

REIVINDICACIONES

1. Molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T, que comprende:
 - (a) una primera fracción de unión a antígeno que se une específicamente a un primer antígeno,
 - (b) una segunda fracción de unión a antígeno que se une específicamente a un segundo antígeno,

en la que el primer antígeno es CD3 y el segundo antígeno es el ACE, o el primer antígeno es el ACE y el segundo antígeno es CD3 y

en el que la fracción de unión a antígeno que se une específicamente a ACE comprende una región variable de cadena pesada, particularmente una región variable de cadena pesada humanizada, que comprende la región determinante de complementariedad de cadena pesada (RDCP) 1 de SEC ID nº 14, la RDCP 2 de SEC ID nº 15 y la RDCP 3 de SEC ID nº 16 y una región variable de cadena ligera, particularmente una región variable de cadena ligera humanizada que comprende la región determinante de complementariedad de cadena ligera (RDCL) 1 de SEC ID nº 17, la RDCL 2 de SEC ID nº 18 y la RDCP 3 de SEC ID nº 19, y donde la fracción de unión a antígeno que específicamente se une a CD3 comprende una región variable de cadena pesada que comprende la RDC1 de cadena pesada de SEC ID nº 4, la RDC2 de cadena pesada de SEC ID nº 5, la RDC3 de cadena pesada de SEC ID nº 6 y una región variable de cadena ligera que comprende la RDC1 de cadena ligera de SEC ID nº 8, la RDC2 de cadena ligera de SEC ID nº 9 y la RDC3 de cadena ligera de SEC ID nº 10.

2. Molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según la reivindicación 1, en la que la fracción de unión a antígeno que se une específicamente a ACE comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 22, y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 23.}
3. Molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según la reivindicación 1 o 2, en la que la primera y/o segunda fracciones de unión a antígeno son una molécula de Fab.
4. Molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la segunda fracción de unión a

antígeno es una molécula de Fab que se une específicamente al segundo antígeno, y en la que los dominios variables VL y VH o los dos dominios constantes CL y CH1 de la cadena ligera de Fab y de la cadena pesada de Fab se sustituyen uno por otro.

5. Molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el primer antígeno es ACE y el segundo antígeno CD3.
6. Molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que CD3 es particularmente CD3-epsilón.
7. Molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la fracción de unión a antígeno que se une específicamente a CD3 comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 3, y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 7.
8. Molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la primera fracción de unión a antígeno en (a) es una primera molécula de Fab que se une específicamente a un primer antígeno, la segunda fracción de unión a antígeno en (b) es una segunda molécula de Fab que se une específicamente a un segundo antígeno, en el que los dominios variables VL y VH de la cadena ligera de Fab y la cadena pesada de Fab se sustituyen una por otra,

Y

- i) en el dominio constante CL de la primera molécula Fab bajo a) el aminoácido en la posición 124 se sustituye independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración según Kabat) y en el que en el dominio constante CH1 de la primera molécula Fab bajo a) el aminoácido en la posición 147 o el aminoácido en la posición 213 se sustituye independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración según el índice EU de Kabat), o
- ii) en el dominio constante CL de la segunda molécula Fab bajo b) el aminoácido en la posición 124 se sustituye independientemente por lisina

- (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración según Kabat) y en el que en el dominio constante CH1 de la segunda molécula Fab bajo b) el aminoácido en la posición 147 o el aminoácido en la posición 213 se sustituye independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración según el índice EU de Kabat).
9. Molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según la reivindicación 8, en la que en el dominio constante CL de la primera molécula de Fab en a) el aminoácido en la posición 124 se sustituye independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración según Kabat) y en la que en el dominio constante CH1 de la primera molécula de Fab en a), el aminoácido en la posición 147 o el aminoácido en la posición 213 se sustituye independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración según el índice EU de Kabat).
 10. Molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según la reivindicación 8 o 9, en la que en el dominio constante CL de la primera molécula de Fab en a) el aminoácido en la posición 124 se sustituye independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración según Kabat) y en la que en el dominio constante CH1 de la primera molécula de Fab en a) el aminoácido en la posición 147 se sustituye independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración según el índice EU de Kabat).
 11. Molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en la que en el dominio constante CL de la primera molécula de Fab en a) el aminoácido en la posición 124 se sustituye independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración según Kabat) y el aminoácido en la posición 123 se sustituye independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración según Kabat) y en la que en el dominio constante CH1 de la primera molécula Fab en a), el aminoácido en la posición 147 se sustituye independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración según el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración según el índice EU de Kabat).
 12. Molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en la que en el que en el dominio constante CL de la primera molécula de Fab en a) el aminoácido en la posición 124 se sustituye por lisina (K) (numeración según Kabat) y el aminoácido en la

posición 123 se sustituye por arginina (R) (numeración según Kabat) y en la que el dominio constante CH1 de la primera molécula de Fab en a), el aminoácido en la posición 147 se sustituye por ácido glutámico (E) (numeración según el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye independientemente por ácido glutámico (E) (numeración según el índice EU de Kabat).

- 13.** Molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en la que en el dominio constante CL de la primera molécula de Fab en a) el aminoácido en la posición 124 se sustituye por lisina (K) (numeración según Kabat) y el aminoácido en la posición 123 se sustituye por lisina (K) (numeración según Kabat) y en la que el dominio constante CH1 de la primera molécula de Fab en a), el aminoácido en la posición 147 se sustituye por ácido glutámico (E) (numeración según el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye independientemente por ácido glutámico (E) (numeración según el índice EU de Kabat).
- 14.** Molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según la reivindicación 8, en la que en el dominio constante CL de la segunda molécula de Fab en b) el aminoácido en la posición 124 se sustituye independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración según Kabat) y en la que en el dominio constante CH1 de la segunda molécula de Fab en b), el aminoácido en la posición 147 o el aminoácido en la posición 213 se sustituye independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración según el índice EU de Kabat).
- 15.** Molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según la reivindicación 8 o 14, en la que en el dominio constante CL de la segunda molécula de Fab en b) el aminoácido en la posición 124 se sustituye independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración según Kabat) y en la que en el dominio constante CH1 de la segunda molécula de Fab en b) el aminoácido en la posición 147 se sustituye independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración según el índice EU de Kabat).
- 16.** Molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según cualquiera de las reivindicaciones 8, 14 y 15, en la que en el dominio constante CL de la segunda molécula Fab en b) el aminoácido en la posición 124 se sustituye independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H)

(numeración según Kabat) y el aminoácido en la posición 123 se sustituye independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración según Kabat) y en la que en el dominio constante CH1 de la segunda molécula Fab en b), el aminoácido en la posición 147 se sustituye independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración según el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración según el índice EU de Kabat).

17. Molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según las reivindicaciones 8y 14 a 16, en la que en el que en el dominio constante CL de la segunda molécula de Fab en b) el aminoácido en la posición 124 se sustituye por lisina (K) (numeración según Kabat) y el aminoácido en la posición 123 se sustituye por arginina (R) (numeración según Kabat) y en la que el dominio constante CH1 de la segunda molécula de Fab en b), el aminoácido en la posición 147 se sustituye por ácido glutámico (E) (numeración según el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye independientemente por ácido glutámico (E) (numeración según el índice EU de Kabat).
18. Molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según cualquiera de las reivindicaciones 8 y 14 a 16, en la que en el que en el dominio constante CL de la segunda molécula de Fab en b) el aminoácido en la posición 124 se sustituye por lisina (K) (numeración según Kabat) y el aminoácido en la posición 123 se sustituye por arginina (R) (numeración según Kabat) y en la que el dominio constante CH1 de la segunda molécula de Fab en b), el aminoácido en la posición 147 se sustituye por ácido glutámico (E) (numeración según el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye independientemente por ácido glutámico (E) (numeración según el índice EU de Kabat).
19. Molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, que comprende además:
 - c) una tercera fracción de unión a antígeno que se une específicamente a un primer antígeno.
20. Molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según la reivindicación 19, en la que la tercera fracción de unión a antígeno es una molécula de Fab.

21. Molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según la reivindicación 19 o 20, en la que la tercera fracción de unión a antígeno es idéntica a la primera fracción de unión a antígeno.
22. Molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21, en la que la primera y la tercera fracciones de unión a antígeno se unen específicamente a ACE, y la segunda fracción de unión a antígeno se une específicamente a CD3 particularmente CD3-epsilon.
23. Molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, que comprende además:
 - d) un dominio Fc compuesto de una primera y una segunda subunidades capaces de asociación estable.
24. Molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23, en la que la primera y la segunda fracciones de unión a antígeno se fusionan una con otra, opcionalmente mediante un conector peptídico.
25. Molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, en la que la primera y la segunda fracciones de unión a antígeno son moléculas de Fab y la segunda fracción de unión a antígeno se fusiona en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab con el extremo N-terminal de la cadena pesada de Fab de la primera fracción de unión a antígeno.
26. Molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, en la que la primera y la segunda fracciones de unión a antígeno son moléculas de Fab y la primera fracción de unión a antígeno se fusiona en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab con el extremo N-terminal de la cadena pesada de Fab de la segunda fracción de unión a antígeno.
27. Molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según la reivindicación 25 o 26, en la que la primera y la segunda fracciones de unión a antígeno son moléculas de Fab y la cadena ligera de Fab de la primera fracción de unión a antígeno y la cadena ligera de Fab de la segunda fracción de unión a antígeno se fusionan entre sí, opcionalmente mediante un conector peptídico.

28. Molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según la reivindicación 23, en la que la primera y la segunda fracciones de unión a antígeno son moléculas de Fab y la segunda fracción de unión a antígeno se fusiona en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab con el extremo N-terminal de la primera o la segunda subunidad del dominio Fc.
29. Molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según la reivindicación 23, en la que la primera y la segunda fracciones de unión a antígeno son moléculas de Fab y la primera fracción de unión a antígeno se fusiona en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab con el extremo N-terminal de la primera o la segunda subunidad del dominio Fc.
30. Molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según la reivindicación 23, en la que la primera y la segunda fracciones de unión a antígeno son moléculas de Fab y la primera y la segunda fracciones de unión a antígeno se fusionan, cada una, en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab con el extremo N-terminal de una de las subunidades del dominio Fc.
31. Molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según cualquiera de las reivindicaciones 23, 28 o 29, en la que la tercera fracción de unión a antígeno es una molécula de Fab y se fusiona en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab con el extremo N-terminal de la primera o la segunda subunidad del dominio Fc.
32. Molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según la reivindicación 23, en la que la primera, segunda y tercera fracciones de unión a antígeno son moléculas de Fab y la segunda y tercera fracciones de unión a antígeno se fusionan, cada una, en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab con el extremo N-terminal de una de las subunidades del dominio Fc y la primera fracción de unión a antígeno se fusiona en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab con el extremo N-terminal de la cadena pesada de Fab de la segunda fracción de unión a antígeno.
33. Molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según la reivindicación 23, en la que la primera, segunda y tercera fracciones de unión a antígeno son moléculas de Fab y la primera y tercera fracciones de unión a antígeno se fusionan, cada una, en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab con el extremo N-terminal de una de las subunidades del dominio Fc y la segunda fracción de unión a antígeno se fusiona en el extremo C-terminal de la

cadena pesada de Fab con el extremo N-terminal de la cadena pesada de Fab de la primera fracción de unión a antígeno.

34. Molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según la reivindicación 33, en la que la primera y la tercera fracciones de unión a antígeno y el dominio Fc son parte de una molécula de inmunoglobulina, particularmente una inmunoglobulina de la clase IgG.
35. Molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según cualquiera de las reivindicaciones 23 a 34, en la que el dominio Fc es una IgG, específicamente un dominio Fc de IgG₁ o IgG₄.
36. Molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según cualquiera de las reivindicaciones 23 a 35, en la que el dominio Fc es un dominio Fc humano.
37. Molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según cualquiera de las reivindicaciones 23 a 36, en la que el dominio Fc comprende una modificación estimuladora de la asociación de la primera y la segunda subunidades del dominio Fc.
38. Molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según la reivindicación 37, en la que en el dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc un residuo aminoácido se sustituye por un residuo aminoácido que presenta un volumen de cadena lateral mayor, generando de esta manera una protuberancia dentro del dominio CH3 de la primera subunidad que es posicionable en una cavidad dentro del dominio CH3 de la segunda subunidad, y en el dominio CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc se sustituye un residuo aminoácido por un residuo aminoácido que presenta un volumen de cadena lateral menor, generando de esta manera una cavidad dentro del dominio CH3 de la segunda subunidad dentro de la que puede posicionarse la protuberancia del dominio CH3 de la primera subunidad.
39. Molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según la reivindicación 38, en la que dicho residuo aminoácido que presenta un volumen mayor de cadena lateral se selecciona de entre el grupo que consiste de arginina (R), fenilalanina (F), tirosina (Y) y triptófano (W), y dicho residuo aminoácido que presenta un volumen menor de cadena lateral se selecciona de entre el grupo que consiste de alanina (A), serina (S), treonina (T) y valina (V).

40. Molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según la reivindicación 38 o 39, en la que en el dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc, el residuo treonina en la posición 366 se sustituye por un residuo de triptófano (T366W) y en el dominio CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc, el residuo de tirosina en la posición 407 se sustituye por un residuo de valina (Y407V) y opcionalmente en la segunda subunidad del dominio Fc además el residuo de treonina en la posición 366 se sustituye por un residuo de serina (T366S) y el residuo de leucina en la posición 368 se sustituye por un residuo de alanina (L368A) (numeraciones según el índice EU de Kabat).
41. Molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según cualquiera de las reivindicaciones 38 a 40, en la que la primera subunidad del dominio Fc adicionalmente el residuo de serina en la posición 354 se sustituye por un residuo de cisteína (S354C) o el residuo de ácido glutámico en la posición 356 se sustituye por un residuo de cisteína (E356C) y en la segunda subunidad del dominio Fc adicionalmente el residuo de tirosina en la posición 349 se sustituye por un residuo de cisteína (Y349C) (numeraciones según el índice EU de Kabat).
42. Molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según cualquiera de las reivindicaciones 38 a 41, en la que la primera subunidad del dominio Fc comprende las sustituciones de aminoácidos S354C y T366W, y la segunda subunidad del dominio Fc comprende las sustituciones de aminoácidos Y349C, T366S, L368A e Y407V (numeración según el índice EU de Kabat).
43. Molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según cualquiera de las reivindicaciones 23 a 42, en la que el dominio Fc muestra una afinidad de unión reducida a un receptor de Fc y/o una función efectora reducida en comparación con un dominio Fc de IgG₁ nativa.
44. Molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según cualquiera de las reivindicaciones 23 a 43, en la que el dominio Fc comprende una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la unión a un receptor de Fc y/o la función efectora.
45. Molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según la reivindicación 44, en la que dicha sustitución o sustituciones de aminoácidos se encuentran en una o más posiciones seleccionadas de entre el grupo de L234, L235 y P329 (numeración según el índice EU de Kabat).

46. Molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según cualquiera de las reivindicaciones 23 a 45, en la que cada subunidad del dominio Fc comprende tres sustituciones de aminoácidos que reducen la unión a un receptor de Fc y/o la función efectora, en la que dichas sustituciones de aminoácidos son L234A, L235A y P329G (numeración según el índice EU de Kabat).
47. Molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según cualquiera de las reivindicaciones 43 a 46, en la que el receptor de Fc es un receptor de Fcγ.
48. Molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según cualquiera de las reivindicaciones 43 a 47, en la que la función efectora es la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA).
49. Uno o más polinucleótidos aislados codificantes de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 48.
50. Uno o más vectores, particularmente vectores de expresión, que comprenden el polinucleótido o polinucleótidos según la reivindicación 49.
51. Célula huésped que comprende el polinucleótido o polinucleótidos según la reivindicación 49 o el vector o vectores según la reivindicación 50.
52. Método de producción de una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T capaz de unión específica a ACE y CD3, que comprende las etapas de a) cultivar la célula huésped según la reivindicación 51 bajo condiciones adecuadas para la expresión de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T y b) recuperar opcionalmente la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T.
53. Molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T producida mediante el método según la reivindicación 52.
54. Composición farmacéutica que comprende la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de células T según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 48 o 53 y un portador farmacéuticamente aceptable.