INMUNOGLOBULINAS HETERO-DIMÉRICAS DE REDIRECCIONAMIENTO DE CÉLULAS T CD3/CD38 Y SUS MÉTODOS DE PRODUCCIÓN

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a inmunoglobulinas hetero-diméricas que dirigen un componente del antígeno CD3 humano y un componente del antígeno CD38 humano y a métodos para fabricar el mismo. La presente invención también se refiere a anticuerpos que se unen al antígeno CD38 humano y sus derivados para uso como reactivos terapéuticos o de diagnóstico y métodos para fabricarlos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

El uso *in vivo* de anticuerpos monoclonales (mAbs) se ha convertido en un pilar de la práctica clínica rutinaria en el tratamiento de diversas enfermedades humanas y la inmunoterapia dirigida con mAbs se ha convertido en crítica para el tratamiento exitoso de muchas formas de cáncer. Esto se ejemplifica por rituximab, un anticuerpo CD20 quimérico, que ha revolucionado el tratamiento de varias neoplasias de células B, tales como linfoma folicular. Las células B, sin embargo, pierden la expresión de CD20 tras la diferenciación terminal en las células plasmáticas, y rituximab por consiguiente ha transmitido un beneficio muy limitado para el tratamiento del mieloma múltiple entre otros cánceres.

La molécula CD38 es un blanco atractivo debido a su patrón de expresión y su papel gemelo como receptor y ectoenzima. El objetivo de CD38 se ha propuesto particularmente como un medio de tratamiento del mieloma múltiple y la leucemia linfocítica crónica (CLL).

La muerte redirigida de células T es un modo conveniente de acción en muchas áreas terapéuticas. Se ha demostrado que varios formatos de anticuerpos biespecíficos median la re-dirección de células T, tanto en las investigaciones preclínicas como en las clínicas (May C *et al.*, (2012) Biochem Pharmacol, 84(9): 1105-12; Frankel SR & Baeuerle PA, (2013) Curr Opin Chem Biol, 17(3): 385-92). Todos los anticuerpos biespecíficos de direccionamiento de células T o fragmentos de los mismos están diseñados para tener al menos dos sitios de unión a antígeno, en donde un sitio se une a un antígeno de superficie sobre una célula objetivo y el otro sitio se une a un antígeno de superficie celular T. Entre los antígenos de superficie de células T, la subunidad CD3 épsilon humana del complejo de proteína de TCR ha sido el más específico para redirigir la muerte de células T.

Muchos formatos de anticuerpos biespecíficos se han utilizado para redirigir la destrucción de células T, que incluyen principalmente tándem de fragmentos scFv y formatos

basados en diacuerpos solamente con algunos ejemplos de formatos de anticuerpos biespecíficos basados en Fc reportados (Moore PA *et al.*, (2011) Blood, 117(17): 4542-51; May C *et al.*, (2012) *supra*; Frankel SR & Baeuerle PA, (2013) *supra*). Los formatos biespecíficos que abarcarán una región Fc humana tendrán semividas más largas de circulación que pueden resultar en una mayor eficacia y/o regímenes de dosificación menos frecuentes. Entre los posibles formatos biespecíficos basados en Fc, un formato preferido para redirigir la muerte de células T es el llamado formato de heterodímero de cadena pesada. Este formato es de particular interés, ya que no permite la agregación de múltiples copias de las moléculas CD3 humanas en la superficie celular T evitando de este modo cualquier inactivación de células T (Klein C *et al.*, (2012) MAbs, 4(6): 653-63).

El primer método descrito para diseñar los heterodímeros de cadena pesada es un método conocido como el método de "botón en el ojal" (Publicación PCT No: WO199627011; Merchant AM *et al.*, (1998) Nat Biotechnol, 16(7): 677-81). Recientemente, un método químico conocido como el método de intercambio de FAB-brazo en donde dos anticuerpos se combinan en un anticuerpo biespecífico a través de la reducción y en retransposición in vitro de inmunoglobulinas-medias se ha reportado (Publicación PCT Nos: WO2008119353 (Schuurman J *et al.*) y WO2013060867 (Gramer M *et al.*); Labrijn AF *et al.*, (2013) Proc Natl Acad Sci USA, 110(13): 5145-50).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona un anticuerpo o fragmento del mismo que se une a CD38 humano que comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 o SEQ ID NO: 208, y/o una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26 o SEQ ID NO: 209, y/o una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27 o SEQ ID NO: 210; y/o que comprende una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28 o SEQ ID NO:211 o SEQ ID NO: 214, y/o una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29 o SEQ ID NO: 212, y/o una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30 o SEQ ID NO: 213; o

en donde la región de unión del epítope que une el complejo de proteínas CD38 comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31, una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32, y una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33, y una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34, una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 y una CDR3

de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36.

De acuerdo con este aspecto de la presente invención, el anticuerpo anti-CD38 o fragmento del mismo, es un anticuerpo murino, anticuerpo quimérico, anticuerpo humanizado o un anticuerpo totalmente humano.

En particular, el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una secuencia de región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos que consiste en SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60 o una secuencia al menos 80% idéntica a la región no CDR de cualquiera de dichas secuencias de región variable de cadena pesada y/o donde el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una secuencia de región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61 o una secuencia al menos 80% idéntica a la región no CDR de cualquiera de dichas secuencias de región variable de cadena ligera.

En particular, el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos que consiste en SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 147, SEQ ID NO: 149 o una secuencia al menos 80% idéntica a la región no CDR de cualquiera de dichas secuencias de región variable de cadena pesada y/o donde el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 148, SEQ ID NO: 150 o una secuencia al menos 80% idéntica a la región no CDR de cualquiera de dichas secuencias de región variable de cadena ligera.

En particular, el anticuerpo o fragmento comprende regiones constantes de cadena pesada y/o ligera humana y donde la región constante pesada humana se selecciona del grupo de inmunoglobulinas humanas que consiste en IGHG1, IGHG1 no fucosilado e IGHG4.

La presente invención también proporciona nuevos anticuerpos biespecíficos CD3/CD38 anti-humanos.

De acuerdo con la presente invención, la porción de unión objetivo del brazo de unión a CD3 anti-humano comprende preferiblemente un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) de SP34 u OKT3. En particular, en donde el brazo de unión a CD3 anti-humano es SP34 tiene un mejor perfil de expresión en comparación con un scFv-Fc que comprende las regiones variables pesada y ligera codificadas por SEQ ID NOs: 1 y 2, manteniendo al mismo tiempo sus propiedades de unión a CD3.

En particular, cuando se expresa como scFv-Fc, tiene al menos una doble mejora en la expresión en comparación con una quimera SP34 formateada como un scFv-Fc que comprende las regiones variables pesada y ligera codificadas por SEQ ID NOs: 1 y 2. Preferiblemente, el scFv de SP34 mejorado tiene al menos una mejora de seis veces en la expresión en comparación con una

quimera SP34 formateada como un scFv que comprende las regiones variables pesada y ligera codificadas por las SEQ ID NOs: 1 y 2 y más preferiblemente una mejora de doce veces en la expresión en comparación con una quimera SP34 formateada como un scFv que comprende las regiones variables pesada y ligera codificadas por SEQ ID NOs: 1 y 2.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención cuando se expresa como un scFv en un anticuerpo biespecífico que comprende un brazo FAB en el formato BEAT, tiene al menos una doble mejora en la expresión en comparación con una quimera SP34 formateada como un scFv que comprende las regiones variables pesada y ligera codificadas por SEQ ID NOs: 1 y 2. Preferiblemente, el scFv de SP34 mejorado como un componente de un anticuerpo biespecífico BEAT tiene al menos una mejora de cinco veces en la expresión en comparación con una quimera SP34 formateada como un scFv, que comprende las regiones variables pesada y ligera codificadas por SEQ ID NOs: 1 y 2, como un componente de un anticuerpo biespecífico BEAT.

De acuerdo con la presente invención los dos brazos de unión del anticuerpo biespecífico CD3 anti-humano comprenden cada uno una región constante de inmunoglobulina y en donde el primer brazo o polipéptido se une a la proteína A y el segundo brazo o el polipéptido no se une a la proteína A.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, la región de unión a epítope del polipéptido que une el complejo de proteína CD3 comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, y una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 9, y una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 11 y una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de: SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 12; o

en donde la región de unión del epítope que une el complejo de proteínas CD3 comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 163 y una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:164 y una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 165; y que comprende una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 166, y una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 167, y una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 168.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, la región de unión del epítope del polipéptido que une la proteína CD38 comprende una CDR1 de cadena pesada que

comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, y una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15, y una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16, una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 y una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de: SEQ ID NO: 18; o

en donde la región de unión del epítope que une el complejo de proteínas CD38 comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19, una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20, y una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21, y una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22, una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 y una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24; o

la región de unión al epítope del polipéptido que une la proteína CD38 comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25, una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26, y una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27, y una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28, una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29 y una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de: SEQ ID NO: 30; o

en donde la región de unión del epítope que une el complejo de proteínas CD38 comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31, una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32, y una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33, y una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34, una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 y una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36.

El uso de estos nuevos anticuerpos biespecíficos CD3/CD38 antihumanos no se limita a, sino que incluye los tratamientos de diversos cánceres humanos, enfermedades autoinmunes e inflamatorias. La destrucción específica de las células cancerosas a través de células y tejidos sanos representa un objetivo principal en oncología. Los agentes terapéuticos que podrían redirigir de forma segura la eliminación de células T contra antígenos de superficie celular asociados a tumores pueden ofrecer una mejor eficacia clínica. Las áreas conocidas de las necesidades no satisfechas clínicas en oncología incluyen, pero no se limitan a cáncer de mama, cáncer de mama metastásico, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, linfomas y mieloma múltiple.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, la región constante del segundo polipéptido de la inmunoglobulina hetero-dimérica o fragmento de la misma, comprende una región IgG3 CH3.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, la región constante del segundo polipéptido de la inmunoglobulina hetero-dimérica o fragmento de la misma, comprende una región CH3 diferente de aquella de IgG, y la región CH3 no-IgG3 comprende al menos una sustitución para disminuir/abolir la unión de la proteína A.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, la región de unión del epítope del segundo polipéptido de la inmunoglobulina hetero-dimérica o fragmento de unión de la misma comprende una región VH3 que comprende al menos una modificación que reduce la unión de la proteína A.

La presente invención también proporciona un método para producir heterodímeros de cadena pesada biespecíficos CD3/CD38 anti-humanos que tienen al menos un sitio de unión de antígeno basado en VH3 a partir de una línea de células hospederas de mamífero recombinante en donde el producto de anticuerpo biespecífico se aísla fácilmente después de un solo paso de cromatografía de proteína A con un alto grado de pureza.

En particular, la región VH3 modificada comprende una sustitución de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: 57, 65, 81, 82a y combinación 19/57/59 (numeración de Kabat) y aún más preferiblemente en donde la región VH3 modificada comprende una sustitución de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: 57A, 57E, 65S, 81E, 82aS y combinación 19G/57A/59A (numeración de Kabat).

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, la inmunoglobulina hetero-dimérica o fragmento de la misma, puede comprender sustituciones adicionales en donde la región de marco variable de cadena pesada comprende una sustitución de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en: I34M, V48I, A49G, R58N / Y, I69L, A71T y T73K (numeración Kabat) y la región de marco variable de cadena ligera comprende una sustitución de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: M4L, V33M, A34N, L46R, L47W, T51A, R66G, F71Y y P96F (numeración de Kabat); o en donde la región de marco variable de cadena pesada comprende las sustituciones de aminoácidos I34M, A49G y A71T (numeración Kabat) y la región de marco variable de cadena ligera comprende las sustituciones de aminoácidos M4L, L46R, L47W y F71Y (numeración de Kabat).

En una modalidad adicional, la región de unión al epítope que se une al complejo de proteínas CD3 comprende una región de marco variable de cadena pesada que es el producto de o se deriva de la subclase VH3 humana. Preferiblemente, la región de marco variable de cadena pesada es el producto de o se deriva de IGHV3-23 humana. Más preferiblemente, la región de marco variable de cadena pesada es el producto de o se deriva de IGHV3-23*04 humana (SEQ ID NO: 37).

La región de marco variable de cadena pesada comprende al menos una modificación de aminoácido de la región de marco correspondiente de la región variable de cadena pesada del anticuerpo murino correspondiente que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38 o SEQ ID NO: 1.

En una modalidad preferida, la región de unión del epítope del primer polipéptido que se une al complejo de proteínas CD3 comprende una región de marco variable de cadena ligera que es el producto de o se deriva de la subclase VK1 humana o la subclase VK3 humana. Preferiblemente, la región de marco variable de cadena ligera es el producto de o se deriva de VK1-39 humana o VK3-20. Más preferiblemente, la región de marco variable de cadena ligera es el producto de o se deriva de IGKV1-39*01 humana (SEQ ID NO: 39) o IGKV3-20*01 (SEQ ID NO: 40). La región de marco variable de cadena ligera comprende al menos una modificación de aminoácido de la región de marco correspondiente de la región variable de cadena ligera del anticuerpo murino correspondiente que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41 o SEQ ID NO: 2.

En una modalidad preferida, la región de unión al epítope que se une al complejo de proteínas CD3 comprende un dominio variable de cadena pesada humanizado que tiene las retro-mutaciones seleccionados del grupo que consiste en: I34M, V48I, A49G, R58N / Y, I69L, A71T y T73K (numeración de Kabat) y un dominio variable de cadena ligera humanizado que tiene las retro-mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en: M4L, V33M, A34N, L46R, L47W, R66G, F71Y y P96F (numeración de Kabat). Más preferiblemente, la región de unión al epítope que se une al complejo de proteínas CD3 comprende un dominio variable de cadena pesada humanizado que tiene las retro-mutaciones I34M, A49G y A71T (numeración de Kabat) y un dominio variable de cadena ligera humanizado que tiene retro-mutaciones M4L, L46R, L47W y F71Y (numeración de Kabat).

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, la región de unión al epítope que une el complejo de proteína CD3 de la inmunoglobulina hetero-dimérica o fragmento de la misma,

en donde la región de unión al epítope que une el complejo de proteínas CD3 comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42, y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46; o

en donde la región de unión al epítope que une el complejo de proteínas CD3 comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 44, y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47; o

en donde la región de unión al epítope que une el complejo de proteínas CD3 comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de

SEQ ID NO: 45, y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47; o

en donde la región de unión al epítope que une el complejo de proteínas CD3 comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45, y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48; o

en donde la región de unión al epítope que une el complejo de proteínas CD3 comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45, y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49.

El complejo de proteínas CD3 comprende un número de subunidades, por ejemplo, delta, épsilon y gamma. En una modalidad preferida, la región de unión al epítope que se une al complejo de proteínas CD3 se une a la subunidad épsilon CD3.

Una región de unión al epítope como se describe en el presente documento incluye la combinación de uno o más dominios variables de cadena pesada y uno o más dominios complementarios variables de cadena ligera que en conjunto forman un sitio de unión que permite la unión específica de la inmunoglobulina hetero-dimérica o fragmento de la misma a uno o más epítopes. En una modalidad de la presente invención, la región de unión al epítope del primer polipéptido comprende un FAB y la región de unión al epítope del segundo polipéptido comprende un scFv. Alternativamente, la región de unión al epítope del primer polipéptido comprende un scFv y la región de unión al epítope del segundo polipéptido comprende un FAB.

La región de unión de epítope que se une a CD38 comprende una región de marco variable de cadena pesada que es el producto o derivado de la subclase VH3 humana, preferiblemente VH3-23 humano, más preferiblemente IGHV3-23*04 humano (SEQ ID NO: 37). La región de marco variable de cadena pesada comprende al menos una modificación de aminoácido de la región de marco correspondiente de la región variable de cadena pesada del anticuerpo murino correspondiente que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 50 o 51 o 52. La región de unión al epítope comprende además una región de marco variable de cadena ligera que es el producto de o se deriva de la subclase VK1 humana, preferiblemente VK1-39 humana, más preferiblemente IGKV1-39*01 humana (SEQ ID NO: 39). La región de marco variable de cadena ligera comprende al menos una modificación de aminoácido de la región de marco correspondiente de la región variable de cadena ligera del anticuerpo murino correspondiente que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 o 54 o 55.

En particular, el polipéptido de unión a CD38 comprende un par de dominio de cadena pesada variable y de dominio de cadena ligera variable codificado por la SEQ ID NOs: 56/57,

58/59, 60/61 y 62/63.

Los anticuerpos anti-CD3 se ha encontrado que desencadenan toxicidad tanto por mecanismos directos como indirectos. Los mecanismos indirectos están mediados por la región Fc del anticuerpo CD3 que actúa con el receptor de Fc que expresa células inmunes y conduce a la activación transitoria de células T y a la liberación de citoquinas. Por lo tanto con el fin de mejorar la seguridad de las inmunoglobulinas hetero-diméricas o fragmento de las mismas como se describe en este documento, la región constante de inmunoglobulina del primer y/o segundo polipéptido tiene unión reducida o no tiene para las células inmunes efectoras y/o C1q complemento. Preferiblemente, la región constante de inmunoglobulina está diseñada para abrogar la unión del receptor de Fc en la región de bisagra inferior. Más preferiblemente, la región constante de inmunoglobulina del primer y/o segundo polipéptido comprende la o las sustituciones L234A y/o L235A (numeración de E.U.A.). Más preferiblemente, la región constante de inmunoglobulina del primer y/o segunda polipéptido comprende las sustituciones L234A y L235A (numeración de E.U.A.).

En otro aspecto, la descripción de la presente invención también describe una inmunoglobulina hetero-dimérica o fragmento de la misma en donde la región de unión al epítope se une a la subunidad CD3 épsilon del complejo de proteínas CD3 y comprende un FAB que tiene una termo-estabilidad de FAB superior a la termo-estabilidad de FAB de la quimera SP34 que comprende un dominio variable de cadena pesada de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y un dominio variable de cadena ligera de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, medida por calorimetría de barrido diferencial (DSC) como en el cuadro 1. Esta termoestabilidad incrementada significará que estos brazos de unión a SP34 mejorados habrán aumentado la estabilidad *in vivo* e *in vitro*, lo que significa un mejor comportamiento terapéutico y también en términos de su estabilidad/almacenamiento/vida útil.

En una modalidad preferida, la presente invención proporciona inmunoglobulina hetero-dimérica o fragmento de la misma de unión a:

i) el complejo de proteína CD3 y CD38, en donde el primer polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65 y está ensamblado con una cadena ligera cognado de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66 y une CD38, y en donde el segundo polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69 y SEQ ID NO: 70 y une CD3 épsilon;

ii) el complejo de proteína CD3 y CD38, en donde el primer polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 71 y está ensamblado con una cadena ligera cognado de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 72 y une CD38, y en donde el segundo polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69 y SEQ ID NO: 70 y une CD3 épsilon;

iii) el complejo de proteína CD3 y CD38, en donde el primer polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 73 y se ensambla con una cadena ligera cognada de secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 74 y une CD38, y en donde el segundo polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69 y SEQ ID NO: 70 y une CD3 épsilon;

En una modalidad adicional, la presente invención proporciona inmunoglobulina hetero-dimérica o fragmento de la misma de unión a:

el complejo de proteína CD3 y CD38, en donde el primer polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 75 ó 76 y se ensambla con una cadena ligera de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 77 y se une a CD38, y en donde el segundo polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69 y SEQ ID NO: 70 y une CD3 épsilon;

el complejo de proteína CD3 y CD38, en donde el primer polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 78 y está ensamblado con una cadena ligera de secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66 y se une a CD38, y en donde el segundo polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69 y SEQ ID NO: 70 y une CD3 épsilon;

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona una inmunoglobulina hetero-dimérica o fragmento de la misma, que comprende (a) un primer polipéptido que comprende una región constante de inmunoglobulina con un dominio CH2 y un primer dominio CH3 diseñado;

(b) un segundo polipéptido que comprende una región constante de inmunoglobulina con un dominio CH2 y un segundo dominio CH3 diseñado, en donde los dos polipéptidos se hetero-dimerizan a través de sus dominios CH3 diseñados; y en donde el primer polipéptido no une la proteína A o la proteína G y el segundo polipéptido sólo une la proteína A y/o la proteína G a través de su región constante de inmunoglobulina; en donde el primer dominio CH3 diseñado tiene sustituciones en uno o más de los siguientes residuos 20, 22, 26, 79, 85.1, 86, 88, 90 y el segundo dominio CH3 diseñado tiene sustituciones en al menos un residuo seleccionado del grupo 3, 5, 20, 22, 26, 27, 81, 84, 85.1, 86, 88 y en donde dicha segunda cadena comprende también una sustitución en el residuo 84.4 de acuerdo con la numeración IMGT.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, la sustitución en la posición 84.4 se selecciona del grupo 84.4Q, 84.4V, 84.4A, 84.4S, 84.4T, 84.4N, 84.4G, 84.4L, 84.4L, 84.4Y, 84.4 F, 84,4M.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, el primer dominio CH3 diseñado tiene sustituciones al menos en los siguientes residuos 22, 86, 88 y el segundo

dominio CH3 diseñado tiene sustituciones al menos en los siguientes residuos 7, 84.4, 85.1, 86 según la numeración IMGT.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, el primer dominio CH3 diseñado tiene sustituciones al menos en los siguientes residuos 20, 22, 79, 86, 88 y el segundo dominio CH3 diseñado tiene sustituciones al menos en los siguientes residuos 7, 26, 84, 84.4, 85.1, 86 según la numeración IMGT.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, el primer dominio CH3 diseñado tiene sustituciones al menos en los siguientes residuos 20, 22, 26, 79, 85.1, 86, 88, 90 y el segundo dominio CH3 diseñado tiene sustituciones al menos en los siguientes residuos 3, 5, 7, 20, 22, 26, 81, 84, 84,2, 84,4, 85,1, 86, 88, 90.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, el primer dominio CH3 diseñado tiene sustituciones al menos en los siguientes residuos 3, 20, 22, 26, 79, 85.1, 86, 88, 90 y el segundo dominio CH3 diseñado tiene sustituciones al menos en los siguientes residuos 3, 5, 7, 20, 22, 26, 81, 84, 84,2, 84,4, 85,1, 86, 88, 90.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona una inmunoglobulina hetero-dimérica que tiene una primera cadena que abarca una región Fc del isotipo IgG3 que incluirá un dominio BTA CH3 y un dominio variable no VH3 o un dominio variable basado en VH3 abrogado para la unión de la proteína A (usando las sustituciones G65S o N82aS, por ejemplo) o ningún dominio variable y por lo tanto no tiene unión a la proteína A, y una segunda cadena que une la proteína A que abarca un dominio BTB D401Q CH3 (procedente de un isotipo IgG1 humano por ejemplo) y un dominio variable no VH3 o un dominio variable VH3 abrogado para la unión a la proteína A (usando las sustituciones G65S o N82aS, por ejemplo), o ningún dominio variable.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las figuras 1A a 1F: Todas estas figuras se refieren a la humanización de OKT3 en los marcos humanos estables. Las figuras 1A a 1C: Resumen de candidatos humanizados formateados como anticuerpos IgG1 humanos. Tinción de HPB-ALL en relación con el anticuerpo OKT3 quimérico: (-) indica que no hay unión, (+) unión más débil, (++) unión moderada y unión similar (+++). La figura 1D: perfiles DSC de anticuerpos seleccionados de candidatos. La figura 1E: Resumen de candidatos humanizados formateados como fusiones de scFv-Fc. Tinción de HPB-ALL en relación con el anticuerpo OKT3 quimérico: (-) indica que no hay unión, (+) unión más débil, (++) unión moderada y unión similar (+++). La figura 1F: perfiles DSC de candidatos seleccionados de scFv-Fc.

Las figuras 2A a 2B: Todas estas figuras se refieren a la humanización de SP34 en los marcos humanos estables. La figura 2A: Resumen de candidatos humanizados formateados como anticuerpos IgG1 humanos. La figura 2B: Resumen de los candidatos humanizados formateados como proteínas de fusión scFv-Fc (Fc de isotipo IgG1 humano). Datos de SPR en relación con el anticuerpo quimérico SP34 para épsilon CD3 de humano y mono cynomolgus 1-26 _ proteínas de fusión Fc: (-) indica que no hay unión, (+) unión más débil, (++) unión moderada, fuerte pero no unión similar (+++), y unión similar (++++).

La figura 3 muestra los niveles de expresión relativa después de reformatear de IgG1 a scFv-Fc para la quimera SP34 así como a SP34 H1L21, donde se observó una pérdida dramática de expresión.

La figura 4 Muestra los efectos en el nivel de expresión de un SP34 H1L21 ScFv-Fc por exploración de alanina en las posiciones: T27, G27a, V27c, T28, T29, S30, N31, Y32, N52, K53, R54, P56, L90, Y92, S93, N94, y L95.

La figura 5A muestra los efectos sobre el nivel de expresión de la mutación aleatoria en la posición 29 de un SP34 H3L23 ScFv-Fc; La figura 5B muestra los efectos sobre el nivel de expresión de la mutación aleatoria en la posición 30 de un SP34 H3L23 ScFv-Fc; La figura 5C muestra los efectos sobre el nivel de expresión de la mutación aleatoria en la posición 95 de un SP34 H5L23 ScFv-Fc.

La figura 6 muestra el nivel de expresión normalizado para varios SP34 humanizados.

La figura 7A: Interacción de anticuerpo-antígeno medida por SPR entre el anticuerpo quimérico HB-7 y el antígeno CD38 humano. Un chip sensor CM5 se acopló covalentemente con la proteína G y 200 RU de anticuerpo quimérico HB-7 fueron capturados. La proteína CD38 humana (dominio extracelular humano CD38 con una etiqueta de poli-histidina) se inyectó a 125, 31, 7.8, 3.9, 1.9, 1 y 0.5 nM, con un caudal de 30 µl/min en HBS-P. La figura 7B: Interacción de anticuerpo-antígeno medida por SPR entre el anticuerpo con mejor ajuste HB-7 humanizado y el antígeno CD38 humano. Un chip sensor CM5 se acopló covalentemente con la proteína G y 200 RU de anticuerpo con mejor ajuste HB-7 humanizado fueron capturados. La proteína CD38 humana (dominio extracelular humano CD38 con una etiqueta de poli-histidina) se inyectó a 50, 25, 12.5, 6.25 y 0.39 nM, con un caudal de 30 µl/min en HBS-P. La figura 7C: Interacción de anticuerpo-antígeno medida por SPR entre el anticuerpo con mejor ajuste 9G7 humanizado y el antígeno CD38 humano. Un chip sensor CM5 se acopló covalentemente con la proteína G y 200 RU de anticuerpo con mejor ajuste 9G7 humanizado fueron capturados. La proteína CD38 humana (dominio extracelular humano CD38 con una etiqueta de poli-histidina) se inyectó a 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56, 0.78, 0.39, 0.19, y 0.1 nM, con un caudal de 30 µl/min en HBS-P. La figura 7D: Interacción de anticuerpo-antígeno medida por

SPR entre el anticuerpo con mejor marco 9G7 humanizado y el antígeno CD38 humano. Un chip sensor CM5 se acopló covalentemente con la proteína G y 200 RU de anticuerpo con mejor marco 9G7 humanizado fueron capturados. La proteína CD38 humana (dominio extracelular humano CD38 con una etiqueta de poli-histidina) se inyectó a 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56, 0.78, 0.39, 0.19, y 0.1 nM, con un caudal de 30 µl/min en HBS-P. La figura 7E: Interacción de anticuerpo-antígeno medida por SPR entre el anticuerpo quimérico 767 y el antígeno CD38 humano. Un chip sensor CM5 se acopló covalentemente con la proteína G y 200 RU de anticuerpo 767 humano fueron capturados. La proteína CD38 humana (dominio extracelular CD38 humano con una etiqueta de poli-histidina) se inyectó a 500, 250, 125, 62,5, 31,25, y 15.6 nM, con un caudal de 30 µl/min en HBS-P. La afinidad se obtuvo de un gráfico de la respuesta de equilibrio (Req) frente a la concentración de analito (C) de acuerdo con la siguiente ecuación: Req=KA*C*Rmax/(KA*C*n+1), concentración en 50% de saturación es KD. Todos los datos SPR se expresan como el número de unidades de respuesta (abreviado RU; eje Y) vs. tiempo (eje X). La figura 7F: perfiles de DSC de anticuerpos HB-7 quiméricos y de mejor ajuste HB-7 humanizados. La figura 7G: perfiles de DSC de anticuerpos 9G7 quiméricos y de mejor ajuste 9G7 humanizados. La figura 7H: perfiles DSC de anticuerpo de mejor marco 9G7 humanizado. La figura 7I: perfiles DSC de anticuerpo 767 de clon humanizado. La figura 7J: cuadro de resumen para los anticuerpos humanizados 9G7.

La figura 8: Diagrama esquemático de los anticuerpos BEAT CD38-HB7 mejor ajuste/CD3 (formato A) y BEAT CD38-767/CD3 (formato B). [(A+)] significa un sitio de unión de proteína A funcional. [(A-)]: significa un sitio de unión de proteína A no funcional.

La figura 9A: Interacción antígeno-anticuerpo medida por SPR entre el anticuerpo BEAT CD38-HB7 mejor ajuste/CD3 y el antígeno CD38 humano. Un chip sensor CM5 se acopló covalentemente con la proteína G y 200 UR del anticuerpo BEAT CD38-HB7 mejor ajuste/anticuerpo CD3 fueron capturados. La proteína CD38 humana (proteína marcada con poli-histidina) se inyectó a 50, 25, 12.5, 6.25 y 0.39 nM a un caudal de 30 µl/min en HBS-P. Los datos se expresan como el número de unidades de respuesta (RU abreviado; eje Y) frente al tiempo (eje X). La figura 9B: Perfil de DSC del anticuerpo BEAT CD38-HB7mejor ajuste/CD3.

La figura 10: Ejemplos de la eliminación redireccionada de células T con el anticuerpo BEAT CD38-HB7mejor ajuste/CD3.

Lectura: Método RDL-FACS. Células efectoras: células T humanas purificadas Relación de células efectoras a células direccionadas de 10:1. Media de dos donantes con una incubación de 48 horas. Células objetivo: RPMI 8226. Concentración de anticuerpo se muestran en nM.

La figura 11: Ejemplos de la eliminación redireccionada de células T con el anticuerpo BEAT CD38-767/CD3(SP34). Lectura: Método RDL-FACS. Células efectoras: PBMC

humanas. Relación de células efectoras a células direccionadas de 10:1. Media de tres donantes con una incubación de 48 horas. Células objetivo: Daudi. Concentración de anticuerpo se muestran en nM.

La figura 12: Diagrama esquemático de los anticuerpos BEAT CD38-HB7mejor ajuste/CD3(SP34) (formato A) y BEAT CD38-9G7mejor ajuste/CD3(SP34-Kappa2) (formato B). [(A+)] significa un sitio de unión de proteína A funcional.

La figura 13: Ejemplos de la eliminación redireccionada de células T con el anticuerpo BEAT CD38-HB7mejor ajuste/CD3(SP34). Lectura: Método RDL-FACS. Células efectoras: PBMC humanas. Relación de células efectoras a células direccionadas de 10:1. Media de tres donantes con una incubación de 48 horas. Células objetivo: Células Daudi. Concentración de anticuerpo se muestran en nM.

La figura 14: Interacción antígeno-anticuerpo medida por SPR entre el anticuerpo BEAT CD38-9G7mejor ajuste/CD3(SP34-Kappa2) y la proteína de fusión 1-26_Fc épsilon CD3 humana. Un chip sensor CM5 se acopló covalentemente con 500 RU de la proteína de fusión 1-26_Fc épsilon CD3 humana. Anticuerpo BEAT CD38-9G7mejor ajuste/CD3(SP34-Kappa2) se inyectó en 50, 25, 12.5, 6.2, 3.1, 0.8 y 0.4 nM a un caudal de 30 µl/min en HBS-P. Los datos se expresan como el número de unidades de respuesta (RU abreviado; eje Y) frente al tiempo (eje X).

La figura 15: Ejemplos de la eliminación redireccionada de células T con el anticuerpo BEAT CD38/CD3(SP34-Kappa2). Lectura: Método RDL-FACS. Células efectoras: PBMC humanas. Relación de células efectoras a células direccionadas de 10:1. Media de tres donantes con una incubación de 48 horas. Células objetivo: Células Daudi. Concentración de anticuerpo se muestran en nM.

La figura 16 muestra el comportamiento en un ensayo RDL de varios anticuerpos biespecíficos CD38/CD3, en el que el brazo de unión a CD3 comprende el SP34 de ratón original reformateado como un scFv (SEQ ID NO: 137), o scFvs SP34 humanizado modificado que comprende las combinaciones de cadena pesada/ligera H1/L21 (SEQ ID NO: 67), H5/L32 (SEQ ID NO: 68), H5/L65 (SEQ ID NO: 69) y H5/L67 (SEQ ID NO: 70).

La figura 17: Análisis SDS-PAGE no reductor de homodímeros BTB con (grupo 1 de carriles) y sin el radical de scFv de unión a la proteína A (grupo 2 de carriles). La purificación usando cromatografía de afinidad: las fracciones eluidas y neutralizadas se analizaron después de la cromatografía de proteína A (A) o la cromatografía de proteína G (G). Para el grupo 2, se recogieron las fracciones de flujo directo o no unidas y no mostraron unión a la proteína A o G (abreviada A ft y G ft, respectivamente). Las eluciones se realizaron a pH 3.0. [(A+)] significa un sitio de unión a la proteína A. Marcadores de peso molecular como se indica (kDa).

La figura 18A: Análisis de SDS-PAGE no reductor del heterodímero BEAT que

contiene sólo un único sitio de proteína A en la cadena BTB que lleva la sustitución D401Q. La purificación usando cromatografía de afinidad: las fracciones eluidas y neutralizadas se analizaron después de la cromatografía de proteína A (A) o la cromatografía de proteína G (G). Las eluciones se realizaron a pH 3.0. [(A+)] significa un sitio de unión a la proteína A. Marcadores de peso molecular como se indica (kDa); 18B: Análisis SDS-PAGE del heterodímero BEAT que contiene un único sitio de proteína A en la cadena BTB que carece de la sustitución D401Q. La purificación usando cromatografía de afinidad: las fracciones eluidas y neutralizadas se analizaron después de la cromatografía de proteína A (A) o la cromatografía de proteína G (G). Las eluciones se realizaron a pH 3.0. [(A+)] significa un sitio de unión a la proteína A. Marcadores de peso molecular como se indica (kDa).

La figura 19: Los gráficos muestran el recuento por µl de sangre para la población de CD4+ (línea lisa) y CD8+ (línea punteada), para ambos animales a los que se les inyectó BEAT CD3/CD38. Los gráficos superiores muestran los recuentos para los animales dosificados con 1 µg/kg. Los gráficos inferiores muestran los recuentos para los animales dosificados con 10 µg/kg. Los recuentos en los puntos de tiempo cero corresponden a muestras recogidas 1 día antes de la dosificación.

La figura 20: Los gráficos muestran el recuento por µl de sangre para la población de monocitos CD14+ CD38+, para ambos animales a los que se les inyectó BEAT CD3/CD38. Los gráficos superiores muestran los recuentos para los animales dosificados con 1 µg/kg. El gráfico inferior muestra los recuentos para los animales dosificados con 10 µg/kg. Los recuentos en los puntos de tiempo cero corresponden a muestras recogidas 1 día antes de la dosificación.

La figura 21: Los gráficos muestran la intensidad media de fluorescencia (MFI) del colorante fluo-4 en función del tiempo en segundos. La condición de control de isotipo se incluye en cada gráfico. Después de la adquisición de la línea base durante 40 segundos, se añadieron los anticuerpos indicados a las muestras y se reanudó la adquisición. El control de isotipo era un anticuerpo IgG1 humano. El aumento de la IMF indica una movilización del calcio en el citoplasma de las células.

La figura 22: El mapeo de epítopes del anticuerpo 9G7 humanizado por SPR utilizando fusiones de péptido-Fc derivadas del dominio extracelular de CD38 humano. Los datos se expresan como el número de unidades de respuesta (abreviado RU, eje Y) vs tiempo (eje X).

La figura 23: Representación 3D del dominio extracelular del CD38 humano. La secuencia del péptido F6 está coloreada en gris, las posiciones M110 y T148 están coloreadas en negro.

La figura 24: El mapeo de epítope de los anticuepos 9G7 y SAR650984 humanizados por SPR utilizando los dominios extracelulares de CD38 de humano y de mono cynomolgus. Los

datos se expresan como el número de unidades de respuesta (abreviado RU, eje Y) vs tiempo (eje X).

La figura 25: El mapeo de epítope del anticuerpo 767 humanizado por SPR utilizando fusiones de péptido-Fc derivadas del dominio extracelular de CD38 humano. Los datos se expresan como el número de unidades de respuesta (abreviado RU, eje Y) vs tiempo (eje X).

La figura 26: Representación 3D del dominio extracelular del CD38 humano. La secuencia peptídica F3 está coloreada en gris, las posiciones E76 y H79 están coloreadas en negro.

La figura 27: El mapeo de epítope del anticuerpo SAR650984 humanizado por SPR utilizando fusiones de péptido-Fc derivadas del dominio extracelular de CD38 humano. Los datos se expresan como el número de unidades de respuesta (abreviado RU, eje Y) vs tiempo (eje X).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere en general a nuevas inmunoglobulinas hetero-diméricas que se unen al complejo de proteína CD3 y un antígeno CD38.

Además, estas inmunoglobulinas hetero-diméricas han reducido o eliminado la unión a la proteína A y por lo tanto se pueden purificar hasta un grado muy alto de pureza usando la cromatografía de afinidad.

A los efectos de la interpretación de esta especificación, las siguientes definiciones se aplicarán y, cuando proceda, los términos utilizados en singular incluirán también el plural y viceversa. Es de entenderse que la terminología usada en este documento es para el propósito de describir solamente modalidades particulares y no pretende ser limitante.

Los términos "polipéptido" y "proteína" se refieren a un polímero de residuos de aminoácidos en donde los aminoácidos se combinan a través de enlaces peptídicos para formar una cadena de aminoácidos que se han unido entre sí a través de la síntesis de deshidratación. Los polipéptidos y proteínas se pueden sintetizar por síntesis química o expresión recombinante y no se limitan a una longitud mínima de aminoácidos.

De acuerdo con la invención, el grupo de polipéptidos comprende "proteínas", siempre que las proteínas se compongan de una única cadena polipeptídica. Los polipéptidos pueden además formar multímeros tales como dímeros, trímeros y oligómeros superiores, es decir, que consisten en más de una molécula de polipéptido. Las moléculas de polipéptido que forman tales dímeros, trímeros, etc. pueden ser idénticas o no idénticas. Las correspondientes estructuras de orden superior de dichos multímeros son, en consecuencia, denominados homo- o hetero-dímeros, homo- o hetero-trímeros etc. Un ejemplo de un hetero-multímero es una molécula de anticuerpo, que, en su forma de origen natural, se compone de dos cadenas polipeptídicas ligeras idénticas y

dos cadenas polipeptídicas pesadas idénticas. Los términos "polipéptido" y "proteína" también se refieren a polipéptidos/proteínas modificados naturalmente en donde la modificación se efectúa, por ejemplo, por modificaciones pos-traduccionales tales como glicosilación, acetilación, fosforilación y similares. Dichas modificaciones son bien conocidas en la técnica. Además, para los propósitos de la presente invención, un "polipéptido" se refiere a una proteína que incluye modificaciones, tales como deleciones, adiciones y sustituciones (que pueden ser de naturaleza conservadora) en la secuencia nativa. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, como a través de mutagénesis dirigida al sitio, o pueden ser accidentales, como a través de mutaciones de hospederos que producen las proteínas o errores debidos a amplificación por PCR.

El término "complejo CD3" tal como se utiliza aquí, se refiere al complejo de proteínas conocido como co-receptor de células T CD3 (grupo de diferenciación 3) (Wucherpfennig KW *et al.*, (2010) Cold Spring Harb Perspect Biol, 2(4): a005140). El complejo de proteínas CD3 se compone de cuatro cadenas distintas. En los mamíferos, el complejo contiene una cadena CD3γ, una cadena CD3δ, y dos cadenas CD3ε. Estas cadenas se asocian con una molécula conocida como el receptor de células T (TCR) y la cadena ζ para generar una señal de activación en linfocitos T (van der Merwe PA & Dushek O (2011) Nat Rev Immunol, 11(1): 47-55). La TCR, cadena ζ, y las moléculas CD3 juntas comprenden el complejo TCR. Las cadenas CD3γ, CD3δ, y CD3ε son proteínas de la superficie celular altamente relacionadas de la superfamilia de las inmunoglobulinas que contienen un único dominio de inmunoglobulina extracelular. Las colas intracelulares de las moléculas CD3 contienen un solo motivo conservado conocido como un motivo de activación basado en inmuno-receptor tirosina o ITAM, para abreviar, que es esencial para la capacidad de señalización de la TCR. Dado que CD3 se requiere para la activación de células T, los fármacos (a menudo anticuerpos monoclonales) que dirigen CD3 han y están siendo investigados como tratamientos con inmunosupresores.

El término "inmunoglobulina" referido en el presente documento se puede usar de forma intercambiable con el término "anticuerpo". Inmunoglobulina incluye anticuerpos de longitud completa y cualquier fragmento de unión al antígeno o cadenas simples del mismo. Las inmunoglobulinas pueden ser homo-diméricas o hetero-dimericas. Las inmunoglobulinas y anticuerpos específicamente naturales son glicoproteínas que existen como una o más copias de una unidad en forma de Y, compuestas por cuatro cadenas polipeptídicas. Cada forma de "Y" contiene dos copias idénticas de una cadena pesada (H) y dos copias idénticas de una cadena ligera (L), nombradas como tal por sus pesos moleculares relativos. Cada par de cadena ligera con una cadena pesada, y cada par de cadena pesada con otra cadena pesada. Los enlaces disulfuro entre cadenas covalentes y e interacciones no covalentes enlazan las cadenas juntas. Las inmunoglobulinas y anticuerpos específicamente naturales contienen regiones variables, que son las dos copias del sitio

de unión del antígeno. La papaína, una enzima proteolítica divide la forma de "Y" en tres moléculas separadas, dos llamados fragmentos "Fab" o "FAB" (Fab = unión de antígeno de fragmento) y un llamado fragmento "Fc" o "región Fc" (Fc = fragmento cristalizable). Un fragmento Fab consiste de toda la cadena ligera y parte de la cadena pesada. La cadena pesada contiene una región variable (VH) y tres o cuatro regiones constantes (CH1, CH2, CH3 y CH4, dependiendo de la clase de anticuerpo o isotipo). La región entre las regiones CH1 y CH2 se llama la región bisagra y permite flexibilidad entre los dos brazos Fab de la molécula de anticuerpo en forma de Y, lo que les permite abrir y cerrar para acomodar la unión a dos determinantes antigénicos separados por una distancia fija. La "región bisagra" contemplada en el presente documento es una región de secuencia de 6-62 aminoácidos de longitud, sólo presente en IgA, IgD e IgG, que abarca los residuos de cisteína que forman puente con las dos cadenas pesadas. Las cadenas pesadas de IgA, IgD e IgG tienen cada una cuatro regiones, es decir, una región variable (VH) y tres regiones constantes (CH1-3). IgE y IgM tienen una variable y cuatro regiones constantes (CH1-4) en la cadena pesada. Las regiones constantes de las inmunoglobulinas pueden mediar la unión a los tejidos hospederos o factores, incluyendo varias células del sistema inmune (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) de la ruta clásica del sistema complemento. Cada cadena ligera generalmente está unida a una cadena pesada por un enlace de disulfuro covalente. Cada cadena ligera contiene una región variable (VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera es una región constante de cadena ligera kappa designada aquí como IGKC o es una región constante de cadena ligera lambda designada aquí como IGLC. IGKC se utiliza en este documento de forma equivalente para Cκ o CK y tiene el mismo significado. IGLC se utiliza en este documento de forma equivalente para Cλ o CL y tiene el mismo significado. El término "una región IGLC" como se usa en este documento se refiere a todas las regiones constantes de cadena ligera lambda, por ejemplo, a todas las regiones constantes de cadena ligera lambda seleccionados del grupo que consiste en IGLC1, IGLC2, IGLC3, IGLC6 e IGLC7. Las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones de marco (FR o FW). Cada VH y VL se componen de tres CDR y cuatro FR, dispuestas de amino-terminal a carboxi-terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen una región de unión a epítope que interactúa con un antígeno. Las inmunoglobulinas diseñadas pueden abarcar diferentes formatos de región de unión a epítope, como fragmentos scFv, FAB o dAb. Estos fragmentos son por lo general montados en una estructura similar a anticuerpo por fusión genética a una región Fc IgG. Las inmunoglobulinas diseñadas se pueden construir como homo o hetero-dímeros con o sin el uso de técnicas de mejora de hetero-dimerización, y pueden tener propiedades de unión mono- o

biespecífica.

El término "anticuerpo de longitud completa" como se usa en este documento incluye la estructura que constituye la forma biológica natural de un anticuerpo, incluyendo las regiones variables y constantes. Por ejemplo, en la mayoría de los mamíferos, incluyendo los seres humanos y los ratones, el anticuerpo de longitud completa de la clase IgG es un tetrámero y consta de dos pares idénticos de dos cadenas de inmunoglobulina, teniendo cada par una cadena ligera y una cadena pesada, cada cadena ligera que comprende regiones de inmunoglobulina VL y una región constante de cadena ligera, y comprendiendo cada cadena pesada regiones de inmunoglobulina VH, CH1 (Cγ1), CH2 (Cγ2), CH3 (Cγ3) y CH4 (Cγ4), dependiendo de la clase o isotipo de anticuerpos). En algunos mamíferos, por ejemplo en camellos y llamas, los anticuerpos IgG pueden consistir de dos cadenas pesadas solamente, cada cadena pesada comprendiendo una región variable unida a la región Fc.

Los anticuerpos se agrupan en clases, también contempladas como isotipos, según se determinan genéticamente por la región constante. Las cadenas ligeras constantes humanas se clasifican como kappa (CK) y cadenas ligeras lambda (Cλ). Las cadenas pesadas se clasifican como mu (μ), delta (δ), gamma (γ), alfa (α), o épsilon (ε), y definen el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA, e IgE, respectivamente. Por lo tanto, "isotipo" en este documento se entiende cualquiera de las clases y/o subclases de inmunoglobulinas definidas por las características químicas y antigénicas de sus regiones constantes. Los isotipos de inmunoglobulina humana conocidos son IGHG1 (IgG1), IGHG2 (IgG2), IGHG3 (IgG3), IGHG4 (IgG4), IGHA1 (IgA1), IGHA2 (IgA2), IGHM (IgM), IGHD (IgD) y IGHE (IgE). El llamado gen IGHGP pseudo-gamma de inmunoglobulina humana representa un gen de región constante de cadena pesada de inmunoglobulina humana adicional que se ha secuenciado pero no codifica una proteína debido a una región alterada conmutada (Bensmana M *et al.,* (1988) Nucleic Acids Res. 3108). A pesar de tener una región de conmutación alterada, el gen IGHGP pseudo-gamma de inmunoglobulina humana tiene marcos de lectura abierta para todas las regiones pesadas constantes (CH1-CH3) y bisagra. Todos los marcos de lectura abierta para sus regiones constantes pesadas codifican regiones de proteína que se alinean bien con todas las regiones constantes de inmunoglobulina humana con las características estructurales previstas. Este isotipo pseudo-gamma adicional se refiere en este documento como IgGP o IGHGP. Se han reportado otros pseudo genes de inmunoglobulina como los pseudo-genes P1 y P2 épsilon de región constante pesada de inmunoglobulina humana (IGHEP1 e IGHEP2). La clase IgG es más comúnmente utilizada para fines terapéuticos. En los seres humanos esta clase comprende las subclases IgGl, IgG2, IgG3 e IgG4. En ratones esta clase comprende subclases IgGl, IgG2a, IgG2b, IgG2c e IgG3.

El término "fragmentos de inmunoglobulina" como se usa en el presente documento

incluyen, pero no se limita a, (i) una región que incluye, por ejemplo, una región CH1, CH2 o CH3, (ii) el fragmento Fab que consiste en VL, VH, CL o CK y regiones CH1, incluyendo Fab' y Fab'-SH, (ii) el fragmento Fd que consiste de las regiones VH y CH1, (iii) el fragmento dAb (Ward ES *et al.*, (1989) Nature, 341(6242): 544-6) que consiste en una única región variable (iv) fragmentos $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab (v) fragmentos Fv de cadena sencilla (scFv), en donde una región VH y un dominio VL están unidos por un enlazador de péptido que permite a las dos regiones para asociarse para formar un sitio de unión del antígeno (Bird RE et al., (1988) Science, 242(4877): 423-6; Huston JS *et al.*, (1988) Proc Natl Acad Sci U S A, 85(16): 5879-83), (vi) "diacuerpos" o "triacuerpos", fragmentos multivalentes o multiespecíficos construidos por fusión del gen (Holliger P *et al.*, (1993) Proc Natl Acad Sci U S A, 90(14): 6444-8; Tomlinson I & Holliger P, (2000) Methods Enzymol, 326:461-79), (vii) scFv, diacuerpo o anticuerpo de región fusionado a una región Fc y (viii) scFv fusionado con el mismo o un anticuerpo diferente.

El término "región variable" hace referencia a las regiones o dominios que intervienen en la unión del antígeno y define especificidad de un anticuerpo particular para un antígeno particular. En los anticuerpos de origen natural, el sitio de unión del antígeno se compone de dos regiones variables que definen especificidad: una situada en la cadena pesada, se hace referencia en este documento como región variable de cadena pesada (VH) y la otra ubicada en la cadena ligera, mencionada en este documento como región variable de cadena ligera (VL). En los seres humanos, la región variable de cadena pesada (VH) se puede dividir en siete subgrupos o subclases: VH1, VH2, VH3, VH4, VH5, VH6 y VH7. En algunos casos, la especificidad puede residir exclusivamente en sólo una de las dos regiones como en anticuerpos de un único dominio de anticuerpos de cadena pesada encontrados en camélidos. Las regiones V suelen ser de aproximadamente 110 aminoácidos de longitud y consisten de tramos relativamente invariables de la secuencia del aminoácido llamadas regiones de marco (FR o "regiones sin CDR") de 15-30 aminoácidos separados por regiones más cortas de variabilidad extrema llamada "regiones hipervariables" que tienen 7-17 aminoácidos de longitud. Los dominios variables de cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden cuatro FR, en gran medida adoptando una configuración beta-hoja, conectada por tres regiones hipervariables, que forman bucles. Las regiones hipervariables en cada cadena se mantienen en proximidad cercana por las FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión de antígeno de anticuerpos (véase Kabat EA et al., *supra*). El término "región hipervariable" como se utiliza en este documento se refiere a los residuos del aminoácido de un anticuerpo que se encargan de la unión del antígeno. La región hipervariable consta generalmente de residuos de aminoácido de una "región determinante complementaria" o "CDR", la última siendo de mayor variabilidad de la secuencia y/o implicada en el reconocimiento del antígeno. Para todas las regiones variables la numeración es de acuerdo a Kabat

(Kabat EA et al., *supra*).

Una serie de definiciones de CDR está en uso y se engloba en este documento. La definición de Kabat se basa en la variabilidad de la secuencia y es la más comúnmente utilizada (Kabat EA et al., ibid.). Chothia se refiere en cambio a la ubicación de los bucles estructurales (Chothia & Lesk J. (1987) Mol Biol, 196: 901-917). La definición de AbM es un compromiso entre las definiciones de Kabat y Chothia y es utilizada por el software de modelado de anticuerpo AbM del Oxford Molecular (Martin ACR *et al.*, (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:9268–9272; Martin ACR *et al.*, (1991) Methods Enzymol, 203: 121–153; Pedersen JT *et al.*, (1992) Immunomethods, 1: 126–136; Rees AR *et al.*, (1996) In Sternberg M.J.E. (ed.), Protein Structure Prediction. Oxford University Press, Oxford, 141–172). La definición de contacto se ha introducido recientemente (MacCallum RM *et al.*, (1996) J Mol Biol, 262: 732-745) y se basa en un análisis de las estructuras complejas disponibles disponibles en el Protein Databank. La definición de la CDR por IMGT®, el sistema de información internacional ImMunoGeneTics® (http://www.imgt.org) se basa en la numeración de IMGT de todas las inmunoglobulinas y receptor de células T V-REGION de todas las especies (IMGT®, el sistema de información internacional ImMunoGeneTics®; Lefranc MP *et al.*, (1999) Nucleic Acids Res, 27(1): 209-12; Ruiz M *et al.*, (2000) Nucleic Acids Res, 28(1): 219-21; Lefranc MP (2001) Nucleic Acids Res, 29(1): 207-9; Lefranc MP (2003) Nucleic Acids Res, 31(1): 307-10; Lefranc MP *et al.*, (2005) Dev Comp Immunol, 29(3): 185-203; Kaas Q *et al.*, (2007) Briefings in Functional Genomics & Proteomics, 6(4): 253-64). Todas las regiones determinantes de complementariedad (CDR) según se refieren en la presente invención, se definen preferiblemente como sigue (numeración según Kabat EA *et al.*, *supra*): LCDR1: 24-34, LCDR2: 50-56, LCDR3: 89-98, HCDR1: 26-35, HCDR2: 50-65, HCDR3: 95-102.

Las "regiones sin CDR" del dominio variable se conocen como regiones de marco (FR). Las "regiones sin CDR" de la región VL como se usa en este documento constituyen las secuencias de aminoácidos: 1-23 (FRl), 35-49 (FR2), 57-88 (FR3) y 99-107 (FR4). Las "regiones sin CDR" de la región VH en este documento constituyen las secuencias de aminoácidos: 1-25 (FRl), 36-49 (FR2), 66-94 (FR3) y 103-113 (FR4).

Las CDR de la presente invención pueden abarcar "CDR extendidas", que se basan en las definiciones antes mencionadas y tienen residuos de dominio variable como sigue: LCDR1: 24-36, LCDR2: 46-56, LCDR3:89-97, HCDR1: 26-35, HCDR2:47-65, HCDR3: 93-102. Estas CDR extendidas se numeran así como de acuerdo a Kabat *et al., supra*. La "región sin CDR extendida" de la región VL como se usa en este documento constituyen las secuencias de aminoácidos: 1-23 (FR1), 37-45 (FR2), 57-88 (FR3), y 98- aproximadamente 107 (FR4). La "región sin CDR extendida" de la región VH en este documento constituyen las secuencias de aminoácidos: 1-25 (FR1), 37-46 (FR2), 66-92 (FR3), y 103- aproximadamente 113 (FR4).

El término "Fab" o "FAB" o "región Fab" o "región FAB", como se usa en este documento incluye los polipéptidos que comprenden la VH, CH1, VL y regiones de inmunoglobulina constantes de cadena ligera. Fab puede referirse a esta región en aislamiento, o esta región en el contexto de un anticuerpo de longitud completa o un fragmento de anticuerpo.

El término "Fc" o "región Fc" en este documento incluye el polipéptido que comprende la región constante de una cadena pesada de anticuerpo excepto la primera región de inmunoglobulina de región constante. De esta manera Fc se refiere a las últimas dos regiones de inmunoglobulina de región constante IgA, IgD e IgG y las tres últimas regiones de inmunoglobulina de región constante de IgE e IgM y el N-terminal de bisagra flexible a estas regiones. Para IgA e IgM, Fc puede incluir la cadena J. Para IgG, Fc comprende las regiones de inmunoglobulina Cgamma2 y Cgamma3 (Cγ2 y Cγ3) y la bisagra entre Cgamma1 (Cγl) y Cgamma2 (Cγ2). Aunque los límites de la región Fc pueden variar, la región de Fc de cadena pesada IgG humana se define generalmente para comprender los residuos C226 o P230 a su carboxilo-terminal, en donde la numeración está de acuerdo con el índice EU. Fc puede referirse a esta región en aislamiento o esta región en el contexto de un polipéptido Fc, por ejemplo un anticuerpo.

El término "región constante de inmunoglobulina", como se usa aquí, se refiere a la inmunoglobulina o regiones constantes cadena pesada de anticuerpo de especies humanas o animales y abarca todos los isotipos. Preferiblemente, las regiones constantes de inmunoglobulina son de origen humano y se seleccionan del grupo que consiste de, pero no limitado a: IGHG1 CH1, IGHG2 CH1, IGHG3 CH1, IGHG4 CH1, IGHA1 CH1, IGHA2 CH1, IGHE CH1, IGHEP1 CH1, IGHM CH1, IGHD CH1, IGHGP CH1, IGHG1 CH2, IGHG2 CH2, IGHG3 CH2, IGHG4 CH2, IGHA1 CH2, IGHA2 CH2, IGHE CH2, IGHEP1 CH2, IGHM CH2, IGHD CH2, IGHGP CH2, IGHG1 CH3, IGHG2 CH3, IGHG3 CH3, IGHG4 CH3, IGHA1 CH3, IGHA2 CH3, IGHE CH3, IGHEP1 CH3, IGHM CH3, IGHD CH3, IGHGP CH3, IGHE CH4 y IGHM CH4. "Regiones constantes de inmunoglobulina" se seleccionan del grupo que consta de IGHE CH2, IGHM CH2, IGHG1 CH3, IGHG2 CH3, IGHG3 CH3, IGHG4 CH3, IGHA1 CH3, IGHA2 CH3, IGHE CH3, IGHM CH3, IGHD CH3 e IGHGP CH3 humanas. "Regiones constantes de inmunoglobulina" más preferidas se seleccionan del grupo que consta de IGHG1 CH3, IGHG2 CH3, IGHG3 CH3, IGHG4 CH3, IGHA1 CH3, IGHA2 CH3, IGHE CH3, IGHM CH3, IGHD CH3 y IGHGP CH3 humanas.

El término "región de unión al epítope" incluye un polipéptido o un fragmento del mismo que tiene la secuencia de aminoácidos mínima para permitir la unión específica de la molécula de inmunoglobulina a uno o más epítopes. Los anticuerpos de origen natural tienen dos regiones de unión de epítope que también se conocen como unión de antígeno o sitios de combinación o paratopos. Las regiones de unión de epítope en los anticuerpos de origen natural están confinados dentro de las regiones CDR de los dominios VH y/o VL en donde la unión de

epítope que media el aminoácido se encuentran. Además de los anticuerpos de origen natural, los dominios VH o dominios VL artificiales o fragmentos de los mismos y combinaciones de los mismos pueden ser diseñados para proporcionar regiones de unión de epítope (Holt LJ *et al.*, (2003) Trends Biotechnol, 21(11): 484-490; Polonelli L *et al.,* (2008) PLoS ONE, 3(6): e2371). Ejemplos de regiones de unión de epítope basado en no inmunoglobulina se pueden encontrar en los dominios de proteínas artificiales utilizados como "andamio" para el diseño de regiones de unión de epítope (Binz HK *et al.,* (2005) Nat Biotechnol, 23(10): 1257-1268) o miméticos de epítope (Murali R & Greene MI (2012) Pharmaceuticals, 5(2): 209-235). Preferiblemente, el término "región de unión de epítope" incluye la combinación de uno o más dominios variables de cadena pesada y uno o más dominios complementarios variables de cadena ligera que en conjunto forman un sitio de unión que permite la unión específica de la molécula de inmunoglobulina a uno o más epítopes. Los ejemplos de una región de unión al epítope como se ejemplifica en la presente invención incluyen scFv y FAB.

Tal como se utiliza aquí, el término "epítope" incluye un fragmento de un polipéptido o proteína o una molécula no proteína que tiene actividad antigénica o inmunogénica en un animal, preferiblemente en un mamífero y más preferiblemente en un ser humano. Un epítope que tiene actividad inmunogénica es un fragmento de un polipéptido o proteína que provoca una respuesta de anticuerpos en un animal. Un epítope que tiene actividad antigénica es un fragmento de un polipéptido o proteína al que un anticuerpo o polipéptido se une específicamente como se determina por cualquier método bien conocido por un experto en la técnica, por ejemplo mediante inmunoensayos. Los epítopes antigénicos no necesitan ser necesariamente inmunogénicos. Preferiblemente, el término "epítope", como se usa aquí se refiere a una secuencia de polipéptido de al menos aproximadamente 3 a 5, preferiblemente de aproximadamente 5 a 10 o 15 y no más de aproximadamente 1,000 aminoácidos (o cualquier número entero entre éstos), que definen una secuencia que por sí misma o como parte de una secuencia mayor, se une a un anticuerpo generado en respuesta a tal secuencia. No hay límite superior crítico para la longitud del fragmento, que puede comprender casi la longitud completa de la secuencia de proteína, o incluso una proteína de fusión que comprende uno o más epítopes. Un epítope para su uso en la presente invención no se limita a un polipéptido que tiene la secuencia exacta de la porción de la proteína de origen de la que se deriva. Así, el término "epítope" abarca secuencias idénticas a la secuencia nativa, así como modificaciones a la secuencia nativa, tales como deleciones, adiciones y sustituciones (generalmente conservadoras en la naturaleza). Los epítopes de antígenos de proteína se dividen en dos categorías, los epítopes conformacionales y epítopes lineales, basados en su estructura e interacción con el sitio de unión a epítope (Goldsby R *et al.*, (2003) "Antigens (Chapter 3)" Immunology (quinta edición ed.), New York: W. H. Freeman and Company. pp. 57-75, ISBN 0-7167-4947-5). Un epítope conformacional se compone de secciones discontinuas de la secuencia de aminoácidos del antígeno.

Estos epítopes interactúan con el paratopo basado en las características de superficie 3-D y la forma o la estructura terciaria del antígeno. La mayoría de los epítopes son conformacionales. Por el contrario, los epítopes lineales interactúan con el paratopo en base a su estructura primaria. Un epítope lineal está formado por una secuencia continua de aminoácidos del antígeno.

El término "inmunoglobulina hetero-dimérica" o "fragmento hetero-dimérico" o "heterodímero" o "heterodímero de cadenas pesadas" como se usa en este documento incluye una molécula de inmunoglobulina o parte que comprende al menos un primer y un segundo polipéptido, como una primera y una segunda región, en donde el segundo polipéptido difiere en la secuencia de aminoácidos desde el primer polipéptido. Preferiblemente, una inmunoglobulina hetero-dimérica comprende dos cadenas de polipéptido, en donde la primera cadena tiene al menos una región no idéntica a la segunda cadena, y en donde ambas cadenas se ensamblan, es decir, interactúan a través de sus regiones no idénticas. Más preferiblemente, la inmunoglobulina hetero-dimérica, tiene especificidad de unión para al menos dos ligandos diferentes, antígenos o sitios de unión, es decir, es biespecíficos. La inmunoglobulina hetero-dimérica como se utiliza aquí incluye, pero no se limita a anticuerpos biespecíficos de longitud completa, Fab biespecífico, $F(ab')_2$ biespecífico, scFv biespecífico fusionado a una región Fc, diacuerpo fusionado a una región Fc y anticuerpo de dominio fusionado a una región Fc.

El término "inmunoglobulina homodimérica" o "fragmento homodimérico" u "homodímero" u "homodímero de cadenas pesadas" como se usa en este documento incluye una molécula de inmunoglobulina o parte que comprende al menos un primer y un segundo polipéptido, como una primera y una segunda región, en donde el segundo polipéptido es idéntico en la secuencia de aminoácidos al primer polipéptido. Preferiblemente, una inmunoglobulina homodimérica comprende dos cadenas de polipéptido, en donde la primera cadena tiene al menos una región idéntica a la segunda cadena, y en donde ambas cadenas se ensamblan, es decir, interactúan a través de sus regiones idénticas. Preferiblemente, un fragmento de inmunoglobulina homodimérica comprende al menos dos regiones, en donde la primera región es idéntica a la segunda región, y en donde ambas regiones se ensamblan, es decir, interactúan a través de sus interfaces de proteína-proteína.

Para todas las regiones constantes de inmunoglobulina incluidas en la presente invención, la numeración puede ser de acuerdo a IMGT® (IMGT®; *supra*).

Para todas las regiones constantes de cadena pesada de inmunoglobulina humana CH1, CH2, CH3 seleccionadas del grupo que consiste en IGHG1, IGHG2, IGHG3 y IGHG4, la numeración puede estar de acuerdo con el "sistema de numeración de EU" (Edelman GM *et al.*, (1969) Proc Natl Acad Sci USA, 63(1): 78-85). Una correspondencia completa para las regiones constantes CH1 humanas, bisagra, CH2 y CH3 de IGHG1 se puede encontrar en la base de datos

IMGT (IMGT®; *supra*).

Para la región constante de cadena ligera de inmunoglobulina kappa humana (IGKC), la numeración puede ser de acuerdo con el "sistema de numeración de EU" (Edelman GM et al., *supra*). Una correspondencia completa para la región CK humana se puede encontrar en la base de datos IMGT (IMGT®; *supra*).

Para las regiones constantes de cadena ligera lambda de inmunoglobulina humana (IGLC1, IGLC2, IGLC3, IGLC6 y IGLC7), la numeración puede ser de acuerdo con el "sistema de numeración de Kabat" (Kabat EA *et al.*, *supra*). Una correspondencia completa para las regiones IGLC humanas se puede encontrar en la base de datos IMGT (IMGT®; *supra*).

Las regiones constantes de cadena pesada de inmunoglobulina IgG1 humanas a las que se hace referencia en el presente documento tienen los siguientes límites de la región: región CH1 (numeración de EU: 118-215), región 1 ·bisagra (numeración de EU: 216-230), región CH2 (numeración de EU: 231-340) y región CH3 (numeración de EU: 341-447). La región CK humana contemplada en el presente documento abarca los residuos 108 a 214 (numeración de EU). Las regiones humanas IGLC1, IGLC2, IGLC3, IGLC6 y IGLC7 referidas en el presente documento abarcan los residuos 108-215 (numeración de Kabat).

Los términos "aminoácido" o "residuo de aminoácido" como se usa en este documento incluye aminoácidos naturales, así como aminoácidos no naturales. Preferiblemente se incluyen aminoácidos naturales.

El término "modificación" o "modificación de aminoácidos" en el presente documento incluye una sustitución de aminoácido, inserción y/o deleción en una secuencia de polipéptido. Los términos "sustitución" o "sustitución de aminoácido" o "sustitución de residuo de aminoácido" como se utiliza aquí se refiere a una sustitución de un primer residuo de aminoácido en una secuencia de aminoácidos con un segundo residuo de aminoácido, mientras que el primer residuo de aminoácidos es diferente del segundo residuo de aminoácidos es decir, el residuo de aminoácido sustituido es diferente del aminoácido que ha sido sustituido. Por ejemplo, la sustitución R94K se refiere a un polipéptido variante, en donde la arginina en la posición 94 se sustituye por una lisina. Por ejemplo 94K indica la sustitución de la posición 94 con una lisina. A los efectos del presente documento, las sustituciones múltiples suelen ser separadas por una barra o una coma. Por ejemplo, "R94K/L78V" o "R94K, L78V" se refiere a una variante doble que comprende las sustituciones R94K y L78V. Por "inserción del aminoácido" o "inserción" según lo utilizado en el presente documento se entiende la adición de un aminoácido en una posición particular en una secuencia de polipéptido de origen. Por ejemplo, inserto -94 señala una inserción en la posición 94. Por "supresión del aminoácido" o "supresión" según lo utilizado en el presente documento se entiende la eliminación de un aminoácido en una posición particular en una secuencia de polipéptidos de origen. Por ejemplo, R94- señala la

supresión de la arginina en la posición 94.

En ciertas modalidades, los términos "disminuir", "reducir", o "reducción" en la unión a la proteína A se refiere a una disminución total de al menos 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, o 99% hasta 100% (eliminación) en la unión de una inmunoglobulina modificada o su fragmento a la proteína A detectada por métodos conocidos en la técnica estándar, tales como aquellos descritos aquí, como en comparación con una parental es decir, inmunoglobulina no modificada o IgG de tipo silvestre o una IgG que tiene la región Fc IgG humana de tipo silvestre. En ciertas modalidades estos términos alternativamente se pueden referir a una disminución total de 10 veces (es decir, 1 log), 100 veces (2 logs), 1000 veces (o 3 logs), 10,000 veces (o 4 logs), o 100,000 veces (o 5 logs).

Los términos "eliminar", "anular", "eliminación" o "anulación" de unión a la proteína A se refiere a una disminución total del 100% en la unión de una inmunoglobulina modificada o su fragmento a la proteína A es decir, una pérdida completa de la unión de una inmunoglobulina modificada o su fragmento a la proteína A, detectada por métodos conocidos en la técnica estándar, tales como aquellos descritos aquí, en comparación con una parental es decir, inmunoglobulina no modificada o IgG de tipo silvestre o una IgG que tiene la región Fc IgG humana tipo silvestre.

Del mismo modo, los términos "disminuir", "reducir", o "reducción" en la unión a un reactivo de afinidad se refiere a una disminución total de al menos 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% , 85%, 90%, 95%, 97%, o 99% hasta 100% (eliminación) en la unión de una inmunoglobulina modificada o su fragmento al reactivo de afinidad detectado por métodos conocidos en la técnica estándar, tales como aquellos descritos aquí, como en comparación con una parental, es decir, inmunoglobulina no modificada o IgG de tipo silvestre, o una IgG que tiene la región Fc IgG humana de tipo silvestre. En ciertas modalidades estos términos alternativamente se pueden referir a una disminución total de 10 veces (es decir, 1 log), 100 veces (2 logs), 1000 veces (o 3 logs), 10,000 veces (o 4 logs), o 100,000 veces (o 5 logs).

Los términos "eliminar", "anular", "eliminación" o "anulación" de unión a un reactivo de afinidad se refiere a una disminución total del 100% en la unión de una inmunoglobulina modificada o su fragmento al reactivo de afinidad es decir, una pérdida completa de la unión de una inmunoglobulina modificada o su fragmento al reactivo de afinidad detectado por métodos conocidos en la técnica estándar, tales como aquellos descritos aquí, en comparación con una parental, es decir, inmunoglobulina no modificada o IgG de tipo silvestre o una IgG que tiene la región Fc IgG humana tipo silvestre.

"Anticuerpos biespecíficos" son anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes. En ciertas modalidades, los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos biespecíficos con una o más modificaciones de aminoácidos en la

región VH en relación con el anticuerpo parental. En ciertas modalidades, los anticuerpos biespecíficos pueden ser anticuerpos humanos o humanizados. Los anticuerpos biespecíficos también se pueden utilizar para localizar agentes citotóxicos a las células que expresan un antígeno objetivo. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión a antígeno objetivo y un brazo que une un agente citotóxico, tal como, por ejemplo, saporina, anti-interferón-·, alcaloide de vinca, cadena A de ricina, metotrexato o hapteno de isótopo radioactivo. Los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo. Los métodos para hacer anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la co-expresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, en donde las dos cadenas pesadas tienen diferentes especificidades (Milstein and Cuello, (1983) Nature, 305: 537-40). Debido a la variedad aleatoria de cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de diferentes moléculas de anticuerpo, de las cuales sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que normalmente se realiza mediante etapas de cromatografía de afinidad, es bastante engorrosa y los rendimientos del producto son bajos. Procedimientos similares se describen en WO1993/08829 y en Traunecker et al, (1991) EMBO J, 10: 3655-9. De acuerdo con un enfoque diferente, las regiones variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se fusionan las secuencias de región constante de inmunoglobulina. La fusión, por ejemplo, es con una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de la bisagra, las regiones CH2 y CH3. En ciertas modalidades, la primera región constante de cadena pesada (CH1), que contiene el sitio necesario para la unión de cadena ligera, está presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y se co-transfectan en un organismo hospedero adecuado. Esto proporciona flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptido en modalidades cuando las relaciones desiguales de las tres cadenas de polipéptido utilizadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Es, sin embargo, posible insertar las secuencias de codificación para dos o todas las tres cadenas de polipéptido en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas de polipéptido en relaciones iguales resulta en rendimientos elevados o cuando las relaciones no son de significación particular.

Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos entrelazados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado puede estar acoplado a avidina, el otro a biotina. Dichos anticuerpos, por ejemplo, han sido propuestos para las células del sistema inmune objetivo a las células no deseadas (US4,676,980) y para el tratamiento

de infección por HIV (WO1991/00360, WO1992/00373 y EP03089). Los anticuerpos heteroconjugados pueden hacerse utilizando cualquier método de entrelazamiento conveniente. Los agentes de entrelazamiento adecuados son bien conocidos en la técnica (véase US4,676,980), junto con un número de técnicas de entrelazamiento. Los anticuerpos con más de dos valencias también se contemplan. Por ejemplo, anticuerpos triespecíficos se pueden preparar (véase Tutt A *et al*. (1991) J. Immunol. 147: 60-9).

Proteína A: La proteína A es un componente de pared celular producido por varias cepas de *Staphylococcus aureus* que consiste en una única cadena de polipéptido. El producto de gen de la proteína A consiste de cinco repeticiones homólogas unidas en una forma de tándem a la pared celular del patógeno. Los cinco dominios son de aproximadamente 58 aminoácidos de longitud y denotan EDABC, cada uno que exhibe la actividad de unión de inmunoglobulina (Tashiro M & Montelione GT (1995) Curr. Opin. Struct. Biol., 5(4): 471-481). Los cincos dominios de unión de inmunoglobulina homólogos se pliegan en un paquete de tres hélices. Cada dominio es capaz de unir proteínas de muchas especies de mamíferos, más notablemente IgG (Hober S et al., (2007) J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci., 848(1): 40-47). La proteína A une la cadena pesada de la mayoría de las inmunoglobulinas dentro de la región Fc pero también dentro de la región Fab en el caso de la familia VH3 humana (Jansson B et al, (1998) FEMS Immunol. Med. Microbiol., 20(1): 69-78). La proteína A une IgG de varias especies, incluyendo humano, ratón, conejo y conejillo de indias pero no une IgG3 humana (Hober S *et al.*, (2007) *supra*). La incapacidad de IgG3 humana para unir la proteína A se puede explicar por las sustituciones de H435R y Y436F en la región Fc de IgG3 humana (numeración de EU, Jendeberg *et al.*, (1997) J. Immunol. Methods, 201(1): 25-34). Además de IgG, la proteína A también interactúa con IgM e IgA.

Entre las subclases de VH humano, VH3 es la única subclase para unir la proteína A (Graille M *et al.*, (2000) Natl. Acad. Sci. USA 97(10): 5399-5404), y los cinco dominios de la proteína A se sabe que unen esta subclase de dominio variable (Jansson B et al, (1998) FEMS Immunol. Med. Microbiol., 20(1): 69-78. Las inmunoglobulinas basadas en VH3 o sus fragmentos son de gran importancia para la industria biotecnológica. Las moléculas basadas en VH3 han sido ampliamente desarrolladas desde su capacidad para unir la proteína A facilita su pre-selección funcional, y como tal muchas genotecas de despliegue de fago basadas en donador o sintéticas o tecnologías de animales transgénicos utilizadas para el descubrimiento de anticuerpo se basan en la subclase VH3. Además las moléculas basadas en VH3 son seleccionadas frecuentemente por su buena expresión y estabilidad de las otras subclases de dominio variable de cadena pesada conocidas.

La capacidad de la proteína A para unir anticuerpos con dicha alta afinidad es la principal motivación para su uso a escala industrial de farmacéuticos biológicos. La proteína A utilizada para la producción de anticuerpos en bio-farmacéuticos se produce usualmente de forma

recombinante en *E. coli* y funciona esencialmente la misma que la proteína nativa A (Liu HF *et al.*, (2010) MAbs, 2(5): 480-499).

Más comúnmente, la proteína A recombinante se une a una resina de cromatografía de fase estacionaria para la purificación de anticuerpos. La unión óptima se produce a pH 8.2, a pesar de que la unión también es buena en condiciones neutras o fisiológicas (pH 7.0-7.6). La elución se consigue normalmente mediante el cambio de pH hacia un pH ácido (glicina-HCl, pH 2.5-3.0). Esto disocia efectivamente la mayoría de las interacciones de unión proteína-proteína y anticuerpo-antígeno sin afectar de forma permanente la estructura de la proteína. Sin embargo, algunos anticuerpos y proteínas son dañados por un pH bajo y es mejor neutralizar inmediatamente después de la recuperación por la adición de 1/10a volumen de regulador de pH alcalino tal como Tris-HCl 1M, pH 8.0 para minimizar la duración de tiempo en la condición de pH bajo.

Hay varias resinas de cromatografía de proteína A comercialmente disponibles. Las principales diferencias entre estos medios son del tipo de matriz de soporte, modificación de ligando de proteína A, tamaño de poro y tamaño de partícula. Las diferencias en estos factores dan lugar a diferencias en la compresibilidad, químicas y robustez física, resistencia a la difusión y la capacidad de unión de los adsorbentes (Hober S *et al.*, (2007), *supra*). Los ejemplos de resinas de cromatografía de proteína A incluyen pero no se limitan a la resina de proteína A MabSelect SuRe™ y resina de proteína A MabSelect™ de GE Healthcare tal como se utiliza en los ejemplos.

El término "cromatografía" se refiere a cromatografía líquida de proteína e incluye cromatografía líquida de proteína rápida (FPLC), que es una forma de cromatografía líquida que frecuentemente se utiliza para analizar o purificar mezclas de proteínas. Al igual que en otras formas de cromatografía, la separación es posible porque los diferentes componentes de una mezcla tienen diferentes afinidades por dos materiales, un fluido en movimiento (la fase móvil) que pasa a través de un sólido poroso (la fase estacionaria). En FPLC, la fase móvil es una solución acuosa, o "regulador de pH". El caudal de regulador de pH se puede operar bajo un flujo por gravedad o controlado por una bomba de desplazamiento positivo que normalmente se mantiene a una tasa constante, mientras que la composición del regulador de pH se puede variar mediante la elaboración de fluidos en diferentes proporciones de dos o más reservorios externos. La fase estacionaria es una resina compuesta de perlas, por lo general de agarosa entrelazada, empacadas en un vaso cilíndrico o columna de plástico. Las resinas FPLC están disponibles en un amplio intervalo de tamaños de perla y ligandos de superficie dependiendo de la aplicación.

El procedimiento de "cromatografía de afinidad" implica el uso de un reactivo de afinidad como ligandos que se entrelazan a la fase estacionaria y que tienen afinidad de unión para moléculas específicas o una clase de moléculas. Los ligandos pueden ser biomoléculas, como proteínas o ligandos pueden ser moléculas sintéticas. Ambos tipos de ligando tienden a tener una

buena especificidad. El ligando de proteína más comúnmente usado en la producción es la proteína A del reactivo de afinidad. En la cromatografía de afinidad cuando la solución (por ejemplo, un sobrenadante celular crudo que contiene una proteína de interés) se carga en la columna la proteína objetivo generalmente se adsorbe mientras que permite a los contaminantes (otras proteínas, lípidos, carbohidratos, ADN, pigmentos, etc.) pasar a través de la columna. El adsorbente por sí mismo está normalmente empacado en una columna de cromatografía; aunque la etapa de adsorción se puede realizar mediante el uso del adsorbente como una suspensión agitada en el modo de unión de lote. La siguiente etapa después de la adsorción es la etapa de lavado, en la que el adsorbente se lava para eliminar los contaminantes residuales. La proteína unida se eluye a continuación, en una forma semi-pura o pura. La elución se consiguió normalmente mediante el cambio del regulador de pH o composición salina de manera que la proteína ya no puede interactuar con el ligando inmovilizado y se libera. En algunos casos la proteína de interés no puede unir la resina de afinidad y la cromatografía de afinidad se dirige a la unión de contaminantes no deseados y la fracción no unida por lo tanto se recolecta para aislar la proteína de interés. La cromatografía de afinidad puede realizarse en un lecho fijo o un lecho fluidizado.

El término "cromatografía de modo gradiente" se refiere a un método de cromatografía en donde la proporción del regulador de pH de "elución" (regulador de pH B) se aumenta de 0% a 100% de una manera gradual o por etapas.

Los términos "cromatografía de modo captura-elución" o "modo de purificación de captura-elución" o "purificación de captura-elución" se refiere a un método de cromatografía en donde la proporción del regulador de pH de "elución" (regulador de pH B) no se incrementa de 0% a 100 % de una manera gradual o por etapas, sino más bien directamente aplicado a un 100% después de la captura y opcionalmente un paso de lavado con regulador de pH de ejecución (regulador de pH A).

Desarrollo de inmunoglobulinas hetero-diméricas dirigidas a CD3 y CD38

La presente invención proporciona una región de unión de epítope que une el complejo de proteína CD3 que comprende las CDR de cadena pesada y ligera como se describe *supra* y que comprende además una región de cuadro variable de cadena pesada que es el producto de o derivado de un gen humano IGHV3-23*04 (SEQ ID NO: 37). La región de marco variable de cadena pesada comprende al menos una modificación de aminoácido de la región de marco correspondiente de la región variable de cadena pesada del anticuerpo murino OKT3 correspondiente que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38. Preferiblemente la modificación de aminoácido es una substitución del aminoácido. Por lo general, no más de siete, preferiblemente no más de seis, preferiblemente no más de cinco, preferiblemente no más de

cuatro, más preferiblemente no más de tres, aún más preferiblemente no más de dos, más preferiblemente no más de una de las modificaciones del aminoácido se realizan dentro de una región de marco. En algunas modalidades, la presente descripción proporciona una región de unión de epítope que se une al complejo de proteína CD3, en donde la modificación de aminoácido de las regiones de cuadro de la región variable de cadena pesada comprende una sustitución de aminoácido en la posición de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de: 34, 48, 49, 58, 69, 71 y 73 y en donde la posición de aminoácido de cada miembro del grupo se indica de acuerdo con la numeración de Kabat. Preferiblemente, las sustituciones de aminoácido de las regiones de cuadro de la región variable de cadena pesada se seleccionan del grupo que consiste de: I34M, V48I, A49G, R58N, R58Y, I69L, A71T y T73K. La sustitución de aminoácido preferida de las regiones de cuadro de la región variable de cadena pesada es en las posiciones de aminoácido seleccionadas del grupo que consiste de 34, 49 y 71. Las sustituciones de aminoácido más preferidas de las regiones de cuadro de la región variable de cadena pesada se seleccionan del grupo que consiste de I34M, A49G y A71T.

En un aspecto adicional, la región de unión de epítope del primer polipéptido que une el complejo de proteína CD3 comprende una región de cuadro variable de cadena ligera que es el producto de o derivado de un gen humano seleccionado del grupo que consiste de: IGKV1-39*01 (SEQ ID NO: 39) y IGKV3-20*01 (SEQ ID NO: 40). La región de marco variable de cadena ligera comprende al menos una modificación de aminoácido de la región de marco correspondiente de la región variable de cadena ligera del anticuerpo murino correspondiente OKT3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41. Preferiblemente la modificación de aminoácido es una substitución del aminoácido. Normalmente, no más de ocho, preferiblemente no más de siete, preferiblemente no más de seis, preferiblemente no más de cinco, preferiblemente no más de cuatro, más preferiblemente no más de tres, incluso más preferiblemente no más de dos, más preferiblemente no más de una modificaciones de aminoácido se realizan dentro de una región de cuadro. En algunas modalidades, la presente descripción proporciona una región de unión de epítope que se une al complejo de proteína CD3, en donde la modificación de aminoácido de las regiones de cuadro de la secuencia de región variable de cadena ligera comprende una sustitución de aminoácido en la posición de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de: 4, 33, 34, 46, 47, 66, 71 y 96. Preferiblemente, las sustituciones de aminoácido de las regiones de cuadro de la región variable de cadena ligera se seleccionan del grupo que consiste de: M4L, V33M, A34N, L46R, L47W, R66G, F71Y y P96F. La sustitución de aminoácido preferida de las regiones de cuadro de la región variable de cadena ligera son en las posiciones de aminoácido seleccionadas del grupo que consiste de 4, 46 y 47. Las sustituciones de aminoácido más preferidas de las regiones de cuadro de la región variable de cadena ligera se seleccionan del grupo que consiste de M4L, L46R, L47W y F71Y. En

algunas modalidades, la región de unión de epítope del primer polipéptido que se une al complejo de proteína CD3 puede comprender modificaciones de aminoácido de las regiones de cuadro de la secuencia de región variable de cadena pesada como se indica anteriormente y modificaciones de aminoácido de las regiones de cuadro de la secuencia de región variable de cadena ligera como se establece anteriormente.

La presente descripción también proporciona un anticuerpo o su fragmento que se une al complejo de proteína CD3 que comprende una secuencia de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOs: 79 a 90, 91-95 y 64, preferiblemente seleccionada que consiste de SEQ ID NO: 64. La presente descripción también proporciona un anticuerpo o su fragmento que se une al complejo de proteína CD3 que comprende una secuencia de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOs: 96 a 104, 105 a 126, 127, 128 y 129 preferiblemente consistiendo de SEQ ID NO: 127.

Teniendo en cuenta que cada una de estas secuencias de región variable de cadena pesada y ligera puede unirse al complejo de proteína CD3, las secuencias de región variable de cadena pesada y ligera pueden ser "mezcladas y combinadas" para crear moléculas de unión anti-CD3 de la invención. La unión de CD3 de dichos anticuerpos "mezclados y combinados" se puede probar usando los ensayos de unión descritos, por ejemplo, en los ejemplos.

<u>Ingeniería de la región constante de inmunoglobulina para promover la formación de heterodímero sobre la formación de homodímero</u>

Los métodos para producir inmunoglobulinas hetero-diméricas son conocidos en la técnica y uno de los métodos más simples se basa en la expresión de las dos cadenas de inmunoglobulina distintas en una sola célula (WO95/33844, Lindhofer H & Thierfelder S). Sin ingeniería, este método directo está limitado por la formación de especies homo-diméricas sobre el hetero-dímero de interés (Kufer P *et al.*, (2004) Trends Biotechnol, 22 (5): 238-244). Cuando se utilizan tecnologías complementarias que mejorarán la hetero-dimerización de cadena pesada (Merchant AM *et al.*, (1998) Nat Biotechnol, 16 (7): 677-681), mayor producción de hetero-dímero se puede lograr pero aún resulta en la producción de una cantidad significante de homo-dímeros indeseables (Jackman J *et al*, (2010). J Biol Chem., 285(27): 20850-9, Klein C *et al.*, (2012) MAbs, 4(6): 653-63). La presente invención por lo tanto utiliza el método descrito por la tecnología BEAT® (publicación de PCT No: WO2012/131555), que se basa en un concepto único de bio-mimetismo que exhiben hetero-dimerización superior sobre los métodos de la técnica anterior. La tecnología BEAT se basa en un intercambio de interfaz entre pares de dominio de inmunoglobulina homo o hetero-dimérica de origen natural para crear nuevos heterodímeros que pueden usarse como bloques de construcción para los anticuerpos biespecíficos basados en Fc.

En un aspecto, la presente invención proporciona una inmunoglobulina hetero-dimérica o su fragmento que comprende el primero y segundo polipéptidos que comprenden una región constante de inmunoglobulina diseñada con un dominio de CH3 modificado que tiene una interfaz de proteína-proteína, en donde la interfaz de proteína-proteína del primer polipéptido comprende una sustitución de aminoácido en una posición seleccionada del grupo que consiste de: 3, 5, 7, 20, 22, 26, 27, 79, 81, 84, 84.2, 85.1, 86, 88 y 90 (numeración IMGT®), y en donde la interfaz de proteína-proteína del segundo polipéptido comprende una sustitución de aminoácido en la posición 84.4 y en una posición seleccionada del grupo que consiste de 3, 5, 7, 20, 22, 26, 27, 79, 81, 84, 84.2, 85.1, 86, 88 y 90 (numeración IMGT®).

En una modalidad adicional, la presente invención proporciona una inmunoglobulina hetero-dimérica o su fragmento, en donde el primero y segundo polipéptidos comprenden una región constante de inmunoglobulina diseñada con un dominio de CH3 modificado que tiene una interfaz de proteína-proteína, en donde la interfaz de proteína-proteína del primer polipéptido comprende una sustitución de aminoácido en la posición 88 y en una posición seleccionada del grupo que consiste de: 3, 5, 7, 20, 22, 26, 27, 79, 81, 84, 84.2, 85.1, 86 y 90 (numeración de IMGT®), y en donde la interfaz de proteína-proteína del segundo polipéptido comprende una sustitución de aminoácido en la posición 85.1 y/o 86 y en una posición seleccionada del grupo que consiste de 3, 5, 7, 20, 22, 26, 27, 79, 81, 84, 84.2, 84.4, 88 y 90 (numeración IMGT®), en donde el residuo de aminoácido sustituido en la posición 88 en la primera región constante de inmunoglobulina diseñada está interactuando con el residuo de aminoácido sustituido en la posición 85.1 y/o 86 en la segunda región constante de inmunoglobulina diseñada, en donde la posición de aminoácido de cada miembro del grupo se indica de acuerdo con la numeración de IMGT®.

Preferiblemente, el residuo de aminoácido que está sustituido en la interfaz de proteína-proteína de la primera región constante de inmunoglobulina diseñada en la posición 88 es 88W y sus sustituciones de aminoácido conservativas, en donde la posición de aminoácido está indicada de acuerdo con la numeración de IMGT®. Más preferiblemente, el residuo de aminoácido que está sustituido en la interfaz de proteína-proteína de la primera región constante de inmunoglobulina diseñada en la posición 88 es 88W y en donde el residuo de aminoácido adicional sustituido en la interfaz de proteína-proteína de la primera región constante de inmunoglobulina diseñada se selecciona del grupo que consiste de: 3A, 20V, 20T, 20A, 20N, 20Q, 20E, 20S, 20K, 20W, 22A, 22G, 22T, 22L, 22I, 22V, 26R, 26Q, 26T, 26K, 26V, 26S, 26N, 26E, 79Y, 85.1T, 85.1M, 85.1A, 85.1S, 85.1R, 85.1H, 85.1K, 85.1F, 85.1C, 85.1N, 85.1W, 86S, 86I, 86T, 86H, 86Q, 86V, 86W, 86Y, 86F y 90N, en donde la posición del aminoácido está indicada de acuerdo con la numeración de IMGT®.

Preferiblemente, el residuo de aminoácido que está sustituido en la posición 85 y 86

en la interfaz de proteína-proteína de la segunda región constante de inmunoglobulina diseñada se selecciona del grupo que consiste de: 85.1A, 85.1S, 85.1C y 86S y sus sustituciones de aminoácido conservativas (numeración de IMGT®). Más preferiblemente, el residuo de aminoácido que está sustituido en la interfaz de proteína-proteína de la segunda región constante de inmunoglobulina diseñada se selecciona del grupo que consiste de: 85.1A, 85.1S, 85.1C y 86S y en donde el residuo de aminoácido adicional sustituido en la interfaz de proteína-proteína de la segunda región constante de inmunoglobulina diseñada se selecciona del grupo que consiste de: 3E, 5A, 7F, 20T, 22V, 26T, 81D, 84L, 84.2E, 88R y 90R y sus sustituciones de aminoácido conservativas (numeración de IMGT®).

En una modalidad preferida el residuo de aminoácido que está sustituido en la interfaz de proteína-proteína de la primera región constante de inmunoglobulina diseñada en la posición 88 es 88W y en donde el residuo de aminoácido adicional sustituido en la interfaz de proteína-proteína de la primera región constante de inmunoglobulina diseñada es: 3A, 20K, 22V, 26T, 79Y, 85.1S, 86V y 90N y, en donde los residuos de aminoácido que están sustituidos en la interfaz de proteína-proteína de la segunda región constante de inmunoglobulina diseñada en las posiciones 85.1 y 86 son 85.1A, 85.1S o 85.1A y 86S y en donde el residuo de aminoácido adicional sustituido en la interfaz de proteína-proteína de la segunda región constante de inmunoglobulina diseñada es: 3E, 5A, 7F, 20T, 22V, 26T, 81D, 84L, 84.2E, 84.4Q, 88R y 90R (numeración de IMGT®).

En una modalidad alternativa, la presente invención proporciona una inmunoglobulina hetero-dimérica o su fragmento, en donde el primero y segundo polipéptidos comprenden una región constante de inmunoglobulina diseñada con un dominio de CH3 modificado que tiene una interfaz de proteína-proteína, en donde la interfaz de proteína-proteína del primer polipéptido comprende una sustitución de aminoácido en la posición 20 y en una posición seleccionada del grupo que consiste de: 3, 5, 7, 22, 26, 27, 79, 81, 84, 84.2, 85.1, 86, 88 y 90 y, en donde la interfaz de proteína-proteína del segundo polipéptido comprende una sustitución de aminoácido en la posición 26 y en una posición seleccionada del grupo que consiste de: 3, 22, 27, 79, 81, 84, 85.1, 86, y 88, en donde el residuo de aminoácido sustituido en la posición 20 en la primera región constante de inmunoglobulina diseñada está interactuando con el residuo de aminoácido sustituido en la posición 26 en la segunda región constante de inmunoglobulina diseñada, en donde la posición de aminoácido de cada miembro de grupo se indica de acuerdo con la numeración de IMGT®.

Preferiblemente, los residuos de aminoácido que están sustituidos en la interfaz de proteína-proteína de la primera cadena de inmunoglobulina diseñada comprenden los residuos de aminoácido en las posiciones 20 y 22, y opcionalmente un residuo de aminoácido adicional en una posición seleccionada del grupo que consiste de: 3, 5, 7, 26, 27, 79, 81, 84, 84.2, 84.4, 85.1, 86, 88

y 90 y, en donde los residuos de aminoácido que están sustituidos en la interfaz de proteína-proteína de la segunda cadena de inmunoglobulina diseñada comprenden los restos de aminoácido en las posiciones 26 y en una posición adicional seleccionada del grupo que consiste de: 3, 5, 7, 20, 22, 27, 79, 81, 84, 84.2, 84.4, 85.1, 86, 88 y 90, en donde la posición de aminoácido de cada miembro del grupo se indica de acuerdo con la numeración de IMGT®. Preferiblemente, los residuos de aminoácido que están sustituidos en la interfaz de proteína-proteína de la primera cadena de inmunoglobulina diseñada comprenden los residuos de aminoácido en las posiciones 20 y 22, y opcionalmente un residuo de aminoácido adicional en una posición seleccionada del grupo que consiste de: 3, 5, 7, 26, 27, 79, 81, 84, 84.2, 84.4, 85.1, 86, 88 y 90 y, en donde los residuos de aminoácido que están sustituidos en la interfaz de proteína-proteína de la segunda cadena de inmunoglobulina diseñada comprenden los residuos de aminoácido en las posiciones 26 y 86 y opcionalmente en una posición adicional seleccionada del grupo que consiste de 3, 5, 7, 20, 22, 27, 79, 81, 84, 84.2, 84.4, 85.1, 88 y 90, en donde la posición de aminoácido de cada miembro del grupo se indica de acuerdo con la numeración de IMGT®.

Más preferiblemente el residuo de aminoácido que está sustituido en la posición 20 en la interfaz de proteína-proteína de la primera región constante de inmunoglobulina diseñada se selecciona del grupo que consiste de 20V, 20T, 20A, 20N, 20Q, 20K, 20S, 20W y 20E y en donde el residuo de aminoácido adicional sustituido en la interfaz de proteína-proteína de la primera región constante de inmunoglobulina diseñada se selecciona del grupo que consiste de 3A, 22A, 22G, 22L, 22I, 22V, 22T, 26K, 26R, 26Q, 26T, 26V, 26S, 26N, 26E, 79Y, 85.1W, 85.1F, 85.1T, 85.1M, 85.1A, 85.1S, 85.1R, 85.1H, 85.1K, 85.1C, 85.1N, 86W, 86Y, 86S, 86I, 86H, 86Q, 86V, 86T, 86F, 88Q, 88L, 88V, 88R, 88E, 88T, 88I, 88Y, 88K, 88W y 90N, y en donde el residuo de aminoácido que está sustituido en la posición 26 en la interfaz de proteína-proteína de la segunda región constante de inmunoglobulina diseñada se selecciona del grupo que consiste de 26T y 26E y sus sustituciones de aminoácido conservativas, en donde la posición del aminoácido está indicada de acuerdo con la numeración de IMGT®.

En una modalidad más preferida el residuo de aminoácido que está sustituido en la interfaz de proteína-proteína de la primera región constante de inmunoglobulina diseñada en la posición 20 es 20K y en donde el residuo de aminoácido adicional sustituido en la interfaz de proteína-proteína de la primera región constante de inmunoglobulina diseñada es 3A, 22V, 26T, 79Y, 85.1S, 86V, 88W y 90N y, en donde los residuos de aminoácido que están sustituidos en la interfaz de proteína-proteína de la segunda región constante de inmunoglobulina diseñada en la posición 26 es 26T y en donde el residuo de aminoácido adicional sustituido en la interfaz de proteína-proteína de la segunda región constante de inmunoglobulina diseñada es 3E, 5A, 7F, 20T, 22V, 81D, 84L, 84.2E, 84.4Q, 85.1C/S/A, 86S, 88R y 90R (numeración de IMGT®).

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

Materiales y Métodos

Construcción de vectores de expresión para la expresión transitoria de células de mamífero

Los ADNc que codifican las diferentes cadenas de polipéptido en parte o en su totalidad fueron primero sintetizados génicamente por GENEART AG (Regensburg, Alemania) y modificados por técnicas de biología molecular convencionales. Los productos de PCR fueron digeridos con enzimas de restricción de ADN apropiados, purificados y ligados en un plásmido pcADN3.1 modificado (Invitrogen AG, Zug, Suiza) que lleva un promotor de CMV y una poliadenilación de la hormona bovina (poli(A)) previamente digerida con las mismas enzimas de restricción de ADN. Todas las cadenas de polipéptidos se ligaron independientemente en este vector de expresión donde la secreción fue impulsada por el péptido líder VJ2C murino.

Expresión de proteínas recombinantes

Los anticuerpos, proteínas de fusión ScFv-Fc, anticuerpos BEAT y antígenos se expresaron como se describe a continuación a menos que se indique lo contrario. Para la expresión transitoria, cantidades iguales de cada vector de cadena diseñada se co-transfectaron en células HEK293-EBNA adaptadas en suspensión (normas ATCC-LGL, Teddington, RU; Cat. No: CRL-10852) usando polietilenimina (PEI; Sigma, Buchs, Suiza). Típicamente, 100 ml de células en suspensión a una densidad de 0.8-1.2 millones de células por ml se transfectan con una mezcla de ADN-PEI. Cuando los vectores de expresión recombinante que codifican cada gen de cadena diseñada se introducen en las células hospederas, el constructo de inmunoglobulina se produce mediante el cultivo adicional de las células durante un período de 4 a 5 días para permitir la secreción en el medio de cultivo (EX-CELL 293, medio libre de suero-HEK293 (Sigma), suplementado con ácido plurónico 0.1%, glutamina 4 mM y 0.25 µg/ml de geneticina). Los sobrenadantes de cultivo libres de células que contienen las inmunoglobulinas secretadas se prepararon por centrifugación seguido de filtración estéril y utilizados para un posterior análisis.

Cromatografía de afinidad diferencial de proteína A

En la producción posterior, los sobrenadantes libres de células se cargaron en una columna de proteína A de 1 ml HiTrap™ MabSelect SuRe™ pre-equilibrada en regulador de pH de

fosfato citrato 0.2 M con pH 6,0 y operado en un sistema de cromatografía ÄKTApurifier™ (ambos de GE Healthcare Europe GmbH; columna cat. No: 11-0034-93) a un caudal de 1 ml/min. El regulador de pH de ejecución fue regulador de pH de citrato fosfato 0.2 M pH 6. La elución del heterodímero de interés se realizó con regulador de pH de citrato de sodio 20 mM con pH 4, mientras que las especies homodiméricas se eluyeron con 0.1 M glicina, pH 3.0.

La elución fue seguida por la lectura de DO a 280 nm; la fracción que contiene el heterodímero de interés se combinó y se neutralizó con 0.1 volúmenes de Tris 1M pH 8.0 (Sigma).

El sobrenadante, fluyen a través y las fracciones de elución se analizaron en condiciones no reducidas por SDS-PAGE (NuPAGE Bis-Tris al 4-12% de acrilamida, Invitrogen AG, Basilea, Suiza).

Calorimetría de Barrido Diferencial (DSC)

Las estabilidades térmicas de anticuerpos se compararon mediante medidas calorimétricas. Las mediciones calorimétricas se llevaron a cabo en un microcalorímetro diferencial de exploración VP-DSC (GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Suiza). El volumen de la célula era de 0.128 ml, la velocidad de calentamiento era de 1°C/min, y el exceso de presión se mantuvo en 441.2 kPa. Todos los fragmentos de proteína fueron utilizados en una concentración de 1-0.5 mg/ml en PBS (pH 7.4). Se estimó la capacidad calorífica molar de cada proteína en comparación con las muestras duplicadas con regulador de pH idéntico del cual se había omitido la proteína. Las capacidades caloríficas molares parciales y las curvas de fusión fueron analizadas empleando procedimientos estándar. Los termogramas fueron corregidos en la línea base y la concentración normalizada antes de ser analizados además mediante un modelo de estado no-dos en el software Origin v7.0.

Se sabe de los perfiles de fusión esperados para las subclases de IgG humana (Garber E & Demarest SJ (2007) Biochem Biophys Res Commun, 355(3): 751-7) y todos los perfiles han demostrado que contienen tres transiciones de despliegue correspondientes al despliegue independiente de los dominios CH2, CH3 y FAB. De las cuatro subclases de IgG humana, IGHG1 tiene el dominio más estable CH3 (~85°C); mientras que otros dominios CH3 de subclases son menos estables, aunque ninguno de ellos se sabe que funda por debajo de 70°C. Del mismo modo, todas las subclases se sabe que tienen una temperatura de fusión de ~70°C para el dominio CH2.

Evaluación de la pureza por electroforesis en gel capilar

Preparación de la muestra no reducida

40 µg de muestra de proteína desalada se regularon en regulador de pH de muestra SDS (Beckman Coulter Internacional S.A., Nyon, Suiza; Kit d epureza IgG, Cat. No: A10663) que

contiene yodoacetamida 5 mM (Sigma). Se añadió un patrón interno de 10-kDa a las muestras. Las mezclas de muestra se calentaron a 70°C durante 10 minutos.

Electroforesis en gel capilar

Después de la preparación de la muestra, las muestras se realizaron en un ProteomeLab PA 800 (Beckman Coulter Internacional S.A., Nyon, Suiza) equipado con un detector de arreglo de fotodiodos (DAD), fijado en 220 nm. Los capilares de sílice fusionados sin cubierta de 50 micras ID × 30.2 cm (20.2 cm de longitud efectiva para el detector) se utilizaron como medio de separación. La inyección de la muestra y la separación se realizaron en voltajes constantes de 5 y 15 kV, respectivamente, con polaridad inversa en regulador de pH de gel de peso molecular-SDS. Los datos se registraron en una proporción de 2 Hz y la corriente se mantuvo estable durante la separación. La capilaridad y las muestras fueron termo-establecidas a 25°C.

Mediciones de afinidad por SPR

El análisis SPR fue utilizado para medir las constantes de velocidad de asociación y disociación para la cinética de unión de los diferentes anticuerpos (anticuerpos humanizados y murino). La cinética de unión de los anticuerpos se midieron en un instrumento BIAcore 2000 (BIAcore-GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Suiza) a temperatura ambiente y se analizaron con el software BIAevaluation (versión 4.1, BIAcore-GE Healthcare Europe GmbH).

Las mediciones se realizaron en chips sensores CM5 (GE Healthcare Europe GmbH, Cat. No: BR-1000-14) acoplado individualmente con el ligando de interés usando un kit de acoplamiento de amina comercial (GE Healthcare Europe GmbH, Cat. No: BR-1000-50). El ligando d eproteína G es de Pierce (Thermo Fisher Scientific-Perbio Science S.A., Lausanne, Suiza, Cat. No: 21193).

Los datos (sensograma: fc2-fc1) se ajustaron con un modelo 1:1 de Langmuir con o sin transferencia de masa, como se indica. En los experimentos de captura, para considerar las variaciones experimentales al comienzo de cada medición, el valor Rmáx se establece para ser local en todos los ajustes. Los tiempos de disociación fueron de al menos 350 segundos. Las mediciones se realizaron por triplicado e incluyeron muestras de concentración cero para hacer referencia. Los valores Chi2 y residuales se utilizaron para evaluar la calidad de un ajuste entre los datos experimentales y modelos individuales de unión.

Mediciones de afinidad en células HPB-ALL por FACS

Células HPB-ALL (DSMZ, Braunschweig, Alemania, Cat. No: ACC483) se utiliza como línea de células CD3 positivas para la tinción de FACS. HPB-ALL se mantuvieron en RPMI 1640

suplementado con 10% de FCS y 100 U/ml de penicilina y 100 ug/ml de estreptomicina. 100 µl de serie de dilución del anticuerpo OKT3 quimérico y variantes humanizadas se incubaron con $4x10^5$ células HPB-ALL en PBS suplementado con 1% de BSA y 0.1% de azida de sodio (referida como regulador de pH FACS) durante 45 min en hielo. Una IgG1 humana irrelevante se utilizó como control de isotipo y el anticuerpo OKT3 quimérico como control positivo. Después del lavado, las células se incubaron con una dilución 1/200 de Fc-PE anti-humano (eBioscience, Viena, Austria) durante 45 minutos en hielo. Después, las células se lavaron de nuevo y se resuspendieron en regulador de pH FACS 200 ul. La fluorescencia media relativa de cada muestra se midió en FACSCalibur (BD Biosciences, Allschwil, Suiza) y los resultados se resumen en la figura 9 como la tinción relativa de HBP-ALL en comparación con el anticuerpo OKT3 quimérico.

Líneas celulares para los ensayos *in vitro*

Líneas celulares positivas CD38 humanas

El antígeno CD38 que expresa células humanas se han descrito en la publicación PCT Nos: WO2005103083, WO2008047242, WO2011154453 y WO2012092612. Las líneas celulares humanas positivas CD38 como se usan en el presente documento son las siguientes:

células estables recombinantes CHO[CD38]

Un gen que codifica CD38 humano se ordenó en Sources Biosciences (Berlín, Alemania, Cat.-No.: IRAU37D11, 4309086). CD38 humano se amplificó usando los cebadores añadiendo una secuencia Kozak, un codón de inicio, seguido de un péptido señal (líder V murino) al extremo 5' y un sitio de restricción NheI al extremo 3'. El amplicón se cortó utilizando NheI y HindIII y se clonó en el cartucho de expresión de pT1, un pcADN3.1 (Invitrogen AG) vector derivado de desarrollo propio. El cartucho de expresión de pT1 une la expresión del gen de interés con la expresión de GFP y PAC (el gen de resistencia a la puromicina) utilizando dos IRES (sitios de entrada de ribosoma interno) en un ARNm policistrónico. Una preparación midi del plásmido se preparó y el marco de lectura abierto CD38 clonado se confirmó por secuenciación de ADN. La suspensión de células CHO-S (Invitrogen AG) fueron transfectadas utilizando polietilenimina (JetPEI®, Polyplus transfection, Illkirch, Francia) en formato de biorreactor de 50 ml (TubeSpin 50 bioreactors, TPP, Trasadingen, Suiza). Para este propósito, las células de crecimiento exponencial se sembraron en medio OptiMEM (Invitrogen AG, Cat. No.: 31985-047). Un complejo JetPEI®:ADN se añadió a las células. Después de 5 horas de incubación de las células con el complejo JetPEI®:ADN a 37°C con agitación (200 RPM) para la endocitosis, un volumen de medio de cultivo PowerCHO2 (Lonza, distribuidor RUWAG Lifescience, Bettlach, Suiza, Cat. No: BE12-771Q) suplementado con Gln 4 mM se añadió a la suspensión celular. Las células se incubaron entonces en una plataforma con agitación

a 37°C, CO2 5% y humedad 80%. Un día después de la transfección se sembraron las células en placas de 96 pozos a diferentes concentraciones en medio selectivo que contenía puromicina (Sigma, Cat. No: P8833-25 mg). Después de aproximadamente 14 días de selección en condiciones estáticas, conjuntos celulares que expresan GFP superior 46 se expandieron como cultivos en suspensión usando 50 biorreactores TubeSpin. Una vez adaptadas con éxito a la suspensión, las células se analizaron para CD38 por FACS. Se seleccionaron clones estables CHO[CD38] con un perfil de tinción CD38 homogéneo y se usan en el presente documento.

Otras líneas de células CD38 positivas incluyen:

NCI-H929 (estándares ATCC-LGL; Cat. No: CRL-9068).

Namalwa (estándares ATCC-LGL; Cat. No: CRL-1432)

U266 (estándares ATCC-LGL; Cat. No: TIB-196)

RPMI 8226 (estándares ATCC-LGL; Cat. No: CCL-155)

Condiciones de cultivo: medio RPMI 1640 suplementado con FBS inactivado por calor 10%, penicilina-estreptomicina 1% (Invitrogen AG) y 1% GlutaMAX-1 (Invitrogen AG)

Raji (estándares ATCC-LGL; Cat. No: CCL-86)

Daudi (estándares ATCC-LGL; Cat. No: CCL-213)

Antígenos objetivo recombinantes

Proteína de fusión CD3 humana gamma-épsilon-Fc

Un ADNc que codifica la región extracelular CD3 gamma humana (UniProt No de acceso: P09693, residuos 23 a 103 (SEQ ID NO: 184); UniProt Consortium (2013) Nucleic Acids Res, 41 (edición de base de datos): D43-7; http://www.uniprot.org/) fusionado a la región extracelular CD3 épsilon humana (UniProt No acceso: P07766, residuos 22 a 118 (SEQ ID NO: 185)) por un enlazador de péptido residuo-26 (secuencia: GSADDAKKDAAKKDDAKKDDAKKDGS; SEQ ID NO: 169) fue sintetizado por primera vez por GENEART AG (Regensburg, Alemania). Este gen sintético se fusiona a una porción Fc IgG1 humana usando técnicas de PCR de traslape estándar y una plantilla de ADNc de Fc IgG1 humana también se obtiene de Geneart AG. El ADNc resultante se clonó en el plásmido pcADN3.1 modificado mencionado anteriormente.

Para la expresión transitoria de la proteína CD3 gamma-épsilon-Fc (SEQ ID NO: 170), el vector recombinante se transfectó en células HEK-EBNA de suspensión adaptada (ATCC-CRL-10852) usando polietilenimina (PEI) como se describe anteriormente. A continuación, el constructo de CD3 gamma-épsilon-Fc se purificó a partir del sobrenadante libre de células usando medio de Streamline rProteína A recombinante (GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Suiza) y se utilizó para posterior análisis.

Proteínas de fusión 1-26 Fc épsilon humana y de mono cynomolgus CD3

Un ADNc que codifica el péptido CD3 épsilon humano 1-26 (UniProt No acceso: P07766, aminoácidos 23-48, SEQ ID NO: 171) y un ADNc que codifica el péptido 1-26 épsilon CD3 cynomolgus (UniProt No acceso: Q95LI5, aminoácidos 22-47, SEQ ID NO: 172) se amplificó por PCR a partir de ADNc sintético obtenido a partir de GENEART A.G. para las regiones extracelulares épsilon de humano y mono cynomolgus CD3, respectivamente. Los productos amplificados se fusionaron posteriormente a una porción Fc IgG1 humana usando técnicas de PCR de traslape estándar. La plantilla de ADNc de IgG1 Fc humano se obtuvo de Geneart AG. Los ADNc resultantes fueron clonados en el plásmido pcADN3.1 modificado mencionado anteriormente.

Para la expresión transitoria de constructos épsilon CD3 humanos y cynomolgus (SEQ ID NO: 173 y 174, respectivamente), los vectores recombinantes se transfectaron en células HEK-EBNA de suspensión adaptada (ATCC-CRL-10852) usando polietilenimina (PEI) como se describe anteriormente. Los constructos de fusión CD3 épsilon fueron entonces purificados a partir del sobrenadante libre de células usando medio Streamline rProteína A recombinante (GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Suiza) y se utilizaron para el análisis adicional. Estas dos proteínas de fusión se denominan en el presente documento como proteínas de fusión épsilon 1-26_Fc CD3 de humano y mono cynomolgus.

Regiones extracelulares CD38 de humano y mono cynomolgus

Un ADNc de CD38 humano se obtuvo de Source Biosciences (Erwin-Negelein-Haus, Alemania, Cat. No.: IRAU37D11, 4309086), su región extracelular (UniProt No acceso: P28907 residuos 43-300) se amplificó por PCR y se clonó en un vector de expresión doméstico derivado de pcADN3.1 (Invitrogen AG). Este vector de expresión abarca una secuencia Kozak y un codón de inicio, seguido del péptido líder VJ2C murino al extremo 5' y un 6-His-tag al extremo 3' de su sitio de clonación múltiple. La región extracelular soluble de CD38 humano fusionado a 6-His-tag (SEQ ID NO: 175) se expresó y se purificó como sigue: un volumen de medio RPMI 1640 (PAA Laboratories, Cat. No: E15-039) que contiene células HEK, ácido plurónico 0.1% (Invitrogen AG), vector de expresión y polietilenimina (JetPEI®, Polyplus-transfection, Illkirch, Francia) se incubó en un matraz agitador a 37°C, CO2 5% y 80% de humedad. Se añadió un volumen de medio ExCell293 suplementado con glutamina 6 mM a la mezcla después de 4 horas y la incubación continuó adicionalmente durante un total de 5 días. Post producción, sobrenadante libre de células se preparó mediante centrifugación y se filtró utilizando filtros de 0.2 micras, se ajustó el pH a 7.4 (4°C), utilizando Tris 1 M pH 8.7. Las perlas de Ni-Sepharose Excell (GE Healthcare, Cat. No: 17-3712-03) se añadieron a la solución y se incubaron durante la noche a 4°C bajo agitación. La solución se cargó en una columna Econo (Bio-Rad Laboratories AG, Reinach, Suiza, Cat. No: 737-4252) para la

purificación de flujo por gravedad. Las perlas se lavaron en PBS (2x), imidazol 20 mM y la proteína se eluyó en PBS, imidazol 500 mM. Las fracciones eluidas se reunieron y se intercambió el regulador de pH por PBS con dos pasos de diálisis a 4°C. La región extracelular CD38 humana purificada se filtró usando filtros de jeringa de 0.22 micras.

Usando los métodos tal como se describe antes la región extracelular soluble del antígeno CD38 de mono cynomolgus fusionado a 6-His-tag (SEQ ID NO: 176) fue clonado, expresado y purificado.

Ensayo de eliminación de redirección de células T *in vitro*

Preparación de células mononucleares de sangre periférica

Para producir las células mononucleares de sangre periférica (PBMC), se recogieron los filtros de sangre que contienen leucocitos humanos del Centro de Recolección de Sangre en La Chaux-de-Fonds, Suiza (Centre de Transfusion Sanguine et Laboratoire de Sérologie, rue Sophie-Mairet 29, CH-2300). Las células se retiraron de los filtros por retro-purgado con 60 ml de PBS que contenía 10 U/ml de liquemin (Drossapharm AG, Suiza). Las PBMC fueron entonces purificadas con tubos de 50 ml de sangre-Sep-filtro (Brunschwig, Basilea, Suiza) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los tubos se centrifugaron durante 20 min a 800 g a temperatura ambiente (sin freno) y se recogieron las células de la interfaz. Las células se lavaron 3 veces con Roswell Park Memorial Institute (RPMI, PAA Laboratories, Pasching, Austria) medio sin FBS o solución salina amortiguada con fosfato (PBS). Las PBMC se resuspendieron en 10e6 células/ml en medio RDL (RPMI suplementado con suero fetal bovino inactivado por calor (FBS) y penicilina/estreptomicina) y se cultivaron durante la noche a 37°C en una incubadora de CO_2 al 5% antes del ensayo.

Preparaciones de células T

La purificación de células T se realizaron directamente después del aislamiento de PBMC utilizando el kit II de aislamiento de células T-bandeja (Myltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Alemania, Cat. No: 130-091-156) siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de la purificación, las células T se resuspendieron en 10e6 células/ml en medio de RDL y se cultivaron durante la noche a 37°C en una incubadora de CO_2 al 5% antes del ensayo.

Lecturas de ensayo

Dos lecturas diferentes que dieron resultados muy comparables se utilizaron para cuantificar la eliminación redirigida.

Un método de citometría de flujo, denominado en el presente documento como método de RDL-FACS, basado en fluorescencia-citometría como se describe en Schlereth B *et al.*

((2005) Cancer Res, 65: 2882-2889), Moore PA *et al.* ((2011) Blood, 117(17): 4542-51) y Friedrich M *et al.* ((2012) Mol Cancer Ther, 11: 2664-2673). Se recogieron las células objetivo, se contaron, se lavaron una vez y se re-suspendieron en 5x10e6 células/ml en PBS+1 μM éster de succinimidilo carboxifluoresceína (CFSE, Sigma). Las células se incubaron 15 min a 37°C con agitación suave cada 5 min. Las células cargadas con CFSE se lavaron 3 veces con medio RDL y se resuspendieron en 2x10e5 células/ml en medio RDL. Se recogieron las PBMC, se contaron y se resuspendieron en 2x10e6 células/ml en medio RDL. Las diluciones en serie de anticuerpos (soluciones 3x) se prepararon en medio RDL. Las células objetivo (50 μl/pozo), células T (50 μl/pozo) y las soluciones de anticuerpo 3X (50 μl/pozo) se distribuyeron en una placa de 96 pozos de fondo plano (TPP, Trasadingen, Suiza). La relación de efector:objetivo fue de 10:1. Las placas se incubaron durante 48 horas en una incubadora de CO_2 al 5% a 37°C. Después de la incubación las placas se centrifugaron durante 3 min a 300 g, los sobrenadantes se desecharon al mover rápido las placas. Las placas se lavaron una vez con 200 μl de PBS, se centrifugaron de nuevo y el PBS se descartó. Se añadió una solución pre-calentada de accutasa (Invitrogen AG) y las placas se incubaron 10 min a 37°C. Las células adherentes desprendidas se re-suspendieron pipeteando hacia arriba y hacia abajo después de la adición de 100 μl de medio RDL. La solución se transfirió a una placa de 96 pozos de fondo en U (TPP). Las placas de fondo en U se centrifugaron durante 3 min a 300 g, los sobrenadantes se desecharon y las células se resuspendieron en 200 μl de regulador de pH FACS frío (PBS + 2% de FBS + 10% Versene) suplementado con 7-AAD (Becton Dickinson AG, Allschwil, Suiza) a una dilución 1/40. Las placas se adquirieron inmediatamente en un citómetro de flujo Guava easyCyte™ (Millipore AG, Zug, Suiza). Para cada pozo, se determinó el número absoluto de células objetivo que viven activando la población negativa 7ADD positiva CFSE utilizando el software Flowjo® (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Alemania). El porcentaje de citotoxicidad específica para cada muestra se determinó usando la condición en donde sólo células objetivo se incubaron como línea de base. Los valores de EC_{50} se determinaron utilizando el método de regresión no lineal con pendiente variable con el software Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA, E.U.A.). El porcentaje de lisis específica re-dirigida (RDL) se calculó restando el porcentaje de citotoxicidad específica de la condición sin anticuerpo a las condiciones en donde se añadió un anticuerpo de prueba.

Un método de viabilidad celular, denominado en el presente documento como método RDL-MTS basado en un método colorimétrico para evaluar la viabilidad celular como se describe en en Bühler P *et al.* ((2008) Cancer Immunol Immunother, 57: 43–52, Labrijn AF *et al.* ((2013) Proc Natl Acad Sci USA, 110(13): 5145-50) y publicación PCT No: WO2012143524. Se recogieron las células objetivo, se contaron, se lavaron una vez y se re-suspendieron en 2x10e5 células/ml en medio RDL. Se recogieron las PBMC, se contaron y se resuspendieron en 2x10e6 células/ml en medio RDL. Las diluciones en serie de anticuerpos (soluciones 3x) se prepararon en

medio RDL. Las células objetivo (50 µl/pozo), células T (50 µl/pozo) y las soluciones de anticuerpo 3x (50 µl/pozo) se distribuyeron en una placa de 96 pozos de fondo plano (TPP). La relación de efector:objetivo fue de 10:1. Las placas se incubaron durante 48 horas en una incubadora de CO_2 al 5% a 37°C. Después de la incubación los sobrenadantes se desecharon y las placas se lavaron 3 veces con 200 µl de PBS para eliminar las PBMC y luego se añadió a cada pozo 100 µl de medio RDL. La lectura se realizó utilizando el kit CellTiter 96® (Promega AG, Dübendorf, Suiza) según las instrucciones del fabricante. Brevemente, se añadieron 10 a 20 µl de reactivo MTS a cada pozo y las placas se incubaron de 2-6 horas en una incubadora de CO_2 al 5% a 37°C. A continuación, la absorbancia de 490 nm se leyó en un lector de placas de sinergia BioTek (BioTek AG, Luzern, Suiza). El porcentaje de eliminación específica se calculó utilizando esta fórmula: eliminación específica = 100 x [(SD-Sp)/(SD-MD)]. SD es la absorbancia medida en condiciones de muerte espontánea, donde se incubaron solo las células objetivo. Sp es la absorbancia medida en cada condición de prueba (células objetivo + PBMC + anticuerpo). MD es la absorbancia medida en la condición máxima de muerte en donde se lisaron las células objetivo mediante 3 ciclos de congelación y descongelación. El porcentaje de lisis específica re-dirigida (RDL) se calculó restando el porcentaje de citotoxicidad específica de la condición sin anticuerpo a las condiciones en donde se añadió un anticuerpo de prueba. Los valores de EC_{50} se determinaron utilizando el método de regresión no lineal con pendiente variable con el software Prism (software GraphPad).

EJEMPLO 2

Los sitios de unión al antígeno que dirigen el antígeno CD3 humano, y el antígeno CD38

2.1 Sitios de unión a antígenos contra el antígeno CD3 humano

La subunidad CD3 épsilon humana fue seleccionado para impulsar la eliminación redirigida de células T a través del acoplamiento biespecífico.

2.1A Variantes humanizadas del anticuerpo OKT3 de ratón

El sitio de unión al antígeno CD3 épsilon anti-humano usado aquí se deriva del anticuerpo OKT3 de ratón (Muromonab-CD3, nombre comercial Orthoclone OKT3, comercializado por Janssen-Cilag y posteriormente descontinuado; dominios de cadena pesada y cadena ligera variable murino con SEQ ID NO: 38 y 41, respectivamente). Los dominios variables murino OKT3 fueron humanizados y formateados como fragmentos scFv y FAB.

La humanización siguió el método descrito por Jung S & Plückthun A (1997, Protein Eng, 10 (8): 959-66) para producir una variante humanizada altamente estable que sería adecuada para el formateo de FAB y scFv. El método hace uso del par altamente estable de los dominios

VH/VL encontrados en el anticuerpo Herceptin® (rhuMAbHER2, huMAb4D5-8, trastuzumab o nombre comercial Herceptin®; publicación de patente EUA No. 5,821,337; dominios de cadena pesada y cadena ligera variable con SEQ ID NO: 20 y 21, respectivamente) y sigue el flujo de trabajo de un procedimiento de humanización sobre marcos fijos (Almagro JC & Fransson J (2008), Front Biosci, 13: 1619-33). Puesto que el anticuerpo Herceptin® se deriva originalmente de las familias humanas altamente estables de marco de línea germinal VH3 y VK1, los marcos de línea germinal de estas dos familias pueden ser utilizados igualmente como una fuente de marcos fijos. Alternativamente, la familia del marco de cadena ligera de línea germinal VK3 humana puede ser utilizada en lugar de VK1 ya que también tiene buenas propiedades de estabilidad (Ewert S *et al.*, (2003) J Mol Biol, 325: 531-553). Además de los anticuerpos de ratón, los anticuerpos humanos pueden ser diseñados usando este método de marco fijo para mejorar la estabilidad. Se prefiere el uso del marco de línea germinal humana IGHV3-23*04, IGKV1-39*01 y IGKV3-20*01 que tiene la SEQ ID NO: 37, 39 y 40, respectivamente (referenciada según IMGT® (el sistema de información internacional ImMunoGeneTics (Lefranc MP *et al.* (1999) Nucleic Acids Res, 27(1): 209-12; Ruiz M *et al.* (2000) Nucleic Acids Res, 28(1): 219-21; Lefranc MP (2001) Nucleic Acids Res, 29(1): 207-9; Lefranc MP (2003) Nucleic Acids Res, 31(1): 307-10; Lefranc MP *et al.*, (2005) Dev Comp Immunol, 29(3): 185-203; Kaas Q *et al.*, (2007) Briefings in Functional Genomics & Proteomics, 6(4): 253-64; http://www.imgt.org).

Para este fin un primer anticuerpo humanizado se construyó en donde las CDR en los dominios variables del anticuerpo Herceptin® se sustituyeron, respectivamente, con las CDR del anticuerpo OKT3 de ratón y se compararon con una quimera del anticuerpo OKT3 de ratón (cadena pesada variable y cadena ligera variable con SEQ ID NO: 130 y 131, y se hace referencia en el presente documento como el anticuerpo OKT3 quimérico).

El anticuerpo prototipo (cadena pesada variable y cadena ligera variable con la SEQ ID NO: 79 y 96, y abreviada VH/VL) ha aumentado los niveles de producción en los ensayos de expresión transitoria y una mayor estabilidad de FAB, medido por calorimetría diferencial de barrido, pero no sin unión a células HPB-ALL (evaluada por la intensidad de fluorescencia media en experimentos FACS, véase la sección de Materiales y Métodos), una línea de tumor de células T positivas CD3 épsilon humana (figura 1A).

Basado en un modelo 3D del primer par de prototipo de dominios variables, un subconjunto de retro-mutaciones (del prototipo Herceptin® injertado con CDR a la secuencia OKT3 de ratón) fueron seleccionadas y probadas: I34M, V48I, A49G, R58N, R58Y, I69L, A71T y T73K en el dominio variable de cadena pesada y M4L, V33M, A34N, L46R, L47W, R66G, F71Y y P96F en la cadena ligera variable (numeración de Kabat). Observar que la sustitución de R58N corresponde a una mutación OKT3 prototipo a ratón Herceptin® injertado con CDR mientras que la sustitución R58Y

corresponde a una sustitución de línea germinal IGHV3-23*04 prototipo a humano Herceptin® injertada con CDR. La estrategia de ingeniería con respecto a la combinación de sustituciones se basa en la complementariedad de las diferentes sustituciones en términos de su influencia putativa en regiones CDR y/o empacado de dominio variable y/o inmunogenicidad.

En una primera aproximación, todos los candidatos fueron formateados como anticuerpos IgG1 humanos. Las mejores variantes fueron seleccionados de acuerdo a los niveles de expresión, la termo-estabilidad del fragmento FAB y capacidad de unirse a células HPB-ALL por FACS. Las mejores variantes humanizadas tenían el sitio de unión de la proteína A presente en su dominio VH anulado mediante la sustitución G65S o N82aS. Este paso de ingeniería era necesario para producir más anticuerpos BEAT de re-direccionamiento de células T seguras y libres de homodímeros anti-CD3.

Las retro-mutaciones en la VH de: I34M, A49G y A71T junto con las retro-mutaciones en la VL de: afinidad restaurada con M4L, L46R, L47W y F71Y. Las mejores combinaciones de dominios variables fueron VH8/VL4, VH8/VL8, VH11/VL4 y VH11/VL8 ya que estas conservan la mayor parte de la unión celular de parental (figura 1A-C). Además, las combinaciones VH8/VL8 (dominios variables con SEQ ID NO: 131 y 132, respectivamente) y VH11/VL8 (dominios variables con SEQ ID NO: 133 y 132, respectivamente) tenían una estabilidad mejorada de FAB y (+2.8°C y +1.6°C, respectivamente, la figura 1D).

Por último, las variantes mejor humanizadas también se formatearon como fusiones scFv-Fc y se expresaron de forma transitoria. Las variantes fueron clasificadas en términos de su afinidad relativa, estabilidad, niveles de expresión en la transfección transitoria en este formato (figura 1E). Las mejores combinaciones de dominios variables en un formato de fusión scFv-Fc eran similares a las combinaciones identificadas en un formato de anticuerpo: VH8-VL4 (fragmento scFv con SEQ ID NO: 135) y VH8-VL8 (fragmento scFv con SEQ ID NO: 136). Ambos fragmentos scFv tenían buena estabilidad térmica con el formato de fusión scFv-Fc (figura 1F).

2.1B Variantes humanizadas del anticuerpo SP34 de ratón

El anticuerpo de ratón SP34 fue descrito por primera vez en 1985 (Pessano S *et al.*, (1985) EMBO J, 4(2):337-44). Fue producido por un hibridoma obtenido de ratones inmunizados con extractos de proteínas desnaturalizadas de células HPB-ALL, el anticuerpo tenía especificidad humana y reactividad cruzada para el mono cynomolgus.

Siguiendo los métodos y el flujo de trabajo descrito en este ejemplo *supra*, los dominios humanizados VH y VL del anticuerpo murino SP34 que tienen un dominio VH con SEQ ID NO: 1 y un dominio VL con SEQ ID NO: 2 fueron diseñados mediante injerto de CDR en los marcos de línea germinal VH3-23 y VK3, respectivamente. Los dominios variables basados en VH3

resultantes pueden ser anulados además para la unión de la proteína A utilizando las sustituciones G65S o N82aS (numeración de Kabat) en función de su uso en un formato de anticuerpo BEAT.

Con este fin, un primer anticuerpo humanizado se construyó en donde las CDR en los dominios variables de un anticuerpo humano que tiene un dominio de cadena pesada de VH3 línea germinal y un dominio de cadena ligera VK3 de línea germinal se sustituyeron respectivamente con las CDR de anticuerpo de ratón SP34. El anticuerpo humanizado resultante sutilizó un punto de partida para una mejora adicional de afinidad y compararse contra una quimera del anticuerpo SP34 (cadena pesada y cadena ligera con SEQ ID NO: 137 y 138, respectivamente, y referido en el presente documento como el anticuerpo quimérico SP34).

El anticuerpo prototipo (cadena pesada variable y cadena ligera variable con la SEQ ID NO: 91 y 105, y abreviado VH1/VL1) tenía una unión baja a la proteína de fusión 1-26_Fc CD3 épsilon humana (evaluada por SPR, véase la sección de Materiales y Métodos y la figura 2A).

Basado en un modelo 3D del primer par prototipo de dominios variables, un subconjunto de sustituciones que corresponden a cualquiera de las retro-mutaciones entre el prototipo VH3/VK3 de línea germinal humana injertado con CDR y la secuencia SP34 de ratón (sustituciones humano-a-ratón o ratón-a-humano) o cambios de aminoácidos racionalmente diseñados, se seleccionó. Los siguientes cambios se hicieron y probaron en varias combinaciones: W100eF, y W100eY en el dominio de cadena pesada variable y A2I, S25A, T27A, G27aA, V27cA, T28A, T29A, S30A, N31A, Y32A, E38Q, F44P, G46L, T51A, N52A, K53A, R54A, P56A, L66G, D69T, F87Y, Q89A, W91F, Y92A, S93A, N94A, y Q100G en la cadena ligera variable (numeración Kabat; véase la figura 2A). La estrategia de ingeniería con respecto a la combinación de sustituciones se basa en la complementariedad de las diferentes sustituciones en términos de su influencia putativa en regiones CDR y/o empacado de dominio variable y/o inmunogenicidad y/o impacto en la expresión transitoria en células de mamífero.

En una primera aproximación, todos los candidatos fueron formateados como anticuerpos IgG1 humanos y más tarde ensayados adicionalmente en un formato de proteína de fusión scFv-Fc (figura 2B) con algunas variantes que tienen el sitio de unión de la proteína A presente en su dominio VH anulado usando el G65S. Los mejores candidatos humanizados fueron seleccionados de acuerdo a los niveles de expresión y capacidad de unirse a las proteínas de fusión 1-26_Fc de humano y mono cynomolgus CD3 épsilon por medio de SPR.

Sorprendentemente, cuando se reformatea como scFv, quimera SP34 y H1L21 conduce a una dramática pérdida de expresión en comparación con el formato IgG1, (figura 3). Sin embargo, la expresión de scFv-Fc se potenció mediante la combinación de sustituciones W100eY en VH y W91F en VL (figura 2B).

Para mejorar aún más la capacidad de fabricación de los productos biespecíficos

basados en CD3, por lo tanto, el scFv SP34 humanizado fue diseñado posteriormente. Para identificar las posiciones clave que afectan la expresión de SP34 scFv-Fc, una exploración de alanina se realizó en CDR VL21. Se realizaron los siguientes cambios: T27A, G27aA, V27cA, T28A, T29A, S30A, N31A, Y32A, N52A, K53A, R54A, P56A, L90A, Y92A, S93A, N94A, y L95A. Curiosamente, sólo las sustituciones en la posición 29, 30 (VH1/VL26 SEQ NO: 139) y 95 (VH1/VL34 SEQ NO: 140) conducen a un aumento significativo en la expresión de scFv-Fc (figura 4), además estos mutantes son los únicos que retienen la unión completa a humanos y épsilon mono Cynomologus CD3.

Basándose en estos resultados, se probaron más sustituciones en las posiciones 29, 30 y 95 en la cadena ligera.

Como las posiciones 29 y 30 muestran hiper variabilidad en todas las diferentes familias de cadena ligera variable, estas dos posiciones fueron mutadas al azar por PCR dirigida al sitio. De todos los mutantes producidos, solo las sustituciones T29A, T29E, T29S, S30A y S30D mejoraron significativamente el nivel de expresión transitorio de las figuras 5a y 5b manteniendo al mismo tiempo la unión a épsilon humano CD3.

En un enfoque diferente, L95, que se conoce en la técnica como un residuo de estructura canónica, se sustituyó con restos más frecuentemente encontrados en esta misma posición en las familias variables lambda. Los siguientes cambios se hicieron L95A, L95G, L95T, L95S, L95D y L95N. Inesperadamente, sólo L95G y L95T significativamente mejoraron la expresión, manteniendo la unión al objetivo (figura 5c).

A partir de este trabajo, se diseñaron varios BEAT humanizados basados en SP34 y se ensayaron para su expresión y unión a épsilon CD3. Entre todos estos constructos, se incluyen H5L65 (SEQ ID NO: 69) y H5L67 (SEQ ID NO: 70) scFv, mostró un aumento de 2 veces en la expresión sobre el control BEAT basado en scFv de H5L32, figura 6.

H5L65 y H5L67 se caracterizaron además por DSC como IgG1 o scFv-Fc y se compararon con la quimera H5L32, H1L21 y SP34. H5L65 mostró una termoestabilidad superior como IgG1 pero más interesantemente un aumento de 5 a 2ºC en comparación con otras variantes humanizadas en un formato scFv-Fc. (Cuadro 1) La estabilidad *in vivo* de los anticuerpos mejorados se incrementa por lo tanto, ya que también es *in vitro*.

CUADRO 1

Versiones SP34	Fab Tm (°C)	IgG (Fab) Tm (°C)	scFvFc Tm (°C)
SP34 quimérico	66.9	66.7	N/A
hSP34 H1/L21	75.1	73.1	56.7
hSP34 H5/L32	77.5	75.9	59.7
hSP34 H5/L65	**78.1**	**77.3**	**61.6**
hSP34 H5/L67	77.4	76.5	59.9

Las combinaciones preferidas de los dominios variables de cadena pesada y de cadena ligera con respecto a la expresión de unión al antígeno y recombinante fueron como sigue: VH1 (SEQ ID NO: 42) o VH2 (SEQ ID NO: 43) o VH3 (SEQ ID NO: 44) o VH5 (SEQ ID NO: 45) formando un par con los dominios de cadenas ligeras VL21 (SEQ ID NO: 46), VL32 (SEQ ID NO: 47), VL65 (SEQ ID NO: 48) y VL67 (SEQ ID NO: 49).

2.2 Sitios de unión a antígenos contra el antígeno CD38 humano

CD38 es una glicoproteína transmembrana de tipo II que normalmente se encuentra en las células hematopoyéticas y en tejidos sólidos. CD38 también se expresa en una variedad de enfermedades hematológicas malignas. Los anticuerpos biespecíficos que redirigen las células T para matar las células cancerosas positivas CD38 serán útiles para tratar una variedad de enfermedades hematológicas malignas, incluyendo el mieloma múltiple, leucemia linfocítica crónica de células B, leucemia linfocítica aguda de células B, macroglobulinemia de Waldenström, amiloidosis sistémica primaria, linfoma de células del manto, leucemia pro-linfocítica/mielocítica, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, linfoma folicular, leucemia de células NK y leucemia de células plasmáticas. Varios anticuerpos anti-CD38 se han descrito como reactivos de investigación o candidatos terapéuticos (Publicación PCT No: WO2006099875). Entre los mejores anticuerpos CD38 anti-humanos caracterizados son OKT-10 e hibridomas de ratón HB-7 (Hoshino S et al, (1997) J Immunol, 158 (2): 741-7).

En una primera aproximación, los sitios de unión de antígeno CD38 anti-humanos pueden ser derivados de hibridomas de ratón OKT10 (cadena pesada variable y cadena ligera variable con SEQ ID NO: 50 y 53, respectivamente) o HB-7 (cadena pesada variable y cadena ligera variable con SEQ ID NO: 51 y 54, respectivamente) y versiones humanizadas de los mismos que pueden formatearse además como un FAB o fragmentos scFv. Siguiendo los métodos y el flujo de trabajo descrito en el Ejemplo 2.1, los dominios VH y VL humanizados para el hibridoma HB-7 se pueden diseñar a través de injerto de CDR en los marcos de línea germinal VH3-23 y VK1, respectivamente.

En un segundo enfoque, siguiendo el llamado método de humanización de mejor ajuste descrito por Almagro JC & Fransson J (Front Biosci, (2008) 13: 1619-1633), los dominios VH y VL humanizados de mejor ajuste para el hibridoma HB-7 fueron diseñados mediante injerto de CDR en los marcos de línea germinal IGHV4-59*03 y IGKV1-NL1*01 humanos, respectivamente (referidos de acuerdo a IMGT® *supra*). Las variantes VH y VL humanizadas con diferente grado de retro-mutaciones se investigaron *in silico* y una selección preferida de VH y VL humanizada se expresó de forma transitoria como un formato de IgG1 humana y se refiere en este documento como VH de mejor ajuste HB-7 humanizado (SEQ ID NO: 56) y dominios VL (SEQ ID NO: 57). Se introdujeron las siguientes retro-mutaciones del ratón: (VH) S35H, I37V, I48L, V67L, V71K, T73N, F78V, Y91F y (VL): M4L, L48I, Y49S, T69K (numeración de Kabat).

El anticuerpo humanizado de mejor ajuste HB-7 (cadena pesada con SEQ ID NO: 141 y cadena ligera con SEQ ID NO: 142) células recombinantes CHO [CD38] teñidas por FACS (datos no mostrados). El anticuerpo de mejor ajuste humanizado HB-7 tenía una afinidad de unión para la región extracelular de CD38 similar a la del anticuerpo quimérico HB-7 (cadena pesada con SEQ ID NO: 143 y cadena ligera con SEQ ID NO: 144) cuando se ensaya por SPR (KD de 3.6 y 2.5 nM, respectivamente; figura 7A (quimérico) y la figura 7B (humanizado)). Sorprendentemente, el anticuerpo de mejor ajuste humanizado HB-7 muestra una mejora significativa (+14.6°C) en la estabilidad del fragmento FAB en comparación con el anticuerpo quimérico HB-7 según se juzga a partir de perfiles de calorimetría (76.4°C (quimérico) vs. 91.0°C (humanizado), figura 7F).

En un tercer enfoque, los ratones inmunizados con el dominio extracelular CD38 humano y células CD38+ humanas se utilizaron para generar nuevos candidatos de hibridoma contra CD38 humano. Los métodos para generar hibridomas son conocidos y los métodos utilizados en el presente documento fueron similares a los métodos descritos en la publicación PCT No: WO2013008171. El candidato de anticuerpo de ratón 9G7 tenía una alta afinidad para CD38 de humano y de mono cynomolgus (cadena pesada variable y cadena ligera variable con SEQ ID NO: 52 y 55, respectivamente). Este anticuerpo de ratón se humanizó primero según los métodos descritos en este ejemplo *supra*. Utilizando el método de mejor ajuste, el marco VH de línea germinal IGHV2-

5*09 y el marco VK IGKV1-33*01 (referenciado de acuerdo con IMGT® *supra*) fueron seleccionados como punto de partida para el procedimiento de humanización. El injerto posterior de CDR, el primer prototipo de anticuerpo (formateado como un isotipo IgG1 humano, cadena pesada de SEQ ID NO: 145 y cadena ligera con SEQ ID NO: 146) mostraron una fuerte unión a CD38 humano sólo tres veces menor que el anticuerpo parental del ratón como se juzga por SPR (anticuerpo 9G7 quimérico con la cadena pesada de SEQ ID NO: 147 y cadena ligera con SEQ ID NO: 148; KD de 0.3 nM y 1 nM para el anticuerpo 9G7 quimérico (datos no mostrados) y el primer prototipo humanizado (datos no mostrados), respectivamente). La afinidad mejoró dos veces después de la introducción de la retro-mutación de F36Y en la cadena ligera variable del anticuerpo (numeración de Kabat) (el anticuerpo resultante se denomina en este documento como el anticuerpo de mejor ajuste 9G7 humanizado con la cadena pesada de SEQ ID NO: 145 y cadena ligera con SEQ ID NO: 74; KD de 0.5 nM para el CD38 humano, figura 7C). El anticuerpo de mejor ajuste 9G7 humanizado también exhibió una alta afinidad para el antígeno de mono cynomolgus CD38 (KD de 3.2 nM, datos no mostrados), y una termo-estabilidad FAB mejorada (FAB Tm de los análisis de DSC) sobre el anticuerpo 9G7 quimérico (94°C vs. 82.2°C para el anticuerpo de mejor ajuste 9G7 humanizado y el anticuerpo 9G7 quimérico, respectivamente; véase la figura 7G). El anticuerpo de mejor ajuste 9G7 humanizado tiene el dominio variable de cadena pesada con SEQ ID NO: 58 y dominio variable de cadena ligera con SEQ ID NO: 59.

Además, el anticuerpo de ratón 9G7 se humanizó siguiendo el mejor enfoque de marco a través de injerto de CDR en los marcos de línea germinal VH3-23 y VK1. Las variantes VH y VL con diferente grado de mutaciones espalda se investigaron *in silico* y una selección preferida de la combinación de VH y VL humanizada se expresó de forma transitoria como un anticuerpo IgG1 humano (el anticuerpo resultante se denomina en este documento como el anticuerpo de mejor marco 9G7 humanizado con cadena pesada de SEQ ID NO: 149 y cadena ligera con SEQ ID NO: 150). Se introdujeron las siguientes retro-mutaciones del ratón: (VH) A24F, V37I, V48L, S49A, F67L, R71K, N73T, L78V, y K94R, y (VL) F36Y (numeración de Kabat). Este anticuerpo mostró una fuerte unión a CD38 humana y CD38 de mono cynomolgus con constantes de afinidad similares a la del anticuerpo de mejor ajuste 9G7 humanizado (KD de 0.4 y 1 nM para CD38 de mono cynomolgus y humano, respectivamente; la figura 7D). La termo-estabilidad de FAB (FAB Tm de los análisis de DSC) también fue muy similar a la de la variante humanizada F36Y de mejor ajuste 9G7 (89.2°C, ver la figura 7H). La figura 7J resume los diferentes anticuerpos 9G7 humanizados descritos anteriormente. El anticuerpo de mejor marco 9G7 humanizado tiene el dominio variable de cadena pesada con SEQ ID NO: 60 y dominio variable de cadena ligera con SEQ ID NO: 61.

En un cuarto enfoque, una genoteca de fagos de anticuerpos se tamizó para generar fragmentos scFv adicionales contra CD38 humano. La genoteca tenía una diversidad basada en los

genes V humanos de origen natural. Esta genoteca de presentación de fagos de anticuerpos derivados de donantes usó ADNc amplificado a partir de linfocitos de sangre procedentes de 48 donantes humanos de los cuales 70% tenía una enfermedad autoinmune (vasculitis, lupus eritematoso sistémico, espondiloartropatía, artritis reumatoide y esclerodermia). La construcción de la genoteca siguió el protocolo descrito por Schofield et al. (2007, Genome Biol., 8(11): R254) con una diversidad total de 2.53 x 10e10 clones. Los fragmentos de scFv que reconocen CD38 de humano y/o de mono cynomolgus se aislaron de esta genoteca de presentación de fagos derivados de donantes de la siguiente manera. Los fragmentos de scFv se aislaron en una serie de ciclos de selección repetidos en los antígenos CD38 de humano y/o mono cynomolgus derivados de forma recombinante (véase la sección de Materiales y Métodos). Se conocen métodos para tamizar genotecas de presentación de fagos de anticuerpos (Viti F et al, (2000) Methods Enzymol, 326.: 480-505). Brevemente, tras la incubación con la genoteca, el antígeno inmovilizado que había sido revestido previamente en un inmunotubo de plástico (durante la noche en PBS a una concentración de 20 µg/ml) o capturado en perlas de estreptavidina (cuando se utiliza una forma marcada con biotina del antígeno, el antígeno capturado a una concentración de 50 nM durante todo el procedimiento de selección), los fagos unidos se recuperaron mientras que los fagos no unidos se retiraron con lavado. Los fagos unidos fueron rescatados como se describe por Marks et al (Marks JD et al, (1991) J Mol Biol, 222 (3): 581-97) y el procedimiento de selección se repitió tres veces. Más de mil clones de la segunda y tercera ronda de adsorción se expresaron y se analizaron por ELISA contra los antígenos CD38 de humano y mono cynomolgus. Los clones positivos fueron sometidos a secuenciación de ADN y algunos de los clones únicos se analizaron adicionalmente por su capacidad de unirse a líneas celulares que expresan CD38 humano. Tras una primera ronda de selección en una versión marcada con biotina del antígeno CD38 humano inmovilizado sobre perlas de estreptavidina y una segunda ronda de selección en una versión marcada con biotina del antígeno CD38 de mono cynomolgus inmovilizado sobre perlas de estreptavidina, un fragmento preferido scFv (clon No. 767) que tiene una secuencia de cadena pesada variable con SEQ ID NO: 62 y una cadena ligera variable con SEQ ID NO: 63 fue seleccionada por su capacidad para unir CD38 de humano y de mono cynomolgus. Cuando se formatea como un anticuerpo IgG1 humano, clon 767 tenía una KD de aproximadamente 300 nM para CD38 humano (figura 7E) y aproximadamente 1.2 µM para CD38 de mono cynomolgus (datos no mostrados) (anticuerpo IgG1 del clon 767 se denomina en el presente documento como anticuerpo 767 humano con la cadena pesada SEQ ID NO: 151 y cadena ligera con SEQ ID NO: 152). La termo-estabilidad de FAB (FAB Tm de los análisis de DSC) era de 70.2°C (figura 7I). El dominio del clon 767 pertenece a la subclase del dominio VH3.

EJEMPLO 3

Anticuerpos BEAT de direccionamiento de CD38/CD3

Los brazos épsilon anti-CD38 y anti-CD3 se pueden formatear ya sea como un tipo scFv-Fc de las cadenas pesadas que consisten de un fragmento scFv fusionado a una cadena BEAT o como una cadena pesada que consiste en un fragmento FAB fusionado a una cadena BEAT similar a la de un anticuerpo de origen natural. La cadena pesada basada en FAB requiere su asociación con su cadena ligera similar para ensamblar en un sitio de unión de antígeno funcional.

Las sustituciones L234A y L235A se introdujeron en las regiones CH2 y la unión de proteína A residual se anula en el uso de sustituciones G65S o N82aS (numeración de Kabat) cuando sea apropiado. Los ejemplos de anticuerpos BEAT que dirigen el antígeno CD38 humano y épsilon CD3 humano se formatearon como sigue:

Un primer ejemplo de anticuerpos BEAT que dirigen el antígeno CD38 humano y épsilon CD3 humano usando las secuencias VH y VL de mejor ajuste HB7 humanizado se formatean como sigue:

Un anticuerpo BEAT CD38/CD3 fue diseñado usando una combinación de los sitios de unión de antígeno descritos en el ejemplo 2.1 y 2.2 para los brazos épsilon CD3 anti-humano y CD38 anti-humano, respectivamente. El brazo de CD38 anti-humano de la inmunoglobulina hetero-dimérica consta de una cadena pesada BEAT (SEQ ID NO: 153) que incluye una región de cadena pesada variable, una región CH1 γ1, una región bisagra γ1, una región CH2 γ1 con sustituciones L234A y L235A (numeración de EU), y un dominio CH3 BEAT basado en γ1 ensamblado con su cadena ligera cognado (SEQ ID NO: 72). El brazo épsilon CD3 anti-humano de la inmunoglobulina hetero-dimérica consta de una cadena pesada BEAT (SEQ ID NO: 154) que incluye un fragmento scFv, una región CH1 γ1, una región bisagra γ1, una región CH2 γ3 con sustituciones L234A y L235A (numeración de EU), y un dominio CH3 BEAT basado en γ3. Esta cadena pesada abarca parte de una región IgG3 Fc humana y por lo tanto no tiene unión a la proteína A, ya que la cadena pesada usada aquí tenía su dominio variable de cadena pesada procedente de un marco VH3, el dominio VH se mutó para incluir la sustitución de G65S eliminando de este modo cualquier sitio de unión adicional de proteína A dentro de la cadena pesada. Este anticuerpo biespecífico se denomina en este documento como anticuerpo BEAT CD38-HB7mejor ajuste/CD3 (figura 8 formato A).

El anticuerpo BEAT CD38-HB7mejor ajuste/CD3 se expresó de forma transitoria, se purificó y se ensayó *in vitro* por su afinidad hacia los antígenos épsilon CD38 y CD3, su estabilidad y su capacidad para redirigir la muerte de células T. El valor KD fue de 3.2 nM para el antígeno CD38 humano (medido por SPR; figura 9A). Los perfiles de DSC para el anticuerpo biespecífico mostraron buenos perfiles de termo-estabilidad con una Tm de aproximadamente 68°C para la porción de scFv.

La porción de FAB tenía una Tm de aproximadamente 91°C (figura 9B).

Se usaron líneas celulares que expresan CD38 (véase la sección de Materiales y Métodos) para evaluar la eliminación de células T redirigidas en ensayos. La figura 10 muestra la matanza redirigida de células T de células de mieloma RPMI 8226 usando el anticuerpo BEAT CD38-HB7mejor ajuste/CD3. Observar que el ensayo utiliza células T purificadas como células efectoras con células efectoras para dirigir la relación de células objetivo de 10 a 1. Cuando se mide con el método RDL-FACS, el anticuerpo BEAT CD38-HB7mejor ajuste/CD3 tenía una EC_{50} de 2.2 pM (media de 2 donantes, 48 horas de incubación).

Un segundo ejemplo de anticuerpos BEAT de direccionamiento del antígeno CD38 humano y épsilon CD3 humano utilizando las secuencias de VH y VL del clon humano 767 se formatea como sigue: un anticuerpo BEAT CD38/CD3 fue diseñado usando una combinación de sitios de unión a antígeno que se describe en el ejemplo 2.1 y 2.2 para los brazos épsilon CD3 anti-humano y CD38 anti-humanos, respectivamente. El brazo de CD38 anti-humano de la inmunoglobulina hetero-dimérica consta de una cadena pesada BEAT (SEQ ID NO: 65) que incluye una región de cadena pesada variable, una región CH1 γ1, una región bisagra γ1, una región CH2 γ1 con sustituciones L234A y L235A (numeración de EU), y un dominio CH3 BEAT basado en γ1 ensamblado con su cadena ligera cognado (SEQ ID NO: 138). El brazo épsilon CD3 anti-humano de la inmunoglobulina hetero-dimérica consta de una cadena pesada BEAT (SEQ ID NO: 155) que incluye un fragmento scFv, una región CH1 γ1, una región bisagra γ1, una región CH2 γ3 con sustituciones L234A y L235A (numeración de EU), y un dominio CH3 BEAT basado en γ3. Esta cadena pesada abarca parte de una región IgG3 Fc humana y por lo tanto no tiene unión a la proteína A, ya que la cadena pesada usada aquí tenía su dominio variable de cadena pesada procedente de un marco VH3, el dominio VH se mutó para incluir la sustitución de G65S eliminando de este modo cualquier sitio de unión adicional de la proteína A dentro de la cadena pesada. Este anticuerpo biespecífico se denomina en este documento como anticuerpo BEAT CD38-767/CD3 (figura 8 formato B).

El anticuerpo BEAT CD38-767/CD3 se expresó de forma transitoria, se purificó y se ensayó *in vitro* para su afinidad hacia los antígenos épsilon CD38 y CD3, su estabilidad y su capacidad para redirigir la muerte de células T. Las líneas de células que expresan CD38 (véase la sección de Materiales y Métodos) se utilizaron para evaluar la matanza redirigida de células T en ensayos similares a los descritos en el ejemplo 3.2.1. La figura 11 muestra la eliminación redirigida de células T de células Daudi usando el anticuerpo BEAT CD38-767/CD3. Observar que el ensayo utiliza PBMC humanas como células efectoras con células efectoras para dirigir la relación de células objetivo de 10:1. Cuando se mide con el método RDL-FACS, el anticuerpo BEAT CD38-767/CD3 tenía una EC_{50} de 244 pM (media de 3 donantes, 24 horas de incubación).

Otro ejemplo de anticuerpos BEAT de direccionamiento del antígeno CD38 humano y épsilon CD3 humano utilizando las secuencias de VH y VL de mejor marco 9G7 humanizado se formatea como sigue: un BEAT CD38/CD3 fue diseñado usando una combinación de sitios de unión a antígeno que se describe en el ejemplo 2.1 y 2.2 para los sitios de unión de épsilon CD3 anti-humano y de antígeno CD38 anti-humano, respectivamente.

El brazo CD38 anti-humano de la inmunoglobulina hetero-dimérica consta de una cadena pesada BEAT (SEQ ID NO: 75 o 155) que incluye una región de cadena pesada variable, una región CH1 γ1, una región bisagra γ1, una región CH2 γ3 con sustituciones L234A y L235A (numeración de EU), y un dominio CH3 BEAT basado en γ3 ensamblado con su cadena ligera cognada (SEQ ID NO: 77). Esta cadena pesada abarca parte de una región IgG3 Fc humana y por lo tanto no tiene unión a la proteína A, ya que la cadena pesada usada aquí tenía su dominio variable de cadena pesada procedente de un marco VH3, el dominio VH se mutó para incluir la sustitución de G65S eliminando de este modo cualquier sitio de unión adicional de la proteína A dentro de la cadena pesada.

El brazo épsilon CD3 anti-humano de la inmunoglobulina hetero-dimérica consta de una cadena pesada BEAT (SEQ ID NO: 68) que incluye un fragmento scFv, una región CH1 γ1, una región bisagra γ1, una región CH2 γ1 con sustituciones L234A y L235A (numeración de EU), y un dominio CH3 BEAT basado en γ1. Este anticuerpo biespecífico se denomina en este documento como anticuerpo BEAT CD38-9G7mejor marco/CD3(SP34-Kappa2).

Otro ejemplo de anticuerpos BEAT de direccionamiento del antígeno CD38 humano y épsilon CD3 humano utilizando las secuencias de VH y VL del clon 767 humano se formatea como sigue: un BEAT CD38/CD3 fue diseñado usando una combinación de sitios de unión a antígeno que se describe en el ejemplo 2.1 y 2.2 para los sitios de unión de épsilon CD3 anti-humano y de antígeno CD38 anti-humano, respectivamente.

El brazo CD38 anti-humano de la inmunoglobulina hetero-dimérica consta de una cadena pesada BEAT (SEQ ID NO: 78) que incluye una región de cadena pesada variable, una región CH1 γ1, una región bisagra γ1, una región CH2 γ3 con sustituciones L234A y L235A (numeración de EU), y un dominio CH3 BEAT basado en γ3 ensamblado con su cadena ligera cognado (SEQ ID NO: 66). Esta cadena pesada abarca parte de una región IgG3 Fc humana y por lo tanto no tiene unión a la proteína A, ya que la cadena pesada usada aquí tenía su dominio variable de cadena pesada procedente de un marco VH3, el dominio VH se mutó para incluir la sustitución de G65S eliminando de este modo cualquier sitio de unión adicional de la proteína A dentro de la cadena pesada.

El brazo épsilon CD3 anti-humano de la inmunoglobulina hetero-dimérica consta de una cadena pesada BEAT (SEQ ID NO: 68) que incluye un fragmento scFv, una región CH1 γ1, una región bisagra γ1, una región CH2 γ1 con sustituciones L234A y L235A (numeración de EU), y un

dominio CH3 BEAT basado en γ1. Este anticuerpo biespecífico se denomina en este documento como anticuerpo BEAT CD38-767/CD3(SP34-Kappa2).

En un primer conjunto de experimentos, BEAT 9G7/SP34 mostró la activación de células T cuando estaban en combinación con PBMC pero no cuando estaban aisladas.

EJEMPLO 4

Anticuerpos BEAT CD3/CD38 que abarcan sólo un dominio VH3

Un ejemplo de anticuerpos BEAT de direccionamiento del antígeno CD38 humano y épsilon CD3 humano utilizando las secuencias de VH y VL HB7/mejor ajuste humanizado se formatea como sigue: un BEAT CD38/CD3 fue diseñado usando una combinación de sitios de unión a antígeno que se describe en el ejemplo 2.1 y 2.2 para los brazos épsilon CD3 anti-humano y CD38 anti-humano, respectivamente. El brazo de CD38 anti-humano de la inmunoglobulina hetero-dimérica consta de una cadena pesada BEAT (SEQ ID NO: 71) que incluye un dominio de cadena pesada variable, una región CH1 γ1, una región bisagra γ1, una región CH2 γ3 con sustituciones L234A y L235A (numeración de EU), y un dominio CH3 BEAT basado en γ3 ensamblado con su cadena ligera cognado (SEQ ID NO: 72). Esta cadena pesada no tiene unión a la proteína A, ya que abarca parte de una región Fc IgG3 humana y tiene su dominio variable de cadena pesada procedente de una subclase de dominio no VH3. El brazo épsilon CD3 anti-humano de la inmunoglobulina hetero-dimérica consta de una cadena pesada BEAT (SEQ ID NO: 157) que incluye un fragmento scFv, una región CH1 γ1, una región bisagra γ1, una región CH2 γ1 con sustituciones L234A y L235A (numeración de EU), y un dominio CH3 BEAT basado en γ1. Este montaje de cadena pesada y ligera abarcaba una versión humanizada del anticuerpo CD3 épsilon anti-humano (SP34) como se describe en la publicación PCT No: WO2008119565. Este formato de anticuerpo BEAT se denomina en este documento como anticuerpo BEAT CD38-HB7mejor ajuste/CD3(SP34) (figura 12 formato A).

La capacidad del anticuerpo BEAT CD38-HB7mejor ajuste/CD3(SP34) para redirigir la muerte de las células T hacia las células CD38+ se investigó *in vitro*. La línea celular de linfoblastos B Daudi CD38+ se utilizó en ensayos de eliminación. La figura 13 muestra la muerte redirigida de células T de células Daudi mediante el anticuerpo BEAT CD38-HB7mejor ajuste/CD3(SP34). Los ensayos utilizan PBMC humanas como células efectoras con una relación de células efectoras a células objetivo de 10 a 1, y el método de lectura RDL-FACS después de un período de 48 horas de incubación (véase la sección de Materiales y Métodos). Los resultados muestran que el anticuerpo BEAT CD38-HB7mejor ajuste/CD3(SP34) era muy potente en el re-direccionamiento de la muerte de células T contra la línea celular Daudi CD38+ con una EC_{50} de 1.8 pM (media de 3 donantes).

Un segundo ejemplo de anticuerpos BEAT de direccionamiento del antígeno CD38 humano y épsilon CD3 humano usando las secuencias de VH y VL de mejor ajuste 9G7 humanizado (SEQ ID NO: 58 y 59, respectivamente) fue formateado como sigue: un CD38/CD3 BEAT fue diseñado usando una combinación de sitios de unión a antígeno descritos en el ejemplo 2.1 y 2.2 para los brazos épsilon CD3 anti-humano y CD38 anti-humano, respectivamente. El brazo de CD38 anti-humano de la inmunoglobulina hetero-dimérica consta de una cadena pesada BEAT (SEQ ID NO: 73) que incluye un dominio de cadena pesada variable, una región CH1 γ1, una región bisagra γ1, una región CH2 γ3 con sustituciones L234A y L235A (numeración de EU), y un dominio CH3 BEAT basado en γ3 ensamblado con su cadena ligera cognado (SEQ ID NO: 74). Esta cadena pesada no tiene unión a la proteína A, ya que abarca parte de una región Fc IgG3 humana y tiene su dominio variable de cadena pesada procedente de una subclase de dominio no VH3. El brazo épsilon CD3 anti-humano de la inmunoglobulina hetero-dimérica consta de una cadena pesada BEAT (SEQ ID NO: 158) que incluye un fragmento scFv, una región CH1 γ1, una región bisagra γ1, una región CH2 γ1 con sustituciones L234A y L235A (numeración de EU), y un dominio CH3 BEAT basado en γ1. Este brazo del anticuerpo biespecífico abarca los dominios variables del anticuerpo SP34 VH5/VL32 humanizado descrito en el ejemplo 2.1. Este formato de anticuerpo BEAT se denomina en este documento como anticuerpo BEAT CD38-9G7mejor ajuste/CD3(SP34-Kappa2) (figura 12 formato B). El anticuerpo CD38-9G7mejor ajuste/CD3(SP34-Kappa2) tenía un valor KD de 18 nM para la proteína de fusión CD3 1-26_Fc humana (figura 14).

La capacidad del anticuerpo BEAT CD38-9G7mejor ajuste/CD3(SP34-Kappa2) para redirigir la muerte de las células T hacia las células CD38+ se investigó *in vitro*. La línea celular de linfoblastos B Daudi CD38+ se utilizó en ensayos de eliminación. La figura 15 muestra la muerte redirigida de células T de células Daudi mediante el anticuerpo BEAT CD38-9G7mejor ajuste/CD3(SP34-Kappa2). Los ensayos utilizan PBMC humanas como células efectoras con una relación de células efectoras a células objetivo de 10 a 1, y el método de lectura RDL-FACS después de un período de 48 horas de incubación (véase la sección de Materiales y Métodos). Los resultados muestran que el anticuerpo BEAT CD38-9G7mejor ajuste/CD3(SP34-Kappa2) era muy potente en el re-direccionamiento de la muerte de células T contra la línea celular Daudi CD38+ con una EC_{50} de 2 pM (media de 3 donantes).

EJEMPLO 5

Equivalencia funcional del SP34 mejorado en formato scFv

Con el fin de determinar si de las modificaciones hechas a los diferentes SP34 scFv con el fin de mejorar su expresión también afectó a las propiedades funcionales, a saber, la unión de

CD3, se probaron en el contexto de un CD38xCD3 biespecífico. El brazo de unión a CD38 presente como FAB, comprende la región variable de cadena pesada codificada por SEQ ID NO: 60 y la región variable de cadena ligera codificada por SEQ ID NO: 61. El brazo de unión a CD3 comprende el SP34 de ratón original reformateado como un scFv (SEQ ID NO: 207), o scFvs SP34 humanizado modificado que comprende las combinaciones de cadenas pesada/ligera H1/L21 (SEQ ID NO: 67), H5/L32 (SEQ ID NO: 68), H5/L65 (SEQ ID NO: 69) y H5/L67 (SEQ ID NO: 70).

Cada uno de CD3/CD38 BEAT utilizando la versión diferente de SP34 se expresaron y purificaron transitoriamente. Se probaron *in vitro* para comparar su capacidad para redirigir la muerte de células T. Se usó la línea celular que expresa Raji CD38 (véase la sección de Materiales y Métodos) para evaluar la destrucción de células T redirigida. El ensayo utilizó PBMC humanas como células efectoras con una relación de células efectoras a células objetivo de 10:1.

Cuando se midió con el método RDL-FACS, todos los BEAT mostraron EC50 comparable entre 6 y 10 pM (la media de 2 donantes, incubación de 24 horas) figura 16.

EJEMPLO 6

Sustitución de D401Q suprime la unión de proteína A y G en una de las dos especies de homodímero

Para fines analíticos, se produjeron los homodímeros BTA y BTB de un anticuerpo FAB x scFv BEAT en el que el brazo FAB (homodímero BTA) no tenía unión a la proteína A puesto que abarcaba un dominio variable no VH3 y parte de una región Fc de IgG3 humana similarmente a la descrita anteriormente, y el brazo scFv (homodímero de BTB) unió la proteína A usando su dominio variable basado en VH3 y su región Fc de IgG1 humana. Tras la expresión y purificación (como se describió anteriormente), se encontró que mientras que el homodímero de BTA podía ser purificado fácilmente por la proteína G (SEQ ID NO: 156 y cadena ligera de SEQ ID NO: 74), el homodímero de BTB sólo se pudo aislar mediante la proteína A y no se unió a la proteína G, lo que sugiere, por ejemplo, un plegamiento erróneo o cambios conformacionales en el sitio de unión a la proteína G en la región Fc que lleva el dominio CH3 de BTB (SEQ ID NO: 159). Teniendo en cuenta que la proteína G se une a casi la misma parte de la región Fc que la proteína A (en la interfase CH2-CH3), es sorprendente que los homodímeros de BTB unen la proteína A pero no la proteína G. Posteriormente se planteó la hipótesis de que la proteína A de unión por el homodímero BTB estaba mediada únicamente por el sitio de unión a la proteína A localizado en el radical scFv que como se mencionó anteriormente abarcaba un dominio variable basado en VH3. Para evaluar la contribución de la unión de scFv a la proteína A, se produjo un constructo que carecía del scFv basado en VH3 y se encontró que ya no se une a la proteína A (SEQ ID NO: 160, ver la figura 17). Se concluyó que en

un homodímero de BTB, los sitios de unión de proteína A y G en la región Fc son ambos no funcionales.

Este resultado posterior sugirió que el homodímero de BTB estaba de hecho mal plegado o estructuralmente alterado en la región de unión de proteína A/G. Sin embargo, datos previos en donde se usó el dominio BTB CH3 en el contexto de una inmunoglobulina hetero-dimérica sugerida de otro modo. Para investigar adicionalmente la funcionalidad del dominio BTB CH3 en un contexto hetero-dimérico con respecto a la unión a la proteína A, se produjo un anticuerpo FAB x scFv BEAT que consistía en un brazo FAB (brazo BTA) sin unión a la proteína A ya que incluye un dominio variable no VH3, una bisagra de IgG1 humana, un dominio CH2 de IgG3 humano y un dominio CH3 de BTA diseñado que se origina a partir de un isotipo de IgG3 humano (cadena pesada de brazo FAB con SEQ ID NO: 156 y cadena ligera de SEQ ID NO: 74), y un brazo scFv (brazo BTB) que abarca un fragmento scFv basado en VH3 abrogado para la unión de proteína A, una bisagra de IgG1 humana, un dominio CH2 de IgG1 humano y un dominio CH3 de BTB diseñado que se origina a partir de un isotipo IgG1 humano (cadena pesada de brazo scFv con SEQ ID NO: 161) - por lo tanto, un heterodímero que sólo se espera que unan la proteína A en la región Fc del brazo scFv. Tras la expresión y purificación (como se ha descrito anteriormente), se encontró que efectivamente ésta molécula unía la proteína A y G (figura 18A) y no tenía ningún rastro de homodímeros BTB. Así, se concluyó que los sitios de proteína A y G están intactos en el contexto de una inmunoglobulina hetero-dimérica y que sólo cuando las cadenas de BTA y BTB están asociadas es un sitio de unión de proteína A/G funcional formado.

Para comprender las bases moleculares de la abrogación de la proteína A/G dentro del homodímero BTB, se investigaron los dominios BTB CH3 previamente diseñados procedentes de un isotipo IgG1 humano. La sustitución D401Q, numeración de EUA, una comparación entre EUA y la numeración IMGT se proporciona en http://www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu_IGHGnber.html, en el dominio BTB CH3 fue identificado a partir de estudios de modelado, y fue diseñado para abrogar un contacto electrostático putativo entre Arg411 de la primera cadena del homodímero BTB con Asp401 de la segunda cadena del homodímero BTB con la opinión de que esta interacción podría estabilizar el complejo homodimérico. Dado que esta sustitución sólo se implementó en el último paso del diseño del dominio BTB CH3, se produjo un anticuerpo BEAT de FAB x scFv como se describió anteriormente sin dicha sustitución D401Q en el dominio CH3 de BTB (brazo FAB con cadena pesada y cadena ligera que tiene SEQ ID NOs: 156 y 74, respectivamente; brazo ScFv con cadena pesada SEQ ID NO: 162). Tras la expresión y purificación (como se ha descrito anteriormente), se encontró que esta molécula unía las proteínas A y G (figura 18B) pero mostraba la presencia de homodímeros BTB, indicando así que la sustitución D401Q era responsable de la falta de unión de proteína A/G observada en los homodímeros BTB, haciendo de este modo una

contribución significativa dentro de una inmunoglobulina hetero-dimérica en la reducción de dichos contaminantes de BTB. Es importante destacar que el residuo 401 no forma parte del sitio de unión a la proteína A/G, sino que está situado opuestamente en la interfaz CH3-CH3. Por lo tanto, la abrogación de la proteína A/G no es el resultado de la interrupción directa de las interacciones entre la proteína A/G y la región Fc. Más bien se sugiere que, inesperadamente, D401Q conduce a cambios conformacionales de largo alcance en la interfaz CH2-CH3 como resultado de las pobres capacidades de apareamiento de las cadenas BTB entre sí. En el caso del heterodímero, las interfaces encajan perfectamente entre sí y, por lo tanto, una conformación apropiada en la interfaz CH2/CH3 hace funcional el sitio de unión de proteína A/G.

Este resultado sorprendente puede ser explotado para diseñar una nueva estrategia para aislar eficazmente inmunoglobulinas hetero-diméricas sin contaminantes homodímeros usando el diseño específico que sigue: la inmunoglobulina hetero-dimérica tiene una primera cadena que abarca una región Fc del isotipo IgG3 que incluirá un dominio BTA CH3 y un dominio variable no VH3 o un dominio variable basado en VH3 anulado para la unión a la proteína A (usando las sustituciones G65S o N82aS, por ejemplo) o ningún dominio variable y por lo tanto no tiene unión a la proteína A, y una segunda cadena que se une a la proteína A que abarca un dominio BTB CH3 de D401Q (procedente de un isotipo IgG1 humano por ejemplo) y un dominio variable no VH3 o un dominio variable VH3 anulado para la unión a la proteína A (usando las sustituciones G65S o N82aS, por ejemplo) o ningún dominio variable. En este contexto, ambos homodímeros no contienen sitios de unión de proteína A. El primer homodímero es un dímero de la primera cadena y no se une a la proteína A ya que no hay un sitio de unión de la proteína A mientras que el segundo homodímero es un dímero de la segunda cadena con un sitio de unión de proteína A que no es funcional. El heterodímero resultante tiene sólo un sitio de unión a la proteína A encontrado en la segunda cadena (el sitio de unión a la proteína A de la cadena BTB es funcional sólo cuando está emparejado con la cadena BTA). Por lo tanto, el heterodímero será la única especie que se une a la resina de cromatografía de proteína A mientras que los homodímeros no deseados de las cadenas BTA y BTB serán eliminados por lavado.

EJEMPLO 7

Actividad de BEAT de CD3/CD38 *in vivo* en mono cynomolgus.

Se dosificaron monos Cynomolgus (macaca fascicularis, 1 macho, 1 hembra por dosis) por inyección intravenosa en bolo de CD3/CD38 (que comprendía la combinación de cadena pesada/ligera CD3 SP34 H5/L65 formateada como scFv SEQ ID NO: 69 y la región variable de la cadena pesada CD38 codificada por SEQ ID NO: 60 y la región variable de cadena ligera codificada

por SEQ ID NO: 61 formateado como un FAB), referido en este ejemplo como CD3/CD38 BEAT.

Se realizó inmunofenotipificación en todos los animales a partir de muestras de sangre (EDTA) tomadas antes del tratamiento y en diferentes momentos tras cada administración de CD3/CD38 BEAT. La evaluación de los subgrupos de linfocitos se realizó mediante citometría de flujo utilizando los siguientes marcadores: Los linfocitos T totales (CD4 y CD8), monocitos (CD14) y CD38. Las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo FACSCanto™ II. Los datos se analizaron utilizando el software de análisis FACSDiva™ como sigue: En primer lugar, se diseñó una puerta electrónica basada en las características de dispersión frontal y lateral para seleccionar las poblaciones de linfocitos o monocitos (población de padres). Los recuentos absolutos por µl de sangre entera de la población de linfocitos T (células T CD4+ y células T CD8+) y de la población de monocitos positivos CD38 (CD14+ CD38+) se calcularon a partir de sus porcentajes relativos derivados de la puerta de la población de padres y del recuento total de la población de padres a partir de un analizador de hematología validado de acuerdo con la fórmula: Recuento absoluto de la población ($x10^3$/µl) = (población relativa% x recuento total de la población de padres)/100.

Hubo una clara disminución temprana de los recuentos de células T, tanto CD4 como CD8, siguiendo la dosis de 1 y 10 µg/kg (figura 19). En comparación con los recuentos de células obtenidas 1 día antes de la dosificación, hubo una disminución de 48 y 78% en el recuento de células T CD4 después de la dosis de 1 µg/kg y más del 90% después de la dosis de 10 µg/kg en el punto de tiempo de 4 horas. Los recuentos de células T CD8 fueron aún más afectadas drásticamente, con una caída del 86% después de la dosis de 1 µg/kg. Los recuentos de células T CD4 rebotaron rápidamente y fueron en general similares a los recuentos de dosis previa después de 48 horas. Sin embargo, los recuentos de células T CD8 fueron más lentos para recuperarse y alcanzaron niveles similares a los de la pre-dosis después de 1 semana. Esta disminución transitoria de las células T de sangre periférica se esperaba y refleja la activación de estas poblaciones por CD3/CD38 BEAT. Estas observaciones sugieren que los linfocitos T, y en particular las células T CD8 citotóxicas están implicadas en actividades de muerte en los tejidos.

También hubo una clara disminución en la población de monocitos CD38+ circulante (figura 20). Se observó una desaparición muy rápida, seguida de un rebote entre 24 y 48 horas. Este rebote fue seguido generalmente por una segunda disminución sustancial en el recuento de monocitos CD38+ indicando que esta población es probable que sea dirigida y agotada por la acción citotóxica de los linfocitos T.

EJEMPLO 8

Anticuerpos BEAT basados en 9G7 muestran una actividad de eliminación mejorada que un BEAT de OKT10xOKT3

Se investigaron las potencias de dos anticuerpos BEAT diferentes basados en 9G7 frente a un anticuerpo BEAT basado en OKT10 en ensayos RDL.

El anticuerpo biespecífico referido aquí como BEAT CD38-9G7ratón/CD3 es un anticuerpo BEAT CD38/CD3 basado en una combinación de sitios de unión a antígeno descritos en el ejemplo 2 (scFv VH11/VL8 de OKT3 para el brazo de épsilon CD3 anti-humano y 9G7 FAB quimérico de ratón-humano para el brazo CD38 anti-humano). El brazo CD38 anti-humano del anticuerpo biespecífico constaba de una cadena pesada BEAT (SEQ ID NO: 177) montado con su cadena ligera cognada (SEQ ID NO: 178). El brazo épsilon CD3 anti-humano del anticuerpo biespecífico consistía en una cadena pesada BEAT (SEQ ID NO: 179) que abarca el fragmento scFv épsilon CD3 anti-humano. El anticuerpo biespecífico se expresó transitoriamente y se purificó como se ha descrito anteriormente.

El anticuerpo biespecífico referido aquí como BEAT CD38-OKT10ratón/CD3 es un anticuerpo BEAT CD38/CD3 basado en una combinación de sitios de unión a antígeno descritos en el ejemplo 2 (scFv de OKT3 VH11/VL8 para el brazo épsilon de CD3 anti-humano y OKT10 FAB quimérico ratón-humano para el brazo CD38 anti-humano). El brazo CD38 anti-humano del anticuerpo biespecífico constaba de una cadena pesada BEAT (SEQ ID NO: 180) ensamblado con su cadena ligera cognada (SEQ ID NO: 181). El brazo épsilon CD3 anti-humano del anticuerpo biespecífico consistía en una cadena pesada BEAT (SEQ ID NO: 179) que abarca el fragmento scFv épsilon CD3 anti-humano. El anticuerpo biespecífico se expresó transitoriamente y se purificó como se ha descrito anteriormente.

El anticuerpo BEAT referido aquí como el anticuerpo BEAT CD38-9G7 de mejor ajuste/CD3 (SP34-Kappa2) se describió anteriormente en el ejemplo 4.

El potencial citotóxico de diferentes anticuerpos BEAT basados en los mAbs anti-CD38 de 9G7 o OKT10 se evaluó en un ensayo de eliminación contra las células Daudi CD38+(ATCC). Se realizó una lectura basada en citometría de flujo para cuantificar la muerte celular objetivo. Se usaron lecturas basadas en citometría de flujo similares en Moore et al. Blood. 2011 Apr 28;117(17):4542-51; Friedrich et al. Mol Cancer Ther 2012;11:2664-2673; Schlereth et al. Cancer Res 2005;65:2882-2889. Las células efectoras fueron PBMC no estimuladas de donantes sanos. La relación efector:objetivo era típicamente de 10:1 y el tiempo de incubación era de 48 horas. Brevemente, las células objetivo (Daudi) se marcaron con un colorante fluorescente citoplasmático tal como CFSE y se distribuyeron en placas de 96 pozos (TPP). Se distribuyeron diluciones en serie

de anticuerpos (soluciones 3x) y PBMC (50 µl/pozo) distribuyéndose luego en los pozos correspondientes. Las placas se incubaron durante 48 horas en una incubadora de CO2 al 5% a 37ºC. Las células se resuspendieron pipeteando y se transfirieron a placas de 96 pozos de fondo en U (TPP). Las placas de fondo en U se centrifugaron durante 3 minutos a 300 g, se desecharon los sobrenadantes y se resuspendieron las células en 200 µl de regulador de pH FACS frío (PBS + FBS al 2% + Versene al 10%) suplementado con 7-AAD (Becton Dickinson) aen una dilución 1/40. Las placas se adquirieron inmediatamente en un citómetro de flujo de guava easyCyte™ (Millipore). Para cada pozo, se determinó el número absoluto de células objetivo vivas activando la población negativa positiva de 7ADD de Colorante (CFSE) con el software flowjo (Treestar). El porcentaje de citotoxicidad específica para cada muestra se determinó usando la condición en la que sólo se incubaron células objetivo como línea de base o utilizando la condición en la que las células de Traget se mezclaron con PBMC (sin condiciones de anticuerpos). Los valores de EC50 se determinaron utilizando un método de regresión de pendiente variable no lineal con el software Prism (software GraphPad).

Los datos del cuadro 2 indican los valores de EC50 obtenidos con los diferentes constructos BEAT. Los anticuerpos BEAT basados en 9G7 (BEAT CD38-9G7ratón/CD3 y BEAT CD38-9G7mejor ajuste/CD3 (SP34-Kappa2) mostraron una actividad de eliminación caracterizada por una EC50 claramente inferior a la del anticuerpo BEAT CD38-OKT10ratón/CD3 (3.2 y 1.9 PM para los anticuerpos BEAT basados en 9G7 frente a 125.6 pM para el anticuerpo BEAT basado en OKT10), lo que indica un mayor potencial citotóxico de los anticuerpos BEAT anti-CD38/CD3 basados en 9G7.

CUADRO 2

Anticuerpos BEAT basados en 9G7 muestran una actividad de eliminación mejorada que un BEAT de OKT10xOKT3

	BEAT CD38-9G7ratón/CD3	BEAT CD38-9G7mejor ajuste/CD3(SP34-Kappa2)	BEAT CD38-OKT10ratón/CD3
EC50 (pM)*	3.2	1.9	126

*La EC50 indicada son valores medios de ensayos de eliminación realizados con diferentes donantes de PBMC. N= 8 para 9G7xOKT3, N= 2 para OKT10xOKT3 y n=1 para 9G7xSP34(GV2)

EJEMPLO 9

Aglutinantes 9G7 y 767 no muestran agonismo, en contraste con el anticuerpo HB7

CD38 siendo competente para la señalización, se ensayó la propiedad agonista de

los anticuerpos 9G7 y 767, en comparación con el clon HB7, en un ensayo de flujo de calcio en la línea celular de linfoma de células T humanas Jurkat que expresa naturalmente CD38. Las células Jurkat se cargaron con Colorante Fluo-4 a 2 µM (Invitrogen) durante 1 hora a 37°C. Las células se lavaron y se resuspendieron en PBS suplementado con Ca2+ 1 mM y Mg2+ 1 mM. Las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson) para la línea de base durante 40 segundos. A continuación se añadieron anticuerpos de ensayo a las muestras a la concentración de 10 µg/ml y se reanudó la adquisición hasta 7 minutos. La figura G muestra la intensidad de fluorescencia media (MFI) del colorante Fluo-4 (canal FL-1), que es una lectura de la movilización de calcio en el citoplasma de las células, en función del tiempo. Mientras que el control de isotipo (anticuerpo humano IgG1) no desencadenó ningún flujo de calcio, el anticuerpo anti-CD38 de HB7 indujo una señal fuerte. Sorprendentemente, ni el anticuerpo 9G7 ni el 767 fueron capaces de desencadenar una señal de movilización de calcio, indicando que estos anticuerpos, en contraste con el anticuerpo HB7, no tienen propiedades agonistas de CD38.

Durante la misma serie de experimentos también se demostró para 9G7 y 767 que se unen específicamente a células que expresan CD38 de una manera específica.

EJEMPLO 10

Mapeo de epítope

Mapeo de epítope H9G7

Mapeo lineal de péptidos se utilizó para determinar el epítope de 9G7 humanizado (versión mejor ajuste). El dominio extracelular de CD38 humano (residuos 43-300) se dividió en 19 péptidos consecutivos, 13 aminoácidos de longitud y un péptido final de 11 aminoácidos de longitud. Los péptidos se fusionaron a una región Fc de IgG1 humana (CH2-CH3) con un enlazador de dos aminoácidos (Ala-Ser) entre Fc y secuencia peptídica. Estos constructos se denominaron F1-F20 (SEQ ID NOs: 182-201) y su unión analizada por SPR. El anticuerpo humanizado 9G7 (cadena pesada SEQ ID NO: 145 y cadena ligera SEQ ID: 146) se inmovilizó covalentemente en un chip de sensor CM5 (aproximadamente 1800 RU). Las fusiones de Fc-péptido se inyectaron a 15 nM durante 240 segundos. Se inyectó el dominio extracelular CD38 humano como control. Sólo F6 y el control dieron una señal de unión (figura 22). Todos los fragmentos se reinyectaron a 200 nM y F6 dio una señal más fuerte (figura 23), mientras que los fragmentos restantes todavía no mostraron unión (datos no presentados). Como F6 es parte del epítope del anticuerpo SAR650984 descrito en la publicación PCT NO: WO2008047242 (cadena pesada con SEQ ID NO: 202 y cadena ligera con SEQ ID NO: 203) su interacción fue verificada por SPR y confirmada (datos no presentados). Así, h9G7 y SAR650984 compiten por la unión a CD38 humano. Además, cuando la secuencia F6 se mapea sobre

la superficie 3D del dominio extracelular de CD38 humano, se superpone con el epítope SAR650984. Sin embargo SAR650984 ha demostrado no ser de reacción cruzada con CD38 de cynomolgus, mientras que 9G7 humanizado se une a CD38 de cynomolgus con alta afinidad (figura 24), lo que sugiere que los dos anticuerpos tienen epítopes superpuestos pero diferentes.

Dentro de la secuencia F6, el residuo M110 es una Valina en el CD38 de cynomolgus. Así, en el contexto de todo el dominio extracelular de CD38 humano, hemos mutado M110 a Valina (SEQ ID NO: 204) y comparó la unión de h9G7 y SAR650984. SAR650984 mostró una unión reducida en comparación con su unión a CD38 humano de tipo salvaje mientras que la unión de 9G7 humanizado no se vio afectada (datos no mostrados). Basado en la estructura cristalina de SAR650984 en complejo con el dominio extracelular de CD38 humano (código de acceso PDB 4CMH, Deckert et al., 2014 Clin. Cancer Res. **20**: 4574), se identificó un residuo adicional que es potencialmente importante para la unión de SAR650984 y que difiere entre CD38 de humano y cynomolgus. Este residuo fue T148 y es una metionina en CD38 de cynomolgus. La mutación de T148 a Metionina en el dominio extracelular de CD38 humano (SEQ ID NO: 205) redujo significativamente la unión de SAR650984 mientras que la unión humanizada de 9G7 no fue afectada (datos no mostrados). Un doble mutante del dominio extracelular de CD38 humano que contiene mutaciones M110V y T148M (SEQ ID NO: 206, véase la figura 23) abolió la unión de SAR650984 mientras que la unión de 9G7 humanizada no se vio afectada (figura 24). Así, se puede concluir que mientras 9G7 y SAR650984 humanizados compiten por la unión a CD38 humano, los residuos que están unidos por estos anticuerpos no son idénticos.

Mapeo de epítope 767

El epítope del anticuerpo 767 se mapeó usando el mismo conjunto de fusiones lineales de péptido-Fc utilizadas para los experimentos de mapeo de epítopes descritos anteriormente. El anticuerpo 767 (cadena pesada SEQ ID NO: 151 y cadena ligera de SEQ ID NO: 152) se inmovilizó covalentemente en un chip sensor CM5 (aproximadamente 700 RU). Las fusiones Fc de péptido (F1-F20, SEQ ID NO: 182-201) se inyectaron a 1000 nM durante 240 segundos. El dominio extracelular de CD38 extracelular humano se inyectó como control. Sólo F3 y el control dieron una señal de unión (figura 25). Cuando la secuencia F3 se mapea sobre la superficie 3D del dominio extracelular de CD38 humano (figura 26), se superpone parcialmente con el epítope SAR650984, más específicamente con dos residuos: E76 y H79. Sin embargo, 767 es reactivo cruzado con CD38 de cynomolgus (con menor afinidad) mientras que SAR650984 no lo es, lo que sugiere que los dos anticuerpos tienen epítopes superpuestos pero diferentes. Además SAR650984 no se unió al constructo F3 por SPR (figura 27). Así, se puede concluir que mientras 767 y SAR650984 compiten por la unión a CD38 humano, los residuos que están unidos por estos

anticuerpos no son idénticos.