EU son mutaciones para modificar las propiedades del anticuerpo para estar cerca a las propiedades de IgG1 humano e IgG3 humano respectivamente.

(3-1) Modificar la afinidad de un anticuerpo anti-CD3

humanizado por mutaciones de punto.

Primero, se introdujeron las mutaciones de punto en FR1, FR2, FR3, CDR1, CDR2 y CDR3 de la secuencia den anticuerpo de cadena CD3 ϵ anti-humano producida en el Ejemplo 2, 5 hCE115HA-ERY27_HE (SEQ ID NO: 55), para preparar anticuerpos modificados. Después, se determinó la afinidad de estos anticuerpos modificados por la cadena CD3 ϵ humana soluble. Los sitios de combinación que tienen un efecto que mejora la afinidad proporcionan anticuerpos modificados que tienen las 10 afinidades mostradas en la Tabla 8.

TABLA 8

	Nombre de Anticuerpo	KD (CD3 Humano)
	hCE115HA-E22Hh/-Hi-Kn010G3/L0000-k0	1.43E-07
	TR01H083-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0212-k0	5.86E-11
	TR01H040-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0240-k0	2.17E-09
	TR01H002-E22Hh/GLS3108-k0/GL4-E22Hh/H0610-E22L	2.04E-09
	TR01H040-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0212-k0	2.17E-09
	TR01H040-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0235-k0	2.81E-09
	TR01H040-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0238-k0	2.91E-09
	TR01H040-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/TR01L016-k0	2.52E-09
	TR01H083-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0262-k0	2.45E-09
	TR01H040-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0207-k0	2.60E-09
	TR01H040-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0241-k0	3.48E-09
	TR01H040-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0242-k0	3.58E-09
	TR01H040-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0206-k0	2.90E-09
	TR01H040-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/TR01L019-k0	3.20E-09
	TR01H080-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	3.25E-09
	TR01H040-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0211-k0	3.22E-09
	TR01H002-E22Hh/-Hi-Kn010G3/GLC3108-k0	4.61E-09
	TR01H040-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0209-k0	4.25E-09
	TR01H040-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0208-k0	4.16E-09
	TR01H040-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0224-k0	5.06E-09
	TR01H040-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0236-k0	5.64E-09
	TR01H083-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0201-k0	4.42E-09
	TR01H084-E2702GsKsc/ninguno-Hi-E2704sE/L0011-k0	4.14E-09
	TR01H040-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0210-k0	5.06E-09
	TR01H114-E2702GsKsc/ninguno-Hi-E2704sE/L0011-k0	4.22E-09
	CE115HA236-E22Hh/GLS3108-k0/GL4-E22Hh/H0610-E22L	6.08E-09
	TR01H077-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0200-k0	6.12E-09
	TR01H071-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0200-k0	6.13E-09
	TR01H111-E2702GsKsc/ninguno-Hi-E2704sE/L0011-k0	4.91E-09
	TR01H081-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0262-k0	5.76E-09
	TR01H001-E22Hh/-Hi-Kn010G3/GLC3108-k0	8.22E-09
	CE115HA179-G1dh/-Hi-Kn010G3/L0000-k0	8.35E-09
	TR01H112-E2702GsKsc/ninguno-Hi-E2704sE/L0011-k0	5.12E-09
	TR01H113-E2702GsKsc/ninguno-Hi-E2704sE/L0011-k0	5.14E-09
	TR01H082-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0212-k0	4.75E-09
	CE115HA236-E22Hh/-Hi-Kn010G3/GLC3108-k0	9.10E-09
	TR01H040-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0231-k0	7.75E-09
	TR01H037-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	6.93E-09
	CE115HA252-E22Hh/-Hi-Kn010G3/L0000-k0	9.48E-09
	TR01H083-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0011-k0	6.70E-09
	TR01H040-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0223-k0	8.15E-09
	TR01H083-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	6.83E-09
	TR01H071-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	8.85E-09
	TR01H067-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0212-k0	5.88E-09
	CE115HA178-G1dh/-Hi-Kn010G3/L0000-k0	1.09E-08
	TR01H040-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0237-k0	1.02E-08
	TR01H083-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0222-k0	9.42E-09
	TR01H084-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0262-k0	8.51E-09
	TR01H071-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0215-k0	9.51E-09
	TR01H040-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0218-k0	8.20E-09
	TR01H081-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0201-k0	9.46E-09
	TR01H071-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0222-k0	1.04E-08
	TR01H040-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0220-k0	9.15E-09
	TR01H067-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/TR01L016-k0	1.09E-08
	TR01H002-E22Hh/GLS3108-k0/GL4-E22Hh/H0000-E22L	4.78E-09
	TR01H067-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/TR01L019-k0	1.21E-08
	TR01H038-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	1.24E-08
	TR01H061-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0200-k0	1.27E-08
	TR01H082-E2702GsKsc/ninguno-Hi-E2704sE/L0011-k0	1.01E-08
	CE115HA180-G1dh/-Hi-Kn010G3/L0000-k0	1.68E-08
	CE115HA251-E22Hh/L0000-k0/GL4-E22Hh/H0610-E22L	1.37E-08
	TR01H100-E2702GsKsc/ninguno-Hi-E2704sE/L0011-k0	1.11E-08
	TR01H040-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0228-k0	1.60E-08
	TR01H081-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0011-k0	1.35E-08
	TR01H061-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0215-k0	1.54E-08
	TR01H110-E2702GsKsc/ninguno-Hi-E2704sE/L0011-k0	1.26E-08
	TR01H043-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	1.52E-08
	TR01H081-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	1.56E-08
	CE115HA251-E22Hh/-Hi-Kn010G3/L0000-k0	2.23E-08
	TR01H091-E2702GsKsc/ninguno-Hi-E2704sE/L0011-k0	1.39E-08
	CE115HA236-E22Hh/GLS3108-k0/GL4-E22Hh/H0000-E22L	6.95E-09
	TR01H084-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0201-k0	1.65E-08
	TR01H072-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	2.03E-08
	TR01H099-E2702GsKsc/ninguno-Hi-E2704sE/L0011-k0	1.46E-08
	TR01H061-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0222-k0	1.88E-08
	TR01H040-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0239-k0	2.31E-08
	TR01H040-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0262-k0	1.81E-08
	TR01H040-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0234-k0	2.40E-08
	TR01H012-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	7.94E-09
	TR01H061-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	1.71E-08
	TR01H040-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0243-k0	2.46E-08
	TR01H109-E2702GsKsc/ninguno-Hi-E2704sE/L0011-k0	1.64E-08
	TR01H047-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	2.04E-08
	TR01H082-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0267-k0	2.29E-08
	TR01H082-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0266-k0	2.29E-08
	TR01H084-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0011-k0	1.98E-08
	TR01H040-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0250-k0	2.15E-08
	TR01H040-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0204-k0	2.21E-08
	TR01H084-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	2.13E-08
	TR01H040-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0213-k0	2.01E-08

	Nombre de Anticuerpo	KD (CD3 Humano)
	hCE115HA-E22Hh/-Hi-Kn010G3/L0000-k0	1.43E-07
	TR01H040-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0214-k0	2.02E-08
	TR01H040-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0217-k0	2.07E-08
	TR01H071-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0226-k0	2.51E-08
	TR01H040-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0200-k0	2.87E-08
	TR01H074-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	2.91E-08
	TR01H039-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	2.61E-08
	CE115HA177-G1dh/-Hi-Kn010G3/L0000-k0	3.55E-08
	TR01H040-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0201-k0	2.81E-08
	TR01H082-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0263-k0	3.09E-08
	TR01H040-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	3.60E-08
	TR01H040-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0216-k0	2.53E-08
5	TR01H051-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	2.91E-08
	TR01H003-E22Hh/-Hi-Kn010G3/L0000-k0	4.03E-08
	TR01H082-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0264-k0	3.44E-08
	TR01H040-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0232-k0	3.86E-08
	TR01H041-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	3.16E-08
	CE115HA122-E22Hh/-Hi-Kn010G3/L0000-k0	4.28E-08
	TR01H040-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0233-k0	4.01E-08
	TR01H040-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0215-k0	3.37E-08
	TR01H040-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0203-k0	3.24E-08
	TR01H015-E2702GsKsc/GCH019-E2704sEpsc/L0000-k0	2.96E-08
	TR01H040-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/TR01L0008-k0	2.93E-08
	TR01H040-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0205-k0	3.42E-08
	TR01H015-E22Hh/L0000-k0/GL4-E22Hh/H0610-E22L	3.57E-08
	TR01H064-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	3.07E-08
	TR01H044-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	3.52E-08
	TR01H082-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0262-k0	3.98E-08
	TR01H062-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	3.13E-08
	CE115HA251-E22Hh/L0000-k0/GL4-E22Hh/H0000-E22L	1.48E-08
	TR01H040-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0011-k0	3.48E-08
10	TR01H040-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0222-k0	4.65E-08
	CE115HA192-E22Hh/-Hi-Kn010G3/L0000-k0	5.05E-08
	TR01H040-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/TR01L010-k0	3.28E-08
	TR01H025-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	3.86E-08
	TR01H082-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/TR01L023-k0	4.25E-08
	TR01H040-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/TR01L015-k0	3.95E-08
	TR01H055-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	3.88E-08
	TR01H082-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0260-k0	4.53E-08
	TR01H040-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/TR01L0009-k0	3.56E-08
	TR01H040-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/TR01L011-k0	3.57E-08
	TR01H017-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	3.50E-08
	CE115HA122-E22Hh/L0000-k0/GL4-E22Hh/H0000-E22L	1.69E-08
	TR01H076-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	4.78E-08
	TR01H082-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0258-k0	4.70E-08
	TR01H046-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	4.23E-08
	rCE115H-G1dh/-Hi-Kn010G3/L0000-k0	5.76E-08
	TR01H082-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/TR01L024-k0	4.76E-08
	TR01H016-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	3.69E-08
	TR01H040-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/TR01L018-k0	4.51E-08
15	TR01H084-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0271-k0	2.76E-08
	TR01H084-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0270-k0	2.76E-08
	TR01H040-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000vk1-k0	4.69E-08
	TR01H040-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0219-k0	3.94E-08
	TR01H014-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	3.87E-08
	TR01H061-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0226-k0	4.71E-08
	TR01H048-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	4.52E-08
	TR01H082-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0259-k0	5.07E-08
	TR01H028-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	4.80E-08
	TR01H082-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0201-k0	4.49E-08
	TR01H040-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/TR01L013-k0	4.15E-08
	TR01H033-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	4.88E-08
	hCE115HA-G1dh/-Hi-Kn010G3/L0000-k0	6.50E-08
	TR01H040-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/TR01L012-k0	4.22E-08
	TR01H065-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	4.31E-08
	TR01H079-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	5.05E-08
	TR01H042-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	4.48E-08
	TR01H063-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	4.35E-08
	TR01H084-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0272-k0	3.10E-08
20	CE115HA121-E22Hh/-Hi-Kn010G3/L0000-k0	6.76E-08
	TR01H026-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	5.12E-08
	TR01H067-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0262-k0	4.92E-08
	TR01H073-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	5.97E-08
	TR01H045-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	5.22E-08
	TR01H007-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	2.17E-08
	TR01H082-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0203-k0	4.07E-08
	TR01H032-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	5.73E-08
	TR01H006-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	2.30E-08
	TR01H013-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	4.94E-08
	TR01H050-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	5.76E-08
	TR01H067-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0200-k0	6.03E-08
	TR01H015-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	6.13E-08
	hCE115HA-E22Hh/L0000-k0/GL4-E22Hh/H0000-E22L	6.16E-08
	hCE115HA-E22stHh/ninguno-Hi-stKn010G3/L0000-k0	5.17E-08
	TR01H069-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	7.11E-08
	TR01H015-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/TR01L003-k0	6.34E-08
	TR01H040-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0202-k0	6.19E-08
	TR01H067-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0201-k0	5.93E-08
	TR01H020-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	6.48E-08
25	TR01H082-E22Hh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0011-k0	5.95E-08

	Nombre de Anticuerpo	KD (CD3 Humano)
	hCE115HA-E22Hh/-Hi-Kn010G3/L0000-k0	1.43E-07
	TR01H082-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/TR01L018-k0	4.72E-08
	TR01H015-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/TR01L005-k0	6.53E-08
	TR01H052-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/L0000-k0	6.27E-08
	TR01H036-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/L0000-k0	6.50E-08
	TR01H067-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/L0203-k0	4.79E-08
	TR01H030-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/L0000-k0	6.54E-08
	TR01H015-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/TR01L001-k0	6.56E-08
	TR01H100-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/L0011-k0	6.25E-08
	TR01H029-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/L0000-k0	6.70E-08
	TR01H019-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/L0000-k0	6.85E-08
5	TR01H082-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/L0000-k0	7.37E-08
	TR01H018-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/L0000-k0	6.93E-08
	TR01H027-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/L0000-k0	6.95E-08
	TR01H049-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/L0000-k0	6.79E-08
	TR01H066-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/L0000-k0	6.02E-08
	TR01H091-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/L0011-k0	6.67E-08
	rCE115H-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/L0000-k0	8.00E-08
	TR01H015-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/TR01L002-k0	7.14E-08
	TR01H040-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/L0226-k0	8.01E-08
	TR01H067-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/TR01L018-k0	5.26E-08
	TR01H093-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/L0011-k0	6.80E-08
	TR01H067-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/L0215-k0	7.41E-08
	TR01H015-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/TR01L004-k0	7.34E-08
	TR01H107-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/L0011-k0	6.91E-08
	TR01H105-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/L0011-k0	6.95E-08
	TR01H090-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/L0011-k0	6.95E-08
	TR01H108-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/L0011-k0	6.98E-08
	TR01H094-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/L0011-k0	7.00E-08
	TR01H109-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/L0011-k0	7.06E-08
	TR01H056-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/L0000-k0	7.32E-08
10	TR01H031-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/L0000-k0	7.55E-08
	TR01H022-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/L0000-k0	7.58E-08
	TR01H092-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/L0011-k0	7.21E-08
	TR01H067-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/L0000-k0	7.15E-08
	TR01H067-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/L0011-k0	7.18E-08
	TR01H040-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/L0248-k0	7.89E-08
	TR01H009-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/L0000-k0	3.15E-08
	TR01H023-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/L0000-k0	7.94E-08
	TR01H096-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/L0011-k0	7.47E-08
	TR01H040-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/TR01L007-k0	6.82E-08
	TR01H054-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/L0000-k0	7.79E-08
	TR01H021-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/L0000-k0	8.05E-08
	TR01H103-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/L0011-k0	7.72E-08
	TR01H099-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/L0011-k0	7.74E-08
	rCE115H-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/L0000vk1-k0	8.52E-08
	TR01H101-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/L0011-k0	7.87E-08
	TR01H053-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/L0000-k0	8.23E-08
15	TR01H035-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/L0000-k0	8.49E-08
	TR01H067-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/TR01L015-k0	8.64E-08
	TR01H104-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/L0011-k0	8.26E-08
	TR01H075-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/L0000-k0	9.88E-08
	TR01H040-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/L0227-k0	1.01E-07
	TR01H102-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/L0011-k0	8.54E-08
	TR01H034-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/L0000-k0	9.11E-08
	TR01H082-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/L0222-k0	1.01E-07
	rCE115H-E22Hh/rCE115L-k0/GL4-E22Hh/H0000-E22L	9.37E-08
	TR01H015-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/TR01L006-k0	9.30E-08
	TR01H040-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/L0246-k0	9.28E-08
	TR01H097-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/L0011-k0	8.76E-08
	TR01H011-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/L0000-k0	3.71E-08
	TR01H010-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/L0000-k0	3.73E-08
	TR01H095-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/L0011-k0	9.09E-08
	TR01H082-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/TR01L020-k0	1.06E-07
	TR01H098-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/L0011-k0	9.14E-08
	TR01H082-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/TR01L017-k0	1.09E-07
	TR01H040-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/L0247-k0	1.00E-07
20	rCE115H-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/rCE115L-k0	1.24E-07
	TR01H004-E22Hh/-Hi-Kn010G3/L0000-k0	1.35E-07
	TR01H067-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/L0222-k0	7.63E-08
	rCE115H-E22Hh/-Hi-Kn010G3/rCE115L-k0	1.38E-07
	TR01H008-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/L0000-k0	4.22E-08
	TR01H070-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/L0000-k0	1.20E-07
	TR01H106-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/L0011-k0	1.00E-07
	TR01H024-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/L0000-k0	1.08E-07
	CE115HA124-E22Hh/-Hi-Kn010G3/L0000-k0	1.43E-07
	TR01H040-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/L0249-k0	1.11E-07
	TR01H082-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/L0271-k0	6.82E-08
	TR01H057-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/L0000-k0	1.12E-07
	TR01H058-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/L0000-k0	1.15E-07
	TR01H068-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/L0000-k0	1.01E-07
	TR01H082-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/L0270-k0	7.42E-08
	TR01H082-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/L0272-k0	7.44E-08
	hCE115HA-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/L0000-k0	1.24E-07
	TR01H082-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/L0268-k0	1.36E-07
	hCE115HAa-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/L0000-k0	1.08E-07
	TR01H067-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/L0226-k0	1.32E-07
25	TR01H067-E22Hh/ninguno. Hi-Kn010G3/L0248-k0	1.39E-07

(3-2) Modificación de la afinidad de un anticuerpo humanizado anti-GPC3

Primero, se introdujeron mutaciones de punto en CDR1, CDR2, y CDR3 de la secuencia de anticuerpo biespecífico GPC3 anti-humano producidas en el Ejemplo 2, H0000-ERY27_HK (SEQ ID NO:54), para preparar anticuerpos modificados. Después, se determinó la afinidad de estos anticuerpos modificados para GPC3 humano soluble. Los sitios de combinación que tienen un efecto que mejora la afinidad proporcionan anticuerpos modificados que tienen las afinidades mostradas en la Tabla 9.

Tabla 9

	Nombre de anticuerpo	KD (GPC3 humano)
5	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	3.97E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0222-k0	1.40E-13
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0258-k0	3.52E-13
	GCH054-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0262-k0	5.25E-13
	GCH060-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0222-k0	6.42E-13
10	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0246-k0	1.21E-12
	GCH057-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0222-k0	1.85E-12
	GCH054-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0249-k0	3.61E-12
	GCH055-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0222-k0	3.90E-12
	GCH094-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0246-k0	4.12E-12
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0249-k0	6.86E-12
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/TR01L017-k0	8.27E-12
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0265-k0	8.70E-12
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0261-k0	1.07E-11
	GCH065-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0262-k0	1.18E-11
15	GCH056-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0262-k0	1.19E-11
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0268-k0	1.69E-11
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/TR01L020-k0	2.24E-11
	GCH054-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0246-k0	3.15E-11
	GCH054-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0222-k0	3.15E-11
	GCH073-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0201-k0	3.50E-11
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0248-k0	5.55E-11
	GCH065-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0201-k0	7.74E-11
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0226-k0	9.30E-11
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0093-k0	1.06E-10
	GCH098-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0201-k0	1.11E-10
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0267-k0	1.79E-10
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0228-k0	2.02E-10
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0262-k0	2.11E-10
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0266-k0	2.13E-10
20	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0264-k0	2.19E-10
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0224-k0	2.43E-10
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0167-k0	2.11E-10
	CE115HA251-E22Hh/L0000-k0/GL4-E22Hh/H0610-E22L	2.36E-10
	TR01H015-E22Hh/L0000-k0/GL4-E22Hh/H0610-E22L	2.63E-10
	CE115HA236-E22Hh/GLS3108-k0/GL4-E22Hh/H0610-E22L	2.67E-10
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0259-k0	3.34E-10
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0227-k0	4.08E-10
	GCH065-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0272-k0	3.93E-10
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0269-k0	4.59E-10
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0223-k0	4.75E-10
	TR01H002-E22Hh/GLS3108-k0/GL4-E22Hh/H0610-E22L	4.75E-10
	GCH054-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0212-k0	5.17E-10
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0208-k0	5.30E-10
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0263-k0	5.64E-10
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0231-k0	5.89E-10
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0143-k0	5.73E-10
	GCH055-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0212-k0	6.14E-10
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0211-k0	6.47E-10
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0238-k0	6.37E-10
25	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0214-k0	6.57E-10
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0243-k0	6.49E-10
	GCH025-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0204-k0	6.70E-10
	GCH054-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/TR01L016-k0	7.63E-10
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0168-k0	6.99E-10
	GCH094-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0271-k0	6.92E-10
	GCH054-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/TR01L019-k0	8.71E-10
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0234-k0	7.78E-10
	GCH098-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0011-k0	8.02E-10
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0204-k0	7.27E-10
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0240-k0	8.48E-10
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0239-k0	8.74E-10
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0212-k0	9.94E-10
	GCH065-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0011-k0	8.84E-10
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0200-k0	1.04E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0124-k0	9.72E-10
	GCH073-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0011-k0	9.10E-10
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/TR01L016-k0	1.08E-09
	GCH054-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0201-k0	1.08E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0090-k0	1.12E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0209-k0	1.12E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0201-k0	1.13E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0161-k0	9.73E-10
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0206-k0	8.65E-10
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0186-k0	1.08E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/TR01L019-k0	1.15E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0085-k0	1.17E-09
	GCH055-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0200-k0	1.13E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0154-k0	1.01E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0229-k0	1.20E-09
	GCH054-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0200-k0	1.18E-09
	GCH094-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0201-k0	1.17E-09

	Nombre del Anticuerpo	KD (GPC3 Humano)
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	3.97E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0205-k0	1.01E-09
	GCH099-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0201-k0	1.29E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0242-k0	1.19E-09
	GCH056-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0201-k0	1.16E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0213-k0	1.25E-09
	GCH060-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0200-k0	1.34E-09
	GCH065-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	1.41E-09
	GCH100-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0201-k0	1.37E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0015-k0	1.31E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0151-k0	1.25E-09
5	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0237-k0	1.31E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0220-k0	1.36E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0155-k0	1.28E-09
	GCH055-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0215-k0	1.52E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0202-k0	1.22E-09
	GCH056-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0215-k0	1.59E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0012-k0	1.55E-09
	GCH054-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0215-k0	1.62E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0215-k0	1.64E-09
	GCH098-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	1.77E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0125-k0	1.71E-09
	GCH057-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0215-k0	1.83E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0217-k0	1.79E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0014-k0	1.82E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0216-k0	1.86E-09
	TR01H015-E2702GsKsc/GCH019-E2704sEpsc/L0000-k0	1.64E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/TR01L015-k0	2.16E-09
10	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/TR01L018-k0	2.17E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0218-k0	1.99E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000vk1-k0	2.16E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0160-k0	2.12E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0047-k0	2.23E-09
	GCH073-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	2.00E-09
	GCH054-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/TR01L015-k0	2.45E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0219-k0	2.28E-09
	GCH094-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0272-k0	2.10E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0149-k0	2.16E-09
	GCH054-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/TR01L018-k0	2.59E-09
	GCH054-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0203-k0	2.48E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0122-k0	2.42E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0134-k0	2.53E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0152-k0	2.36E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0203-k0	2.11E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0075-k0	2.85E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0038-k0	2.75E-09
15	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0011-k0	2.76E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0157-k0	2.60E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0145-k0	2.66E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/TR01L010-k0	2.92E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0009-k0	2.99E-09
	GCH099-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0011-k0	2.78E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0006-k0	3.04E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0173-k0	2.83E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0127-k0	3.12E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0082-k0	3.43E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0064-k0	3.37E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0008-k0	3.30E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0013-k0	3.35E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0140-k0	3.38E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0039-k0	3.41E-09
	GCH043-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	3.74E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/TR01L008-k0	3.48E-09
20	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0148-k0	3.28E-09
	GCH062-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	3.73E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0163-k0	3.38E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0233-k0	3.55E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0230-k0	4.00E-09
	GCH006-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	4.06E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0032-k0	3.72E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0181-k0	3.51E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/TR01L009-k0	3.81E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0141-k0	3.86E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0079-k0	4.23E-09
	GCH094-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0270-k0	3.60E-09
	GCH066-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	4.29E-09
	GCH064-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	4.14E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0066-k0	4.20E-09
	GCH027-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	3.83E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0003-k0	4.01E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0042-k0	4.27E-09
25	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/TR01L011-k0	4.02E-09

	Nombre del anticuerpo	KD (GPC3 Humano)
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	3.97E-09
	GCH015-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	4.14E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0175-k0	3.84E-09
	GCH100-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0011-k0	3.81E-09
	GCH014-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	4.20E-09
	GCH053-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	4.05E-09
	hCE115HA-E22Hh/L0000-k0/GL4-E22Hh/H0000-E22L	4.28E-09
	GCH094-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0011-k0	3.88E-09
	GCH045-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	4.63E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/TR01L012-k0	4.25E-09
5	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0115-k0	4.34E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0044-k0	4.57E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0107-k0	4.38E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0007-k0	4.39E-09
	GCH013-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	4.44E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0045-k0	4.66E-09
	GCH010-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	4.12E-09
	GCH040-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	4.80E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0002-k0	4.43E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0016-k0	4.44E-09
	GCH007-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	4.93E-09
	GCH042-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	4.89E-09
	rCE115H-E22Hh/rCE115L-k0/GL4-E22Hh/H0000-E22L	4.57E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0120-k0	4.54E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0065-k0	4.79E-09
	GCH016-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	4.59E-09
	GCH035-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	4.94E-09
	GCH039-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	4.95E-09
10	GCH099-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	4.24E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0041-k0	4.85E-09
	GCH019-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	4.36E-09
	GCH029-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	5.01E-09
	GCH056-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0011-k0	4.31E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0147-k0	4.38E-09
	GCH034-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	5.09E-09
	GCH003-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	5.20E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0139-k0	4.78E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0089-k0	5.24E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0113-k0	4.82E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0180-k0	4.48E-09
	GCH005-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	5.32E-09
	GCH067-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	5.24E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0187-k0	4.92E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0043-k0	5.14E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0117-k0	4.92E-09
15	GCH061-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	5.13E-09
	GCH022-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	4.92E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0091-k0	5.43E-09
	GCH023-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	4.94E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0062-k0	5.28E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0136-k0	5.04E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/TR01L003-k0	5.08E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0069-k0	5.32E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0123-k0	5.08E-09
	GCH025-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	5.05E-09
	GCH100-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	5.39E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0046-k0	5.45E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0144-k0	4.84E-09
	GCH026-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	5.17E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0138-k0	5.24E-09
	GCH056-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	5.03E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0129-k0	5.28E-09
	GCH032-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	5.74E-09
20	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/TR01L005-k0	5.37E-09
	GCH012-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	5.40E-09
	GCH055-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	5.60E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0104-k0	5.90E-09
	GCH059-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	5.70E-09
	GCH054-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	5.30E-09
	GCH008-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	5.55E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0232-k0	5.38E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0126-k0	5.62E-09
	GCH094-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	5.89E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0132-k0	5.65E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0106-k0	5.66E-09
	GCH054-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0011-k0	5.25E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0109-k0	5.70E-09
	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0063-k0	6.03E-09
	GCH068-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	6.23E-09
	GCH057-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	5.61E-09
25	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0137-k0	5.87E-09

(3.3) Modificación de pI por mutaciones de punto

En una producción comercial de anticuerpos biespecíficos, se requiere un alto nivel de pureza. Cuando se usa cromatografía de intercambio iónico, la modificación del punto isoelectrico molecular (pI) se ha reportado por ser efectiva (PLOS One. 2013; 8(2):e57479). Por lo tanto, las mutaciones de punto para modificaciones de pI se introdujeron en CDR1, CDR2, y CDR3 de la secuencia de anticuerpo GPC3 anti-humana humanizada producida en el Ejemplo 2, H0000-ERY27_HK (SEQ ID NO:54), para preparar anticuerpos modificados. Después, se determinó la afinidad de estos anticuerpos modificados para GPC3 humanos solubles.

Como un resultado, las modificaciones de aminoácido que pueden reducir el pI mientras mantienen la afinidad para GPC3 humano se encontraron por ser las posiciones de aminoácidos 19, 43, 53, y 61, de conformidad con la numeración de Kabat.

La combinación de sitios que muestran efectos de mantener la afinidad para GPC3 humano y reducir el pI proporciona anticuerpos que tienen las afinidades y valores de pI mostrados en la Tabla 10.

Tabla 10

Nombre de anticuerpo (anticuerpo homólogo)	Valor pI calculado (anticuerpo homólogo)	Nombre de anticuerpo (anticuerpo de rama única)	GPC3 KD humano (anticuerpo de rama única)	Sitios de mutación a base de H0610-E2704sEpsc
H0610-E2704sEpsc/L0000-k0	7.8	H0610-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0000-k0	4.16E-09	-
GCH054-E2704sEpsc/L0011-k0	6.2	GCH054-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0011-k0	5.25E-09	K19T/Q43E/P52aG/K53E/G55P/Q61E
GCH065-E2704sEpsc/L0011-k0	6.4	GCH065-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0011-k0	8.84E-10	K19T/Q43E/P52aG/K53P/G55P/Q61E
GCH094-E2704sEpsc/L0011-k0	6.2	GCH094-G1dh/ninguno-Hi-Kn010G3/L0011-k0	4.54E-09	K19T/I37V/P40A/Q43E/I48M/P52aG/K53E/G55P/Q61E

(3-4) Modificación de la capacidad de unión de matriz

extracelular por mutación de punto

Se ha reportado que la unión no específica a la matriz extracelular (ECM) y similares, pueden tener efectos en las farmacocinéticas (MAbs. 2012 Nov-Dic; 4(6):753-60). Por lo tanto, la capacidad de unión a ECM de los anticuerpos modificados obtenidos en el Ejemplo, se determinó por el método descrito en el Ejemplo de Referencia 4. Como un resultado, la cadena CD3 ϵ anti-humana humanizada y el anticuerpo biespecífico GPC3 anti-humano, GPC3_ERY27_hCE115 (SEQ ID NOs: 54, 55 y 56), se confirmaron por tener altas capacidades de unión a ECM. Por lo tanto, algunas de las mutaciones de punto examinadas en los Ejemplos 3-1, 3-2, y 3-3 para la secuencia de anticuerpo de cadena CD3 ϵ anti-humana humanizada hCE115HA-ERY27_HE (SEQ ID NO:55), se investigó por ser una combinación para reducir la capacidad de unión a ECM. Como un resultado, los aminoácidos en las posiciones 11, 16, 53a, 53, 98 y 100 por la numeración de Kabat, se encontraron por contribuir al mantenimiento de afinidad para CD3 ϵ y tener influencia en la reducción de la capacidad de unión a ECM, y se encontraron los anticuerpos con una capacidad de unión a ECM reducida en comparación con aquella de una variante de anticuerpo de la cadena CD3 ϵ anti-humana humanizada y anticuerpo biespecífico GPC3 anti-humano, GPC3_ERY27_hCE115, (Tabla 11).

Tabla 11

	Nombre de anticuerpo	Relación de unión a ECM (estándar = 1)
5	GPC3_ERY22_CE115 (rCE115H-E22Hh/rCE115L-k0/GL4-E22Hk/H0000-E22L)	4.0
	GPC3_ERY27 (hCE115HA-E22Hh/L0000-k0/GL4-E22Hk/H0000-E22L)	50.9
	CE115HA236-E22Hh/GLS3108-k0/GL4-E22Hk/H0610-E22L	429.9
	CE115HA236-E22Hh/GLS3108-k0/GL4-E22Hk/H0000-E22L	414.8
	CE115HA251-E22Hh/L0000-k0/GL4-E22Hk/H0000-E22L	346.9
10	CE115HA251-E22Hh/L0000-k0/GL4-E22Hk/H0610-E22L	334.4
	TR01H002-E22Hh/GLS3108-k0/GL4-E22Hk/H0610-E22L	301.1
	TR01H002-E22Hh/GLS3108-k0/GL4-E22Hk/H0000-E22L	216.9
	TR01H015-E22Hh/L0000-k0/GL4-E22Hk/H0610-E22L	185.7
	TR01H040-E2702GsKsc/H0610-E2704sEpsc/L0208-k0	50.4
	CE115HA122-E22Hh/L0000-k0/GL4-E22Hk/H0000-E22L	47.0
	TR01H040-E2702GsKsc/H0610-E2704sEpsc/L0211-k0	15.5
	TR01H040-E2702GsKsc/H0610-E2704sEpsc/L0206-k0	15.4
	TR01H040-E2702GsKsc/H0610-E2704sEpsc/L0209-k0	7.4
	rCE115H-E22Hh/rCE115L-k0/GL4-E22Hk/H0610-E22L	4.6
15	TR01H040-E2702GsKsc/H0610-E2704sEpsc/L0204-k0	4.4
	TR01H067-E2702GsKsc/GCH054-E2704sEpsc/L0212-k0	3.3
	TR01H113-E2702GsKsc/GCH065-E2704sEpsc/L0011-k0	2.5
	TR01H082-E2702GsKsc/GCH065-E2704sEpsc/L0011-k0	1.7
	TR01H113-E2702GsKsc/GCH094-E2704sEpsc/L0011-k0	1.6
	rCE115H-E22Hh/rCE115L-k0/L0000-E22Hk/H0610-E22L	1.4
	TR01H084-E2702GsKsc/GCH065-E2704sEpsc/L0011-k0	1.3
	TR01H084-E2702GsKsc/GCH094-E2704sEpsc/L0011-k0	1.2
	TR01H082-E2702GsKsc/GCH094-E2704sEpsc/L0201-k0	1.1
	TR01H040-E2702GsKsc/H0610-E2704sEpsc/L0000-k0	0.8
	TR01H040-E2702GsKsc/H0610-E2704sEpsc/L0201-k0	0.8
	TR01H040-E2702GsKsc/H0610-E2704sEpsc/L0203-k0	0.8
	TR01H082-E2702GsKsc/GCH094-E2704sEpsc/L0011-k0	0.7
	TR01H109-E2702GsKsc/GCH065-E2704sEpsc/L0011-k0	0.7
	TR01H067-E2702GsKsc/GCH054-E2704sEpsc/L0222-k0	0.6
20	TR01H067-E2702GsKsc/GCH054-E2704sEpsc/L0201-k0	0.5
	TR01H109-E2702GsKsc/GCH094-E2704sEpsc/L0011-k0	0.4
	TR01H113-E2702GsKsc/GCH065-E2704sEpsc/L0011-k0	0.3
	MRAH-G1d/MRAL-k0 (estándar)	1

(3-5) Modificación de la capacidad de unión al ligando

SuRe™ por mutaciones de punto

25 Se conoce un ejemplo donde la unión de un anticuerpo

a la Proteína A depende de su secuencia de región variable (VH3). (J. Biomol Tech. 2011 Jul; 22(2):50-2). En la purificación de la Proteína A de la cadena CD3 ϵ anti-humana humanizada y anticuerpo biespecífico GPC3 anti-humano, la remoción del anticuerpo anti-CD3 homomérico es importante para suprimir reacciones no específicas mediante CD3. Por lo tanto, se considera deseable suprimir la unión del anticuerpo anti-CD3 homomérico a la Proteína A. Presumiblemente, el ligando SuRe™ se usará en producción comercial, y de este modo las mutaciones de punto para la unión del ligando SuRe™ se introducen en CDR2 de las variantes de la cadena H de anticuerpo anti-CD3 humanizadas, TR01H082-E270GsKsc y TR01H084-E270GsKsc (SEQ ID NO: 398 y 399), para preparar anticuerpos humanizados. La capacidad de unión de estos anticuerpos modificados al ligando SuRe™ se determinó por el método descrito en el Ejemplo de Referencia 5. Como un resultado, los aminoácidos en las posiciones 19, 57, y 59 por la numeración Kabat se encontraron por contribuir al mantenimiento de la afinidad para CD3 ϵ y tener influencia en la capacidad de unión al ligando SuRe™, y se encontraron anticuerpos con una capacidad de unión reducida al ligando SuRe™ en comparación con aquella de TR01H082-E2702GsKsc/L0011-k0 (SEQ ID NOs: 398 y 410) o TR01H084-E2702GsKsc/L0011-k0 (SEQ ID NOs: 399 y 410) (Tabla 12).

Tabla 12

	Nombre del anticuerpo	Unión SuRe™ (RU)	Sitios de mutación a base de CE115HA000
5	TR01H084-E2702GsKsc/L0011-k0	5065.8	R16G/A52aD/N53Q/D72A/L78I/G98A/Y100G/A102I
	TR01H082-E2702GsKsc/L0011-k0	4469.2	V11L/A52aD/N53Q/G98A/Y100G
	TR01H090-E2702GsKsc/L0011-k0	3606.3	V11L/R16G/A52aD/N53Q/G98A/Y100G
	TR01H093-E2702GsKsc/L0011-k0	2459.7	V11L/A52aD/N53Q/K64Q/G98A/Y100G
	TR01H094-E2702GsKsc/L0011-k0	2351.9	V11L/A52aD/N53Q/K64S/G98A/Y100G
10	TR01H114-E2702GsKsc/L0011-k0	1485.5	R16G/A52aD/N53Q/T57S/D72A/L78I/G98A/Y100G/A102I
	TR01H092-E2702GsKsc/L0011-k0	1159.5	V11L/A52aD/N53Q/K64A/G98A/Y100G
	TR01H100-E2702GsKsc/L0011-k0	383.0	V11L/A52aD/N53Q/T57S/G98A/Y100G
	TR01H111-E2702GsKsc/L0011-k0	50.7	R16G/R19K/A52aD/N53Q/D72A/L78I/G98A/Y100G/A102I
	TR01H110-E2702GsKsc/L0011-k0	29.5	R19K/A52aD/N53Q/G98A/Y100G
	TR01H091-E2702GsKsc/L0011-k0	27.5	V11L/R19K/A52aD/N53Q/G98A/Y100G
	TR01H091-E2702GsKsc/L0011-k0	15.0	V11L/R19K/A52aD/N53Q/G98A/Y100G
	TR01H112-E2702GsKsc/L0011-k0	8.8	R16G/A52aD/N53Q/T57Q/D72A/L78I/G98A/Y100G/A102I
	TR01H113-E2702GsKsc/L0011-k0	7.0	R16G/A52aD/N53Q/Y59V/D72A/L78I/G98A/Y100G/A102I
	TR01H096-E2702GsKsc/L0011-k0	2.7	V11L/A52aD/N53Q/T57G/G98A/Y100G
15	TR01H109-E2702GsKsc/L0011-k0	2.2	V11L/A52aD/N53Q/Y59V/G98A/Y100G
	TR01H098-E2702GsKsc/L0011-k0	1.6	V11L/A52aD/N53Q/T57P/G98A/Y100G
	TR01H107-E2702GsKsc/L0011-k0	1.4	V11L/A52aD/N53Q/Y59Q/G98A/Y100G
	TR01H103-E2702GsKsc/L0011-k0	1.4	V11L/A52aD/N53Q/Y59G/G98A/Y100G
	TR01H104-E2702GsKsc/L0011-k0	1.0	V11L/A52aD/N53Q/Y59I/G98A/Y100G
	TR01H105-E2702GsKsc/L0011-k0	0.8	V11L/A52aD/N53Q/Y59L/G98A/Y100G
	TR01H099-E2702GsKsc/L0011-k0	0.6	V11L/A52aD/N53Q/T57Q/G98A/Y100G
	TR01H102-E2702GsKsc/L0011-k0	0.5	V11L/A52aD/N53Q/Y59F/G98A/Y100G
	TR01H101-E2702GsKsc/L0011-k0	0.5	V11L/A52aD/N53Q/T57V/G98A/Y100G
	TR01H108-E2702GsKsc/L0011-k0	0.4	V11L/A52aD/N53Q/Y59T/G98A/Y100G
15	TR01H097-E2702GsKsc/L0011-k0	0.1	V11L/A52aD/N53Q/T57L/G98A/Y100G
	TR01H106-E2702GsKsc/L0011-k0	0.0	V11L/A52aD/N53Q/Y59P/G98A/Y100G
	TR01H095-E2702GsKsc/L0011-k0	-0.2	V11L/A52aD/N53Q/T57F/G98A/Y100G

(3-6) Producción de anticuerpos biespecíficos optimizados por combinación de mutaciones de punto que conducen a mejoramiento de varias propiedades

Los anticuerpos modificados optimizados pueden ser producidos combinando las mutaciones de punto que conducen al mejoramiento de varias propiedades como se describe en los Ejemplos 3-1 a 3-5. Como ejemplos de tales anticuerpos modificados, se produjeron los anticuerpos descritos en la Tabla 13, y se sometieron a la evaluación de citotoxicidad celular dependiente de células T (TDCC) usando métodos similares a

aquellos del Ejemplo 1. Los resultados se muestran en las Figuras 4a a 9b. Como un resultado, se obtuvieron la cadena CD3 ϵ anti-humana humanizada optimizada y anticuerpos biespecíficos GPC3 anti-humanos que muestran una citotoxicidad celular dependiente de células T equivalente a, o mayor que aquella de GPC3_ERY22_rCE115 previo a la humanización.

Tabla 13

Número de muestra en ensayo TDCC		Nombre de anticuerpo
10	1	GPC3_ERY22_CE115 (rCE115H-E22Hh/rCE115L-k0/GL4-E22Hk/H0000-E22L)
	2	GPC3_ERY27 (hCE115HA-E22Hh/L0000-k0/GL4-E22Hk/H0000-E22L)
	3	CE115HA251-E22Hh/L0000-k0/GL4-E22Hk/H0000-E22L
	4	CE115HA236-E22Hh/GLS3108-k0/GL4-E22Hk/H0000-E22L
	5	TR01H002-E22Hh/GLS3108-k0/GL4-E22Hk/H0000-E22L
	6	CE115HA122-E22Hh/L0000-k0/GL4-E22Hk/H0000-E22L
	7	rCE115H-E22Hh/rCE115L-k0/L0000-E22Hk/H0610-E22L
	8	rCE115H-E22Hh/rCE115L-k0/GL4-E22Hk/H0610-E22L
15	13	TR01H040-E2702GsKsc/H0610-E2704sEpsc/L0000-k0
	14	TR01H040-E2702GsKsc/H0610-E2704sEpsc/L0201-k0
	15	TR01H040-E2702GsKsc/H0610-E2704sEpsc/L0203-k0
	16	TR01H040-E2702GsKsc/H0610-E2704sEpsc/L0204-k0
	17	TR01H040-E2702GsKsc/H0610-E2704sEpsc/L0206-k0
	18	TR01H040-E2702GsKsc/H0610-E2704sEpsc/L0208-k0
	19	TR01H040-E2702GsKsc/H0610-E2704sEpsc/L0209-k0
	20	TR01H040-E2702GsKsc/H0610-E2704sEpsc/L0211-k0
	21	rCE115H-E2702GsKsc/H0610-E2704sEpsc/L0000-k0
	22	TR01H061-E2702GsKsc/H0610-E2704sEpsc/L0000-k0
	23	TR01H068-E2702GsKsc/H0610-E2704sEpsc/L0000-k0
	24	TR01H071-E2702GsKsc/H0610-E2704sEpsc/L0000-k0
20	25	TR01H067-E2702GsKsc/GCH054-E2704sEpsc/L0201-k0
	26	TR01H067-E2702GsKsc/GCH054-E2704sEpsc/L0212-k0
	27	TR01H067-E2702GsKsc/GCH054-E2704sEpsc/L0222-k0
	28	TR01H067-E2702GsKsc/ GCH054-E2704sEpsc/L0000-k0
	29	TR01H082-E2702GsKsc/GCH094-E2704sEpsc/L0201-k0
	30	TR01H082-E2702GsKsc/GCH094-E2704sEpsc/L0011-k0
	31	TR01H084-E2702GsKsc/GCH094-E2704sEpsc/L0011-k0
	32	TR01H084-E2702GsKsc/GCH065-E2704sEpsc/L0011-k0
	33	TR01H082-E2702GsKsc/GCH065-E2704sEpsc/L0011-k0
	34	TR01H109-E2702GsKsc/GCH094-E2704sEpsc/L0011-k0
	35	TR01H109-E2702GsKsc/GCH065-E2704sEpsc/L0011-k0
	36	TR01H113-E2702GsKsc/GCH094-E2704sEpsc/L0011-k0
	37	TR01H113-E2702GsKsc/GCH065-E2704sEpsc/L0011-k0
	38	TR01H113-E2702sKsc/GCH065-E2704sEpsc/L0011-k0

Los Ejemplos 3-1 a 3-6 muestran que los siguientes residuos de aminoácido, por ejemplo, son importantes para mantener

las propiedades de la cadena CD3 ϵ anti-humana optimizada y anticuerpos biespecíficos GPC3 anti-humanos que muestran una citotoxicidad celular dependiente de las células T equivalente a, o mayor que aquella de GPC3_ERY33_rCE115 previo a la humanización.

En anticuerpos de cadena CD3 ϵ anti-humanos, los ejemplos son Leu en la posición 11, Gly en la posición 16, Asp en la posición 52a, Gln en la posición 53, Ala en la posición 72, Ile en la posición 78, Ala en la posición 98, Gly en la posición 100, e Ile en la posición 102. En anticuerpos GPC3 anti-humanos, los ejemplos son Thr en la posición 19, Glu en la posición 43, Gly en la posición 52a, Pro o Glu en la posición 53, Pro en la posición 55, y Glu en la posición 61. Además, en cadenas L de anticuerpo común, los ejemplos son Pro en la posición 25, Pro en la posición 27a, Pro en la posición 27b, Ile en la posición 33, Gln en la posición 34, Arg o Trp en la posición 56, y Tyr en la posición 89. (Todas las posiciones están indicadas por la numeración de Kabat).

Ejemplo 4

Evaluación de la eficacia *in vivo*

Se evaluaron algunos de los anticuerpos descritos anteriormente por su eficacia *in vivo* usando modelos que portan tumor.

La evaluación de la eficacia *in vivo* se llevó a cabo en anticuerpos representante de entre aquellos mostrados en la

Tabla 13, los cuales han sido confirmados por tener actividades citotóxicas a partir del ensayo *in vitro* descrito en el Ejemplo 3-6. En la evaluación de la eficacia *in vivo*, cualquier influencia causada por las diferencias en el microambiente debido a la formación de agregado tumoral en los resultados de evaluación, se tomó en consideración. Por lo tanto, dos tipos de líneas de células de cáncer humano que tienen diferentes sensibilidades a la eficacia de fármaco de anticuerpo, es decir, PC-10 y NCI-H446, se usaron para la evaluación, aún a pesar que los niveles de expresión de GPC3 de estas líneas celulares fue casi igual. Estas líneas celulares se transplantaron en ratones scid NOD, y los ratones scid NOD con formación de tumor confirmada se sometieron a transplante de células T que crecen por cultivo *in vitro* de PBMC humanos. Los ratones (referidos como un modelo inyectado de células T), se trataron por administración de la cadena CD3 ϵ anti-humana optimizada y los anticuerpos biespecíficos GPC3 anti-humanos.

Más específicamente, en pruebas de eficacia de fármaco de la cadena CD3 ϵ anti-humana optimizada y anticuerpos biespecíficos GPC3 anti-humanos usando el modelo inyectado de células T PC-10, se realizaron las siguientes pruebas. Las células T se cultivaron expansivamente usando PBMCs separadas de la sangre recolectada de voluntarios sanos y la activación de células T/kit de expansión/humano (Macs Miltenyiii biotec). La línea de células de cáncer humano PC-10 (1×10^7 células), se mezcló con Matriz de

Membrana de Base Matrigel™ (BD), y se transplantó a la región subcutánea inguinal de ratones scid NOD (CLEA Japón, hembra, 6W). El día del trasplante se definió como el día 0. El día antes del trasplante, el anticuerpo anti-asialo-GM1 (Wako Pure
5 Chemicals), se administró intraperitonealmente a los ratones a 0.2 mg/ratón. En los días 13 a 15 después del trasplante, los ratones se separaron en grupos de conformidad con su peso corporal y tamaño del tumor, y el anticuerpo anti-asialo-GM1 se administró nuevamente intraperitonealmente a los ratones a 0.2 mg/ratón. En
10 el siguiente día, las células T obtenidas por el cultivo expansivo mencionado anteriormente, se transplantaron peritonealmente a 3×10^7 células/ratón. Cuatro horas después del trasplante, la cadena CD3 ϵ anti-humana optimizada y anticuerpos biespecíficos GPC3 anti-humanos se administraron intravenosamente a través de
15 la vena caudada a 1 mg/kg. La cadena CD3 ϵ anti-humana optimizada y anticuerpos biespecíficos GPC3 anti-humanos, se administraron solamente una vez.

Como un resultado, las actividades anti-tumorales fueron claramente observadas en el grupo administrado con la
20 cadena CD3 ϵ anti-humana optimizada y anticuerpo biespecífico GPC3 anti-humano que en el grupo administrado con solvente (Figs. 10a, 10b).

Las pruebas de eficacia de fármaco para la cadena CD3 ϵ anti-humana optimizada y anticuerpos biespecíficos GPC3
25 anti-humanos en el modelo inyectado con células T NCI-H446 se

realizaron por método similares. La cadena CD3 ϵ anti-humana optimizada y anticuerpos biespecíficos GPC3 anti-humanos se administraron una vez intravenosamente a través de la vena caudada a 5 mg/kg contra NCI-H446.

5 Como un resultado, las actividades anti-tumorales fueron más claramente observadas en el grupo administrado con cadena CD3 ϵ anti-humana optimizada y anticuerpo biespecífico GPC3 anti-humano que en el grupo administrado con solvente (Figs. 11a, 11b).

10 Ejemplos de Referencia

Ejemplo de Referencia 1 - Producción de vectores de expresión del anticuerpo, y expresión y purificación del anticuerpo

Se introdujeron sustituciones de aminoácido por
15 métodos conocidos por aquellos expertos en la técnica tal como usando el kit de Mutagénesis de Sitio Dirigido QuikChange (Stratagene), PCR, o el kit de clonación de PCR Advantage In-fusión (TAKARA) para construir vectores de expresión. Las secuencias de nucleótido de los vectores de expresión obtenidos se determinaron
20 por un método conocidos por aquellos expertos en la técnica. Los plásmidos producidos se introdujeron temporalmente en células de la línea de células derivada de cáncer renal embrionario humano HEK293H (Invitrogen) o FreeStyle293 (Invitrogen) para expresar anticuerpos. De los sobrenadantes de cultivo obtenidos, los
25 anticuerpos se purificaron usando el Flujo Rápido de rProteína

A de Sepharose™ (GE Healthcare) por un método conocido por aquellos expertos en la técnica. La absorbancia a 280 nm de las soluciones de anticuerpo purificadas se midieron usando un espectrofotómetro, y las concentraciones de anticuerpo se
5 calcularon a partir de los valores determinados usando un coeficiente de absorción calculado por el método PACE (Protein Science 1995; 4:2411-2423).

**Ejemplo de Referencia 2 - Actividad de ADCC de cada anticuerpo de prueba usando células mononucleares de sangre
10 periférica humana como la célula efectora**

La actividad ADCC de cada anticuerpo de prueba se determinó de conformidad con el método siguiente.

Células mononucleares de sangre periférica humana (posteriormente referidas como PBMC humanas) se usaron como la
15 célula efectora para medir la actividad ADCC de cada anticuerpo de prueba como sigue.

(1) Preparación de una solución de PBMC humanas

A partir de voluntarios sanos (macho adulto) de Chugai Pharmaceutical Co. Ltd., 50 mL de sangre periférica se recolectó
20 usando una jeringa precargada con 200 µL de solución de 1000 unidades/mL de heparina (Inyección 5000 unidades de Novo-Heparina, Novo Nordisk). La sangre periférica se diluyó dos veces con PBS(-), dividida en cuatro alícuotas, y se agregó en un tubo de separación de linfocito Leucosep (Greiner Bio-one) que ha
25 sido cargado con 15 mL de Ficoll-Plaque PLUS y sometido a

centrifugación por adelantado. Este tubo de separación que contiene alícuotas de sangre periférica se centrifugó a 2150 rpm por diez minutos a temperatura ambiente, y después se recolectó la fracción de células mononucleares. Las células en cada fracción se lavaron
5 dos veces con Medio Eagle Modificado de Dulbecco (SIGMA), que contiene 10% de FBS (posteriormente referido como 10% de FBS/D-MEM) y después se suspendió en 10% de FBS/D-MEM a una densidad celular de 5×10^6 células/mL. Después de la incubación en una incubadora a 37°C por una hora, las células se lavaron una vez con 10% de
10 FBS/D-MEM, y las células se suspendieron en 10% de FBS/D-MEM para producir una densidad celular de 2×10^5 células/mL. La suspensión celular se sometió al experimento siguiente como la célula objetivo.

(2) Ensayo de liberación de cromo (actividad de ADCC)

15 La actividad de ADCC se evaluó a partir de la velocidad específica de liberación de cromo de conformidad con el método de liberación de cromo. Primero, las soluciones de anticuerpo preparadas en cada concentración (0, 0.004, 0.04, 0.4, y 40 µg/mL) se agregaron a una placa de fondo en U de 96 pocillos a 50 µL por
20 cavidad. Después, las células objetivo se seleccionaron a 50 µL por pocillo (1×10^4 células/pocillo), y esto se dejó reposar a temperatura ambiente por 15 minutos. La solución de PBMC humanas preparada en (1) se agregó a 100 µL por pocillo (5×10^5 células/pocillo), y la placa se dejó reposar en una incubadora
25 a 5% de gas de dióxido de carbono a 37°C por cuatro horas, seguido

por centrifugación. La radioactividad de 100 µL de sobrenadante de cultivo en cada pocillo de la placa se midió usando un contador gamma. La velocidad específica de liberación de cromo se determinó con base en la siguiente ecuación:

$$5 \quad \text{Velocidad específica de liberación de cromo (\%)} = (A-C) \times 100/(B-C).$$

En esta ecuación, A representa el volumen medio de la radioactividad (cpm) de 100 µL de sobrenadante de cultivo en cada pocillo; B representa el valor medio de radioactividad (cpm) de 10 100 µL de sobrenadante de cultivo en el pocillo, donde 100 µL de una solución NP-40 acuosa al 2% (Nonidet P-40, Nacalai Tesque) y 50 µL de 10% de FBS/D-MEM ha sido agregada a las células objetivo; y C representa el valor medio de radioactividad (cpm) de 100 µL de sobrenadante de cultivo en el pocillo, donde 150 µL de 10% de 15 FBS/D-MEM ha sido agregado a las células objetivo. Se realizaron exámenes por triplicado y los valores medios y las desviaciones estándares de las velocidades de liberación de cromo específicas (%) en la examinación mencionada anteriormente que reflejan la actividad de ADCC, se calcularon a partir de cada uno 20 de los anticuerpos de prueba.

Ejemplo de Referencia 3 - Evaluación de T_m de anticuerpos modificados por fluorimetría de barrido diferencial

En esta examinación, el valor de la T_m (temperatura de desnaturalización térmica) de los anticuerpos modificados se 25 evaluó por fluorimetría de barrido diferencial usando Rotor-Gene

Q (QIAGEN). Se ha reportado que este método tiene una correlación favorable con la evaluación de T_m usando una calorimetría de barrido diferencial ampliamente conocida como un método para evaluar la estabilidad térmica de anticuerpos (Journal of
5 Pharmaceutical Science 2010; 4:1707-1720).

Se diluyó anaranjado SYPRO™ concentrado 5000x (Molecular Probes) con PBS (Sigma), y después se mezcló con las soluciones de anticuerpo para preparar las muestras de medición. Veinte μ L de alícuotas de cada muestra se colocaron en tubos de
10 medición, y la temperatura se incrementó desde 30°C hasta 99°C a una velocidad de elevación de temperatura de 240°C/HR. Los cambios en la fluorescencia que acompañan a la elevación de temperatura se detectaron a 470 nm (longitud de onda de excitación)/555 nm (longitud de onda de fluorescencia).

15 Los datos se analizaron usando software Series Q de Rotor-Gene (QIAGEN) para calcular la temperatura en la cual se observó la transición de fluorescencia, y esta temperatura se definió como la T_m .

20 **Ejemplo de Referencia 4 - Evaluación de la capacidad de unión a ECM**

La evaluación se llevó a cabo de conformidad con el método descrito en el documento W02012093704. Específicamente, se preparó BD Matrigel (BD Biosciences, #356237) a 2 mg/mL usando TBS (Takara, #T903), y este se suspendió en una placa de medición
25 de 96 pocillos (Meso Scale Discovery, #L15XB-3(High Bind)) a 5

μL por pocillo y después se dejó reposar durante la noche en un lugar frío. Después, 150 μL de un amortiguador de bloqueo ECL (PBS que contiene 0.05% de Tween 20, 0.5% de BSA, y 0.01% de azida de sodio), se dispensó en cada pocillo de la placa, y esta se dejó
5 reposar a temperatura ambiente por dos horas o más.

Un IgG(γ) anti-humano de cabra (Invitrogen, #628400) fue etiquetado con rutenio con Éster de NHS ETIQUETA SULFO MSD (Meso Scale Discovery, #R91AN-2), siguiendo las instrucciones adjuntas. Este se diluyó en amortiguador de elución de ECL (PBS
10 que contiene 0.01% de Tween20, 0.1% de BSA, y 0.02% de azida de sodio), para tener una concentración final de 2 μg/mL. Además, el anticuerpo estándar y los anticuerpos de prueba se diluyeron en PBS-T (PBS que contiene 0.05% de Tween 20 y 0.01% de azida de sodio) para tener una concentración final de 3 μg/mL.

15 A una placa de reacción de 96 pocillos (Thermo scientific, Nunc #145399), se agregaron secuencialmente 10 μL de amortiguador de dilución ECL, 20 μL del anticuerpo estándar y anticuerpo de prueba (3 μg/mL), y 30 μL del anticuerpo etiquetado con rutenio (2 μg/mL), y esta se dejó reaccionar por una hora a
20 temperatura ambiente con agitación en la oscuridad.

El amortiguador de bloqueo ECL se removió de la placa de medición de 96 pocillos por inclinación, se agregaron 50 μL de la solución de muestra de la placa de reacción de 96 pocillos, y esta se dejó reposar en la oscuridad a temperatura ambiente por
25 una hora. Esto se siguió por la remoción de la solución de muestra

de la placa de medición de 96 pocillos por inclinación, e inmediatamente después de la adición de 150 μ L de amortiguador T 2x (Amortiguador de Lectura T MSD 4x (Meso Scale Discovery(diluido dos veces usando amortiguador de dilución ECL), se tomaron
5 mediciones de ECL. Se usó SECTOR Imager 2400 (Meso Scale Discovery), para tomar las mediciones.

Se llevaron a cabo análisis dividiendo la intensidad de fluorescencia del anticuerpo de prueba por la intensidad de fluorescencia del anticuerpo estándar para calcular y comparar
10 las intensidades definiendo el valor del anticuerpo estándar por ser 1.

Ejemplo 5 - Evaluación de la capacidad de unión del ligando SuRe™

La capacidad para unirse al ligando SuRe™ se evaluó
15 usando Biacore™-T200 (GE Healthcare Japón). Se usó HBS-EP+ (GE Healthcare Japón) para el amortiguador de corrida, y un kit de acoplamiento de amina (GE Healthcare Japón), se usó para unir covalentemente el ligando Mab Selec SuRe™ (GE Healthcare Japón) al chip CM5 (chip recubierto de carboximetil dextrano). El
20 anticuerpo usado como el analito se preparó a 5 μ g/mL usando HBS-EP+. Se llevaron a cabo mediciones inyectando primero la solución de anticuerpo de 5 μ g/mL a una velocidad de flujo de 10 μ L/min por 3 minutos, después se intercambió a HBS-EP+, y se midió la respuesta (RU) después de permitir al flujo continuar por 0.5
25 minutos. Después de la terminación de las mediciones, el chip

sensor se regeneró lavando con 10 mM de Gly-HCl a pH 1.5. Para la celda de flujo de control, se realizó un experimento similar sin unión covalente del ligando al chip, y se analizó la afinidad del ligando SuRe™ tomando la diferencia entre las respuestas (RU).

5 Las secuencias que corresponden a las SEQ ID NOS mencionadas en la presente, son mostradas en la Tabla siguiente.

Tabla 14

SEQ ID NO:	Nombre	SEQ ID NO:	Nombre	SEQ ID NO:	Nombre
1	Secuencia de nucleótido GPC3 (NM_001164617.1)	81	TR01H018	154	TR01H099
2	Secuencia de nucleótido GPC3 (NP_001158089.1)	82	TR01H019	155	TR01H100
3	Secuencia de señal	83	TR01H020	156	TR01H101
4	Péptido de cadena- α del receptor de células T (CAA26636.1)	84	TR01H021	157	TR01H102
5	Péptido de cadena- β del receptor de células T (C25777)	85	TR01H022	158	TR01H103
6	Péptido de cadena γ 1 del receptor de células T (A26659)	86	TR01H023	159	TR01H104
7	Péptido de cadena γ 2 del receptor de células T (AAB63312.1)	87	TR01H024	160	TR01H105
8	Péptido de cadena δ 3 del receptor de células T (AAA61033.1)	88	TR01H025	161	TR01H106
9	nucleótido de cadena γ (NM_000073.2)	89	TR01H026	162	TR01H107
10	nucleótido de cadena δ (NM_000732.4)	90	TR01H027	163	TR01H108
11	nucleótido de cadena ε (NM_000733.3)	91	TR01H028	164	TR01H109
12	péptido de cadena γ (NP_000064.1)	92	TR01H029	165	TR01H110
13	péptido de cadena δ (NP_000723.1)	93	TR01H030	166	TR01H111
14	péptido de cadena ε (NP_000724.1)	94	TR01H031	167	TR01H112
15~22	Enlazador peptídico	95	TR01H032	168	TR01H113
23	Cy1 Humano	96	TR01H033	169	TR01H114
24	Cy2 Humano	97	TR01H034	170	GCH003
25	Cy3 Humano	98	TR01H035	171	GCH005
26	Cy4 Humano	99	TR01H036	172	GCH006
27	nucleótido de Fc γ RI (NM_000566.3)	100	TR01H037	173	GCH007
28	péptido de Fc γ RI (NP_000557.1)	101	TR01H038	174	GCH008
29	nucleótido de Fc γ RIIA (BC020823.1)	102	TR01H039	175	GCH010
30	péptido de Fc γ RIIA (AAH20823.1)	103	TR01H040	176	GCH012
31	nucleótido de Fc γ RIIB (BC146678.1)	104	TR01H041	177	GCH013
32	péptido de Fc γ RIIB (AAI46679.1)	105	TR01H042	178	GCH014
33	nucleótido de Fc γ RIIIA (BC033678.1)	106	TR01H043	179	GCH015
34	péptido de Fc γ RIIIA (AAH33678.1)	107	TR01H044	180	GCH016
35	nucleótido de Fc γ RIIIB (BC128562.1)	108	TR01H045	181	GCH019
36	péptido de Fc γ RIIIR (AAI28563.1)	109	TR01H046	182	GCH022
37	Región Fc (adición de A al N-término del número de acceso RefSeq AAC82527.1)	110	TR01H047	183	GCH023
38	Región Fc (adición de A al N-término del número de acceso RefSeq AAB59393.1)	111	TR01H048	184	GCH025
39	Región Fc (adición de A al N-término del número de acceso RefSeq AAB59394.1)	112	TR01H049	185	GCH026
40	Región variable de cadena H GPC3, H0000	113	TR01H050	186	GCH027
41	Región variable de cadena L GPC3, GL4	114	TR01H051	187	GCH029
42	Región variable de cadena H CE115, rCE115H	115	TR01H052	188	GCH032
43	Región variable de cadena L CE115, rCE115L	116	TR01H053	189	GCH034
44	G1dh	117	TR01H054	190	GCH035
45	ERY22_Hk	118	TR01H055	191	GCH039
46	ERY22_Hh	119	TR01H056	192	GCH040
47	GL4-ERY22_Hk	120	TR01H057	193	GCH042
48	H0000-ERY22_L	121	TR01H058	194	GCH043
49	rCE115H-ERY22_Hh	122	TR01H061	195	GCH045
50	rCE115L-k0	123	TR01H062	196	GCH053
51	hCE115HL (cadena pesada de CE115 humanizada)	124	TR01H063	197	GCH054
52	hCE115HA (cadena pesada de CE115 humanizada)	125	TR01H064	198	GCH055
53	L0000 (cadena ligera de CE115 humanizada)	126	TR01H065	199	GCH056
54	H0000-ERY27_HK	127	TR01H066	200	GCH057
55	hCE115HA-ERY27_HE	128	TR01H067	201	GCH059
56	L0000-k0	129	TR01H068	202	GCH060
57	E22Hh	130	TR01H069	203	GCH061
58	E22Hk	131	TR01H070	204	GCH062
59	Hi-Kn010G3	132	TR01H071	205	GCH064
60	E2702GsKsc	133	TR01H072	206	GCH065
61	E2704sEpsc	134	TR01H073	207	GCH066
62	E2702sKsc	135	TR01H074	208	GCH067
63	k0	136	TR01H075	209	GCH068
64	CE115HA177	137	TR01H076	210	GCH073
65	CE115HA178	138	TR01H077	211	GCH094
66	CE115HA179	139	TR01H079	212	GCH098
67	CE115HA180	140	TR01H080	213	GCH099
68	hCE115HAa	141	TR01H081	214	GCH100
69	TR01H006	142	TR01H082	215	H0610
70	TR01H007	143	TR01H083	216	L0000vk1
71	TR01H008	144	TR01H084	217	L0002
72	TR01H009	145	TR01H090	218	L0003
73	TR01H010	146	TR01H091	219	L0006
74	TR01H011	147	TR01H092	220	L0007
75	TR01H012	148	TR01H093	221	L0008
76	TR01H013	149	TR01H094	222	L0009
77	TR01H014	150	TR01H095	223	L0011
78	TR01H015	151	TR01H096	224	L0012
79	TR01H016	152	TR01H097	225	L0013
80	TR01H017	153	TR01H098	226	L0014

	SEQ ID NO:	Nombre	SEQ ID NO:	Nombre	SEQ ID NO:	Nombre
5	227	L0015	300	L0202	373	TR01L015
	228	L0016	301	L0203	374	TR01L016
	229	L0032	302	L0204	375	TR01L017
	230	L0038	303	L0205	376	TR01L018
	231	L0039	304	L0206	377	TR01L019
10	232	L0041	305	L0207	378	TR01L020
	233	L0042	306	L0208	379	TR01L023
	234	L0043	307	L0209	380	TR01L024
	235	L0044	308	L0210	381	CE115HA122-E22Hh
	236	L0045	309	L0211	382	CE115HA236-E22Hh
	237	L0046	310	L0212	383	CE115HA251-E22Hh
	238	L0047	311	L0213	384	GCH054-E2704sEpsc
	239	L0062	312	L0214	385	GCH065-E2704sEpsc
	240	L0063	313	L0215	386	GCH094-E2704sEpsc
	241	L0064	314	L0216	387	H0610-E2704sEpsc
15	242	L0065	315	L0217	388	hCE115HA-E22Hh
	243	L0066	316	L0218	389	rCE115H-E22Hh
	244	L0069	317	L0219	390	rCE115H-E2702GsKsc
	245	L0075	318	L0220	391	TR01H002-E22Hh
	246	L0079	319	L0222	392	TR01H015-E22Hh
	247	L0082	320	L0223	393	TR01H040-E2702GsKsc
	248	L0085	321	L0224	394	TR01H061-E2702GsKsc
	249	L0089	322	L0226	395	TR01H067-E2702GsKsc
	250	L0090	323	L0227	396	TR01H068-E2702GsKsc
	251	L0091	324	L0228	397	TR01H071-E2702GsKsc
	252	L0093	325	L0229	398	TR01H082-E2702GsKsc
	253	L0104	326	L0230	399	TR01H084-E2702GsKsc
	254	L0106	327	L0231	400	TR01H109-E2702GsKsc
	255	L0107	328	L0232	401	TR01H113-E2702GsKsc
	256	L0109	329	L0233	402	TR01H113-E2702sKsc
20	257	L0113	330	L0234	403	GL4-E22Hk
	258	L0115	331	L0235	404	L0000-E22Hk
	259	L0117	332	L0236	405	H0000-E22L
	260	L0120	333	L0237	406	H0610-E22L
	261	L0122	334	L0238	407	rCE115L-k0
	262	L0123	335	L0239	408	GLS3108-k0
	263	L0124	336	L0240	409	L0000-k0
	264	L0125	337	L0241	410	L0011-k0
	265	L0126	338	L0242	411	L0201-k0
	266	L0127	339	L0243	412	L0203-k0
	267	L0129	340	L0246	413	L0204-k0
	268	L0132	341	L0247	414	L0206-k0
	269	L0134	342	L0248	415	L0208-k0
	270	L0136	343	L0249	416	L0209-k0
	271	L0137	344	L0250	417	L0211-k0
	272	L0138	345	L0258	418	L0212-k0
	273	L0139	346	L0259	419	L0222-k0
	274	L0140	347	L0260	420	TR01H001
	275	L0141	348	L0261	421	TR01H002
	276	L0143	349	L0262	422	TR01H003
25	277	L0144	350	L0263	423	TR01H004
	278	L0145	351	L0264	424	rCE115H
	279	L0147	352	L0265	425	CE115HA121
	280	L0148	353	L0266	426	CE115HA122
	281	L0149	354	L0267	427	CE115HA124
	282	L0151	355	L0268	428	CE115HA192
	283	L0152	356	L0269	429	CE115HA236
	284	L0154	357	L0270	430	CE115HA251
	285	L0155	358	L0271	431	CE115HA252
	286	L0157	359	L0272	432	E22L
25	287	L0160	360	TR01L001		
	288	L0161	361	TR01L002		
	289	L0163	362	TR01L003		
	290	L0167	363	TR01L004		
	291	L0168	364	TR01L005		
	292	L0173	365	TR01L006		
	293	L0175	366	TR01L007		
	294	L0180	367	TR01L008		
	295	L0181	368	TR01L009		
	296	L0186	369	TR01L010		
	297	L0187	370	TR01L011		
	298	L0200	371	TR01L012		
	299	L0201	372	TR01L013		

Aplicabilidad Industrial

La presente invención proporciona nuevas moléculas multiespecíficas que se unen al antígeno, que mantienen la fuerte actividad anti-tumoral poseída por BiTe y la excelente propiedad de seguridad de no inducir una tormenta de citocina o similares independientemente del antígeno cancerígeno, y también tienen semividas largas en la sangre. Los agentes que inducen citotoxicidad que comprenden una molécula que se une al antígeno de la presente invención como un ingrediente activo, pueden dirigir las células que expresan glipicano-3 y tejidos tumorales que contienen estas células e inducir lesión celular. La administración de una molécula multiespecífica que se une al antígeno de la presente invención a pacientes, hace posible tener un tratamiento deseable el cual no solamente tiene un alto nivel de seguridad, sino también una carga física reducida, y es altamente conveniente.

20

25