

ANTICUERPO ANTI-CD3 Y MOLÉCULAS QUE COMPRENDEN EL ANTICUERPO

Campo técnico

5 La presente invención se relaciona a un novedoso anticuerpo que se une a CD3 humana y se une a CD3 de mono cinomolgo, y a moléculas que comprenden tal anticuerpo.

Antecedentes de la invención

10 1) Los anticuerpos monoclonales anti-CD3, como con cualquier otro anticuerpo monoclonal, funcionan mediante el reconocimiento preciso de sus moléculas blanco. Cada anticuerpo anti-CD3 reconoce solo un epítipo único en la molécula CD3 blanco. Entre los anticuerpos monoclonales específicos para un complejo CD3, OKT3 se utiliza más frecuentemente y está mejor caracterizado.

15 2) OKT3 es un anticuerpo monoclonal anti-CD3 humana derivado de ratón (Documento no relacionado con patente núm. 1). Se han administrado anticuerpos monoclonales anti-CD3 en un procedimiento para prevenir que los órganos trasplantados sean rechazados. Los anticuerpos se unen a complejos TCR en linfocitos T humanos e inhiben su activación y proliferación. Este tratamiento se ha utilizado durante mucho tiempo para evitar el rechazo del homoinjerto de un órgano (Documentos no relacionados con patente de los núm. 2 al 4). OKT3 es el primer anticuerpo anti-CD3 que se utiliza en dicho procedimiento. OKT3 tiene un pronunciado efecto inmunosupresor, mientras que su uso clínico se ve
20 obstaculizado debido a reacciones adversas graves asociadas con su inmunogenicidad y potencial mitogénico (Documentos no relacionados con patente de los núm. 5 al 8).

25 3) OKT3 induce la activación de linfocitos T y la producción de citocinas *in vitro* y libera grandes cantidades de citocinas *in vivo* que producen síndrome de citocinas (Documento no relacionado con patente núm. 5). Esto se debe a que OKT3 es una molécula de IgG bivalente y, por lo tanto, reticula los linfocitos T y los linfocitos que expresan al receptor Fcγ, provocando en consecuencia la activación de linfocitos T (Documento no relacionado con patente núm. 8). Además, OKT3 es un anticuerpo de ratón y, por lo tanto, se sabe que produce anticuerpos heterófilos tales como anticuerpos humanos anti-ratón (HAMA, por sus siglas en inglés) a través de la administración a largo plazo (Documento no relacionado con patente núm. 7). A continuación se resumen los informes sobre la aplicación del tratamiento con anticuerpos anti-CD3 y
30 sus reacciones adversas (Documento tipo patente núm. 1).

35 4) Con el fin de resolver estos problemas, se han creado OKT3 con formato scFv (Documento no relacionado con patente núm. 9) y OKT3 humanizado (Documento no relacionado con patente núm. 10). Se ha descrito un anticuerpo biespecífico que combina una cadena simple de OKT3 con una cadena simple de un anticuerpo contra un antígeno con especificidad de blanco expresado en la superficie de una célula neoplásica en otro ejemplo de una aplicación de OKT3 (Documento tipo patente núm. 2 y documento no relacionado con patente núm. 11).

 5) Se espera que los anticuerpos multiespecíficos que comprenden los anticuerpos anti-CD3 descritos en el estado de la técnica tengan un potencial terapéutico significativo en el tratamiento contra

enfermedades de neoplasias malignas. Por ejemplo, se sabe que TROP2 está sobreexpresado en varios tipos de tumores epiteliales (Documentos no relacionados con patente de los núm. 12 al 16). Aún no se ha reportado algún anticuerpo biespecífico expresado que una genéticamente un anticuerpo específico a TROP2 humana a un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo anti-CD3.

6) OKT3 reacciona con CD3 de chimpancé, pero no reacciona con CD3 derivada de otros primates tales como monos cinomolgos (Documento no relacionado con patente núm. 17). Del mismo modo, el anticuerpo monoclonal anti-CD3, UCHT-1, también reacciona con CD3 derivada de chimpancé, pero no reacciona con CD3 derivada de mono cinomolgo (Documento no relacionado con patente núm. 18). Por otro lado, se han encontrado algunos anticuerpos monoclonales que reconocen antígenos de mono cinomolgo, pero no reconocen a sus contrapartes humanas. Un ejemplo de este grupo es FN-18, que es un anticuerpo monoclonal dirigido hacia CD3 derivada de mono cinomolgo (Documento no relacionado con patente núm. 19).

7) La limitación de OKT3 y la serie de anticuerpos OKT3 modificados es su especificidad para CD3 humana. Esta limitación puede constituir una barrera considerable para el desarrollo de fármacos terapéuticos para el tratamiento de enfermedades humanas. Esto se debe a que los fármacos candidatos para el desarrollo deben someterse a ensayos preclínicos para obtener la aprobación de comercialización, y es deseable llevar a cabo dichos ensayos preclínicos en animales, particularmente primates superiores como monos cinomolgos. Por lo tanto, en el caso de fármacos candidatos que contienen anticuerpos anti-CD3, es muy deseable utilizar un anticuerpo anti-CD3 capaz de unirse tanto a CD3 humana como a CD3 de mono cinomolgo.

8) La unión de anticuerpos con reacciones cruzadas a CD3 humana y CD3 de mono cinomolgo se ha informado en los Documentos de patente núm. 3 y 4 y el Documento no relacionado con patente núm. 20. Además, se ha informado de un anticuerpo biespecífico en el que una cadena simple de dicho anticuerpo anti-CD3 se une con una cadena simple de un anticuerpo contra un antígeno con especificidad de blanco expresado en la superficie de células neoplásicas (Documento tipo patente núm. 5 y documento no relacionado con patente núm. 21). Sin embargo, para poder aplicar anticuerpos multiespecíficos o moléculas multiespecíficas a blancos específicos de cáncer muy diversos, existe la demanda de un anticuerpo anti-CD3 que se una a epítomos distintos de los mencionados anteriormente y se una a CD3 de mono cinomolgo y de humano.

Estado de la técnica

Documentos tipo patente

Documento tipo patente núm. 1: Publicación internacional núm. WO2012/162067

Documento tipo patente núm. 2: Publicación internacional núm. WO2007/108152A1

Documento tipo patente núm. 3: Publicación de patente estadounidense núm. 8236308B2

Documento tipo patente núm. 4: Publicación internacional núm. WO2008/119567A1

Documento tipo patente núm. 5: Publicación internacional núm. WO2015/026892A1

Documentos no relacionados con patente

Documento no relacionado con patente núm. 1: Salmeron A. et al., J. Immunol. (1991) 147, 3047-3052

Documento no relacionado con patente núm. 2: Cosmi AB. et al., Transplantation (1981) 32, 535-539

Documento no relacionado con patente núm. 3: Gilbert EM. et al., Am.J.Med. (1987) 82, 202-206

Documento no relacionado con patente núm. 4: Thistlethwaite JR. et al., Transplantation (1987) 43, 176-184

Documento no relacionado con patente núm. 5: Abramowicz D. et al., Transplantation (1989) 47, 606-608

Documento no relacionado con patente núm. 6: Toussaint D. et al., Transplantation (1989) 48, 524-526

Documento no relacionado con patente núm. 7: Thistlethwaite, JR. et al., Am. J. Kidney Dis. (1988) 11, 112-119

Documento no relacionado con patente núm. 8: Meuer, SC. et al., Eur. J. Immunol. (1986) 136, 4106-4112

Documento no relacionado con patente núm. 9: George AJ. et al., J. Immunol. (1994) 152 (4), 1802-11

Documento no relacionado con patente núm. 10: Woodle ES. et al., J Immunol. (1992) 148 (9), 2756-63

Documento no relacionado con patente núm. 11: Yankelevich M. et al., Pediatr. Blood Cancer (2012) 59 (7), 1198-1205

Documento no relacionado con patente núm. 12: Ohmachi T. et al., Clin. Cancer Res. (2006) 12 (18), 3857-3863

Documento no relacionado con patente núm. 13: Muhlmann G., et al., J. Clin. Pathol. (2009) 62 (2), 152-158

Documento no relacionado con patente núm. 14: Fong D., et al., Br. J. Cancer (2000) 99 (8), 1290-1295.

Documento no relacionado con patente núm. 15: Fong D. et al., Mod. Pathol. (2000) 21 (2) (2000), 186-191

Documento no relacionado con patente núm. 16: Ning S., et al., Neurol. Sci. (2013) 34 (10), 1745-1750

Documento no relacionado con patente núm. 17: Sandusky et al., J. Med. Primatol. (1986) 15, 441-451

Documento no relacionado con patente núm. 18: <http://www.nhpreagents.org/NHP/clonelist.aspx?ID=77>

Documento no relacionado con patente núm. 19: Uda et al., J.Med.Primatol. (2001) 30, 141-147

Documento no relacionado con patente núm. 20: Conrad ML. et al., Cytometry A. (2007) 71 (11),

925-33

Documento no relacionado con patente núm. 21: Lum LG. et al., BioDrugs (2011) 25 (6), 365-379.

Breve descripción de la invención

5 Problema a resolver mediante la invención

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un anticuerpo novedoso o un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo (en lo sucesivo, también denominado a manera de anticuerpo, etc.) que se une a CD3 humana y a CD3 de mono cinomolgo, una molécula que comprende el anticuerpo, etc. y que comprende además 1 o 2 o más anticuerpos adicionales o fragmentos de unión a antígeno de los anticuerpos, la molécula es multiespecífica, y una composición farmacéutica que tiene actividad citotóxica, etc. que incluye el anticuerpo, etc. o la molécula a manera de ingrediente activo.

Medios para resolver el problema

Los inventores de la presente han llevado a cabo una amplia investigación para lograr este objetivo y han realizado la presente invención mediante el desarrollo de un novedoso anticuerpo anti-CD3 y una molécula que comprende este anticuerpo.

Específicamente, la presente invención comprende los siguientes aspectos:

(1) Un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo, en donde:

una secuencia de cadena pesada que comprende

CDRH1 que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 26,

CDRH2 que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 98, y

CDRH3 que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 28;

una secuencia de cadena ligera que comprende

CDRL1 que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 29,

CDRL2 que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 99, y

CDRL3 que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 31; y

el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno se une a CD3 humana y a CD3 de mono cinomolgo.

(2) Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de acuerdo con (1), en donde en CDRH2

el primer Xaa es seleccionado a partir de un grupo que consiste en A, E, G, H, I, L, T, V, R y S, y

el segundo Xaa es S, o

el primer Xaa es N, y

el segundo Xaa es seleccionado a partir de un grupo que consiste en E, R, F, Y, L, V, I, K y T,

en CDRL2,

Xaa es seleccionado a partir de un grupo que consiste en Q, A, G, S, N y D, y

el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno se une a CD3 humana y a CD3 de mono cinomolgo.

(3) Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de acuerdo con (1) o (2), en donde

en CDRH2,

el primer Xaa es seleccionado a partir de un grupo que consiste en R y S, y el segundo Xaa es S,

en CDRL2,

Xaa es seleccionado a partir del grupo que consiste en Q, A, G, S, N y D, y

el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno se une a CD3 humana y a CD3 de mono cinomolgo.

(4) Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de acuerdo con (1), en donde

la secuencia de la cadena pesada comprende una región variable que tiene CDRH1, CDRH2 y CDRH3,

CDRH1 que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 26,

CDRH2 que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 27, y

CDRH3 que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 28;

la secuencia de la cadena ligera comprende una región variable que tiene CDRL1, CDRL2 y CDRL3,

CDRL1 que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 29,

CDRL2 que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 30, y

CDRL3 que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 31; y

el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno se une a CD3 humana y a CD3 de mono cinomolgo.

(5) Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de (1) a (4), en donde la secuencia de la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 100.

(6) Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con (5), en donde

en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 100,

el primer Xaa es seleccionado a partir de un grupo que consiste en A, E, G, H, I, L, T, V, R y S, y

el segundo Xaa es S, o

el primer Xaa es N, y

el segundo Xaa es seleccionado a partir de un grupo que consiste en E, R, F, Y, L, V, I, K y T.

(7) Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con (5), en donde

en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 100,

el primer Xaa es seleccionado a partir de un grupo que consiste en R y S, y el segundo Xaa es S.

(8) Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con cualquiera de (1) a (7), en donde la secuencia de la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos representada por cualquiera de las SEQ ID NO: 101, 102 y 103.

(9) Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con (8), en donde

en la secuencia de aminoácidos representada por cualquiera de las SEQ ID NO: 101, 102 y 103,

Xaa es seleccionado a partir de un grupo que consiste en Q, A, G, S, N y D.

(10) Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de acuerdo con (5), en donde la secuencia de la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 16.

5 (11) Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de acuerdo con (8), en donde la secuencia de la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos representada por cualquiera de las SEQ ID NO: 17, 20 y 23.

10 (12) Un anticuerpo o fragmento de unión del mismo de acuerdo con (1), en donde el anticuerpo o fragmento de unión de anticuerpo comprende una secuencia de la región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 100 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por cualquiera de las SEQ ID NO: 101, 102 y 103, en donde

en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 100,

15 el primer Xaa es seleccionado a partir de un grupo que consiste en A, E, G, H, I, L, T, V, R y S, y el segundo Xaa es S, o

el primer Xaa es N, y el segundo Xaa es seleccionado a partir de un grupo que consiste en E, R, F, Y, L, V, I, K y T, y

en la secuencia de aminoácidos representada por cualquiera de las SEQ ID NO: 101, 102 y 103,

20 Xaa es seleccionado a partir de un grupo que consiste en Q, A, G, S, N y D.

(13) Un anticuerpo o fragmento de unión del mismo de acuerdo con (12), en donde en SEQ ID NO: 100

el primer Xaa es seleccionado a partir de un grupo que consiste en R y S, y

el segundo Xaa es S, y

en la secuencia de aminoácidos representada por cualquiera de las SEQ ID NO: 101, 102 y 103,

25 Xaa es seleccionado a partir de un grupo que consiste en Q, A, G, S, N y D.

(14) Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende del 2.º al 119.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 60 y una región variable de cadena ligera que comprende del 135.º al 243.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 60,

30 un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende del 2.º al 119.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 64 y una región variable de cadena ligera que comprende del 135.º al 241.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 64,

un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende del 2.º al 119.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 66 y una región variable de cadena ligera que comprende del 135.º al 243.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 66,

35 un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende del 2.º al 119.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 68 y una región variable de cadena ligera que comprende del 135.º al 243.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 68,

un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende del 2.º al 119.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 70 y una región variable de cadena ligera que comprende del 135.º al 243.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 70,

un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende del 2.º al 119.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 72 y una región variable de cadena ligera que comprende del 135.º al 243.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 72,

un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende del 2.º al 119.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 74 y una región variable de cadena ligera que comprende del 135.º al 243.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 74,

un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende del 2.º al 119.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 76 y una región variable de cadena ligera que comprende del 135.º al 243.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 76,

un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende del 2.º al 119.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 78 y una región variable de cadena ligera que comprende del 135.º al 243.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 78,

un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende del 2.º al 119.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 80 y una región variable de cadena ligera que comprende del 135.º al 243.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 80,

un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende del 2.º al 119.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 82 y una región variable de cadena ligera que comprende del 135.º al 243.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 82, o

un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende del 2.º al 119.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 84 y una región variable de cadena ligera que comprende del 135.º al 243.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 84,

de acuerdo con (13).

(15) Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de acuerdo con (1), (4), (5), (8), (10), o (11), en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 16, un ligador y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por cualquiera de las SEQ ID NO: 17, 20 y 23.

(16) Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de (1) a (15), en donde una región variable de cadena pesada se une a una región variable de cadena ligera en este orden, o una región variable de cadena ligera se une a una región variable de cadena pesada en este orden, desde el extremo amino, y opcionalmente: i) tiene un ligador entre ambas regiones variables, ii) tiene un residuo de glicina en la amina terminal de una región variable en el lado del extremo amino terminal, y iii) tiene un ligador, una etiqueta FLAG y/o etiqueta HIS en el carboxilo terminal de una región variable en el lado del extremo carboxilo terminal.

(17) Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de acuerdo con (16), en

donde

una secuencia de aminoácidos que comprende del 2.º al 241.º residuo de aminoácido de la SEQ
ID NO: 64,

una secuencia de aminoácidos que comprende del 2.º al 243.º residuo de aminoácido de la SEQ
ID NO: 66,

una secuencia de aminoácidos que comprende del 2.º al 243.º residuo de aminoácido de la SEQ
ID NO: 68,

una secuencia de aminoácidos que comprende del 2.º al 243.º residuo de aminoácido de la SEQ
ID NO: 70,

una secuencia de aminoácidos que comprende del 2.º al 243.º residuo de aminoácido de la SEQ
ID NO: 72,

una secuencia de aminoácidos que comprende del 2.º al 243.º residuo de aminoácido de la SEQ
ID NO: 74,

una secuencia de aminoácidos que comprende del 2.º al 243.º residuo de aminoácido de la SEQ
ID NO: 75,

una secuencia de aminoácidos que comprende del 2.º al 243.º residuo de aminoácido de la SEQ
ID NO: 76,

una secuencia de aminoácidos que comprende del 2.º al 243.º residuo de aminoácido de la SEQ
ID NO: 80,

una secuencia de aminoácidos que comprende del 2.º al 243.º residuo de aminoácido de la SEQ
ID NO: 82, o

una secuencia de aminoácidos que comprende del 2.º al 243.º residuo de aminoácido de la SEQ
ID NO: 84.

(18) Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de acuerdo con (16), en
donde

una secuencia de aminoácidos que comprende del 2.º al 269.º residuo de aminoácido de la SEQ
ID NO: 19,

una secuencia de aminoácidos que comprende del 2.º al 269.º residuo de aminoácido de la SEQ
ID NO: 22,

una secuencia de aminoácidos que comprende del 2.º al 267.º residuo de aminoácido de la SEQ
ID NO: 25,

una secuencia de aminoácidos que comprende del 2.º al 269.º residuo de aminoácido de la SEQ
ID NO: 60,

una secuencia de aminoácidos que comprende del 2.º al 267.º residuo de aminoácido de la SEQ
ID NO: 64,

una secuencia de aminoácidos que comprende del 2.º al 269.º residuo de aminoácido de la SEQ
ID NO: 66,

una secuencia de aminoácidos que comprende del 2.º al 269.º residuo de aminoácido de la SEQ

ID NO: 68,

una secuencia de aminoácidos que comprende del 2.º al 269.º residuo de aminoácido de la SEQ

ID NO: 70,

una secuencia de aminoácidos que comprende del 2.º al 269.º residuo de aminoácido de la SEQ

5 ID NO: 72,

una secuencia de aminoácidos que comprende del 2.º al 269.º residuo de aminoácido de la SEQ

ID NO: 74,

una secuencia de aminoácidos que comprende del 2.º al 269.º residuo de aminoácido de la SEQ

ID NO: 76,

10 una secuencia de aminoácidos que comprende del 2.º al 269.º residuo de aminoácido de la SEQ

ID NO: 78,

una secuencia de aminoácidos que comprende del 2.º al 269.º residuo de aminoácido de la SEQ

ID NO: 80,

una secuencia de aminoácidos que comprende del 2.º al 269.º residuo de aminoácido de la SEQ

15 ID NO: 82, o

una secuencia de aminoácidos que comprende del 2.º al 269.º residuo de aminoácido de la SEQ

ID NO: 84.

(19) Un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos contenida en un polinucleótido que se hibrida en condiciones rigurosas con una cadena complementaria de un polinucleótido que incluye una secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos contenida en un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de (14) a (18), y se une a CD3 humana y a CD3 de mono cinomolgo.

(20) Un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una cadena pesada que incluye una secuencia de aminoácidos al menos 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de una cadena pesada contenida en un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de (14) a (18), y una cadena ligera que incluye una secuencia de aminoácidos al menos 70% idéntica a la secuencia de aminoácidos de una cadena ligera contenida en el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de (14) a (18), y se une a CD3 humana y a CD3 de mono cinomolgo.

(21) Un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una cadena pesada que incluye una secuencia de aminoácidos derivada de la sustitución, eliminación o adición de 1 o más aminoácidos de una secuencia de aminoácidos contenida en una cadena pesada contenida en un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de (14) a (18), y una cadena ligera que incluye una secuencia de aminoácidos derivada de la sustitución, eliminación o adición de 1 o más aminoácidos de una secuencia de aminoácidos contenida en una cadena ligera contenida en el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de (14) a (18), y se une a CD3 humana y a CD3 de mono

cinomolgo.

(22) Un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se une al mismo sitio en CD3 humana que el unido por un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de (14) a (18), y se une a CD3 de mono cinomolgo.

(23) Un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno compite con un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de (14) a (18) para unirse a CD3 humana y se une a CD3 de mono cinomolgo.

(24) Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del anticuerpo de acuerdo con (22), en donde el sitio en CD3 humana unido por el anticuerpo está constituido por 7 o más aminoácidos seleccionados de la 55° serina (Ser), el 56° ácido glutámico (Glu), la 58° leucina (Leu), el 59° triptófano (Trp), la 65° asparagina (Asn), la 66° isoleucina (Ile), la 77° serina (Ser), el 78° ácido aspártico (Asp), la 101° arginina (Arg), la 101° glicina (Gly), la 103° serina (Ser), la 104° lisina (Lys) y la 105° prolina (Pro) en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1.

(25) Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de (1) a (17) y (19) a (24), en donde el anticuerpo es IgG.

(26) Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de (1) a (23), en donde el fragmento de unión a antígeno se selecciona a partir de un grupo que consiste en Fab, F(ab)', Fv, scFv y sdAb.

(27) Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de (1) a (17) y (19) a (25), en donde el anticuerpo es un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano que incluye una región constante de inmunoglobulina humana.

(28) Un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de (1) a (27).

(29) Un polinucleótido de acuerdo con (27), en donde el polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos representada por

una secuencia de aminoácidos que comprende del 2.º al 243.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 19,

una secuencia de aminoácidos que comprende del 2.º al 243.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 22,

una secuencia de aminoácidos que comprende del 2.º al 241.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 25,

una secuencia de aminoácidos que comprende del 2.º al 243.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 60,

una secuencia de aminoácidos que comprende del 2.º al 241.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 64,

una secuencia de aminoácidos que comprende del 2.º al 243.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 66,

una secuencia de aminoácidos que comprende del 2.º al 243.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 68,

5 una secuencia de aminoácidos que comprende del 2.º al 243.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 70,

una secuencia de aminoácidos que comprende del 2.º al 243.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 72,

10 una secuencia de aminoácidos que comprende del 2.º al 243.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 74,

una secuencia de aminoácidos que comprende del 2.º al 243.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 76,

una secuencia de aminoácidos que comprende del 2.º al 243.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 78,

15 una secuencia de aminoácidos que comprende del 2.º al 243.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 80,

una secuencia de aminoácidos que comprende del 2.º al 243.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 82,

o

20 una secuencia de aminoácidos que comprende del 2.º al 243.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 84.

(30) Un vector que comprende un polinucleótido de acuerdo con (28) o (29).

(31) Una célula que comprende un polinucleótido de acuerdo con (28) o (29) o un vector de acuerdo con (30), o que produce un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de (1) a (27).

25 (32) Un método para producir un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo que se une a CD3 humana y a CD3 de mono cinomolgo, el método comprende las etapas de: cultivar una célula de acuerdo con (31); y recuperar un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo que se une a CD3 humana de los cultivos.

30 (33) Un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo que se une a CD3 humana y CD3 de mono cinomolgo, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se obtiene mediante un método de acuerdo con (32).

(34) Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de (1) a (27) y (33) como ingrediente activo.

35 (35) Una molécula que tiene actividad de unión a antígeno, que comprende un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de (1) a (27) y (33).

(36) Una molécula de acuerdo con (35), en donde la molécula es multiespecífica.

(37) Una molécula de acuerdo con (35) o (36), que comprende además 1 o 2 o más anticuerpos

adicionales o fragmentos de unión a antígeno de los anticuerpos además del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de (1) a (27) y (33).

(38) Una molécula de acuerdo con (37), en donde el fragmento de unión a antígeno del anticuerpo adicional es Fab, F(ab)', Fv, scFv o sdAb.

5 (39) Una molécula de acuerdo con (38), en donde la molécula comprende Fc.

(40) Una molécula de acuerdo con cualquiera de (37) a (38), en donde el anticuerpo adicional es un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano que comprende una región constante de inmunoglobulina humana.

10 (41) Una molécula de acuerdo con cualquiera de (37) a (38), en donde el anticuerpo adicional o fragmento de unión a antígeno del anticuerpo se une con el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de (1) a (27) y (33) a través de un ligador o sin un ligador.

(42) Una molécula de acuerdo con (41), en donde un extremo carboxilo de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo adicional o fragmento de unión a antígeno del anticuerpo se une con un ligador, y un extremo carboxilo de la secuencia de aminoácidos del ligador se une además con el anticuerpo o
15 fragmento de unión a antígeno del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de (1) a (27) y (33).

(43) Una molécula de acuerdo con (42), en donde la molécula comprende una secuencia de aminoácidos en la que un extremo carboxilo de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo adicional o fragmento de unión a antígeno del anticuerpo se une con un ligador, y un extremo carboxilo de la secuencia de aminoácidos del ligador se une adicionalmente con

20 el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del anticuerpo que comprende del 2.º al 243.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 19,

el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del anticuerpo que comprende del 2.º al 243.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 22, o

25 el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del anticuerpo que comprende del 2.º al 241.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 25.

(44) Una molécula de acuerdo con cualquiera de (35) a (42), que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de (1) a (27) y (33), en donde la región variable comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera en este orden, o una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada en este
30 orden, desde el extremo amino, y opcionalmente: i) tiene un ligador entre ambas regiones variables, ii) tiene un residuo de glicina en el extremo amino de la región variable en el lado del extremo amino, y iii) tiene un ligador, etiqueta FLAG y/o etiqueta HIS en el extremo carboxilo de una región variable en el lado del extremo carboxilo. Las formas aplicables incluyen moléculas biespecíficas de tipo híbrido y de tipo dual.

(45) Una molécula de acuerdo con (44), en donde el anticuerpo adicional o fragmento de unión a
35 antígeno del anticuerpo se une con

el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del anticuerpo que comprende del 2.º al 243.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 19,

el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del anticuerpo que comprende del 2.º al 241.º residuo

- de aminoácido de la SEQ ID NO: 25,
 el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del anticuerpo que comprende del 2.º al 243.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 60,
 el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del anticuerpo que comprende del 2.º al 241.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 64,
 el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del anticuerpo que comprende del 2.º al 243.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 66,
 el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del anticuerpo que comprende del 2.º al 243.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 68,
 el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del anticuerpo que comprende del 2.º al 243.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 70,
 el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del anticuerpo que comprende del 2.º al 243.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 72,
 el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del anticuerpo que comprende del 2.º al 243.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 74,
 el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del anticuerpo que comprende del 2.º al 243.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 76,
 el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del anticuerpo que comprende del 2.º al 243.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 78,
 el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del anticuerpo que comprende del 2.º al 243.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 80,
 el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del anticuerpo que comprende del 2.º al 243.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 82, o
 el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del anticuerpo que comprende del 2.º al 243.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 84. Las formas aplicables incluyen moléculas biespecíficas de tipo híbrido y de tipo dual.
- (46) Una molécula de acuerdo con cualquiera de (36) a (45), en donde el anticuerpo adicional es un anticuerpo blanco contra el cáncer.
- (47) Una molécula de acuerdo con cualquiera de (36) a (46), en donde la molécula es biespecífica.
- (48) Una molécula de acuerdo con cualquiera de (35) a (47), en donde la molécula es un polipéptido.
- (49) Un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de una molécula de acuerdo con (48).
- (50) Un vector que comprende un polinucleótido de acuerdo con (49).
- (51) Una célula que produce un polinucleótido de acuerdo con (49) o un vector de acuerdo con (50), o una molécula de acuerdo con (48).
- (52) Un método para producir una molécula de unión a CD3 humana y a CD3 de mono cinomolgo, el método comprende las etapas de: cultivar una célula de acuerdo con (51); y recuperar una unión de

molécula a CD3 humana de los cultivos.

(53) Una molécula que se une a CD3 humana y CD3 de mono cinomolgo, la molécula se obtiene mediante un método de acuerdo con (52).

5 (54) Una composición farmacéutica que comprende una molécula de acuerdo con cualquiera de (35) a (48) y (53) como ingrediente activo.

(55) Una composición farmacéutica de acuerdo con (54), en donde la composición farmacéutica induce citotoxicidad en células blanco mediante el redireccionamiento de linfocitos T a las células blanco.

Efecto de la invención

10 La presente invención es capaz de obtener un novedoso anticuerpo anti-CD3 o un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo que se une a CD3 humana y se une a CD3 de mono cinomolgo, y una novedosa molécula que tiene actividad de unión a antígeno que incluye el anticuerpo, etc. Además, se obtiene una composición farmacéutica novedosa que incluye dicho anticuerpo, etc. o molécula como ingrediente activo. El anticuerpo, etc. o molécula tiene actividad citotóxica dependiente de linfocitos T y es
15 útil como agente terapéutico o profiláctico para diversas enfermedades tales como cáncer.

Breve descripción de las figuras

[Figura 1] La Figura 1 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de CD3ε humana.

[Figura 2] La Figura 2 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de CD3δ humana.

20 [Figura 3] La Figura 3 es un diagrama que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica el antígeno monocatenario CD3εγ humano.

[Figura 4] La Figura 4 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos del antígeno monocatenario CD3εγ humano.

25 [Figura 5] La Figura 5 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de un cebador homosenrido Nhe-polyC-S para amplificación génica de cadena pesada.

[Figura 6] La Figura 6 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de un primer cebador antisentido rlgY-AS1 para amplificación génica de cadena pesada.

[Figura 7] La Figura 7 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de un segundo cebador antisentido rlgY-AS2 para amplificación génica de cadena pesada.

30 [Figura 8] La Figura 8 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de un cebador homosenrido Nhe-polyC-S2 para amplificación génica de cadena ligera.

[Figura 9] La Figura 9 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de un primer cebador antisentido rlgL-AS1 para amplificación génica de cadena ligera.

35 [Figura 10] La Figura 10 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de un segundo cebador antisentido rlgL-AS2 para amplificación génica de cadena ligera.

[Figura 11] La Figura 11 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de un cebador homosenrido rlgY-seq para la secuenciación de cadena pesada.

[Figura 12] La Figura 12 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de un cebador

antisentido 1 rlgL-seq1 para la secuenciación de cadena ligera.

[Figura 13] La Figura 13 es un diagrama que muestra la secuencia de nucleótidos de un cebador antisentido 2 rlgL-seq2 para la secuenciación de cadena ligera.

5 [Figura 14] La Figura 14 es un diagrama que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de cadena pesada de C3-147.

[Figura 15] La Figura 15 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de C3-147.

[Figura 16] La Figura 16 es un diagrama que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de cadena ligera de C3-147.

10 [Figura 17] La Figura 17 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de C3-147.

[Figura 18] La Figura 18 es un diagrama que muestra la secuencia de oligonucleótidos de una cadena homosentido ligador G4S.

15 [Figura 19] La Figura 19 es un diagrama que muestra la secuencia de oligonucleótidos de una cadena antisentido G4S enlazante.

[Figura 20] La Figura 20 es un diagrama que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica C3E-7000.

[Figura 21] La Figura 21 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos en C3E-7000.

20 [Figura 22] La Figura 22 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de C3E-7034.

[Figura 23] La Figura 23 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de C3E-7034.

[Figura 24] La Figura 24 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de CDR-H1 en C3E-7000.

25 [Figura 25] La Figura 25 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de CDR-H2 en C3E-7000.

[Figura 26] La Figura 26 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de CDR-H3 en C3E-7000.

30 [Figura 27] La Figura 27 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de CDR-L1 en C3E-7000.

[Figura 28] La Figura 28 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de CDR-L2 en C3E-7000.

[Figura 29] La Figura 29 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de CDR-L3 en C3E-7000.

35 [Figura 30] La Figura 30 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de C3E-7035.

[Figura 31] La Figura 31 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de C3E-7035.

[Figura 32] La Figura 32 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la región

variable de cadena ligera de C3E-7036.

[Figura 33] La Figura 33 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de C3E-7036.

[Figura 34] La Figura 34 es un diagrama que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica C3E-7034.

5 [Figura 35] La Figura 35 es un diagrama que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica C3E-7035.

[Figura 36] La Figura 36 es un diagrama que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica C3E-7036.

10 [Figura 37] La Figura 37 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de CD3 γ humana.

[Figura 38] La Figura 38 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de C3E-7034.

[Figura 39] La Figura 39 es un diagrama que muestra la estructura compleja de CD3 $\epsilon\gamma$ y C3E-7034.

[Figura 40] La Figura 40 es un par de diagramas que muestran la interacción entre CD3 $\epsilon\gamma$ y las cadenas pesada y ligera de C3E-7034.

15 La Figura 40A es un diagrama relacionado con la región variable de cadena ligera de C3E-7034 y CD3 ϵ en el que los residuos de aminoácidos de CD3 ϵ dentro de una distancia de 4 angstrom entre sí se indican mediante barras gruesas en el modelo, y los otros aminoácidos se indican mediante barras delgadas en el modelo.

20 La Figura 40B es un diagrama relacionado con la región variable de cadena pesada de C3E-7034 y CD3 ϵ en el que los residuos de aminoácidos de CD3 ϵ dentro de una distancia de 4 angstrom entre sí se indican mediante barras gruesas en el modelo, y los otros aminoácidos se indican mediante barras delgadas en el modelo.

[Figura 41] La Figura 41 es un diagrama que muestra los sitios de interacción de CD3 ϵ humano con las secuencias de las regiones variables de cadena pesada y ligera en C3E-7034.

25 [Figura 42] La Figura 42 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada en OKT3.

[Figura 43] La Figura 43 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada en C3E-3007.

30 [Figura 44] La Figura 44 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera en OKT3.

[Figura 45] La Figura 45 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera en C3E-3007.

[Figura 46] La Figura 46 es un diagrama que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica C3E-3007 scFv.

35 [Figura 47] La Figura 47 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de C3E-3007 scFv.

[Figura 48] La Figura 48 es un diagrama que muestra la actividad de unión de C3E-3007, C3E-7034, C3E-7035 y C3E-7036, que son scFv anti-CD3 humanizados, a CD3 humana (células mononucleares

de sangre periférica, PBMC, por sus siglas en inglés).

[Figura 49] La Figura 49 es un diagrama que muestra la actividad de unión de C3E-3007, C3E-7034, C3E-7035 y C3E-7036, que son scFv anti-CD3 humanizados, a CD3 de mono cinomolgo (PBMC).

5 [Figura 50] La Figura 50A es un diagrama que muestra los efectos de activación de C3E-7034 y C3E-3007, que son scFv anti-CD3 humanizados, en células positivas para CD8 humanas, y la Figura 50B es un diagrama que muestra los efectos de activación de C3E-7034 y C3E-3007, que son scFv anti-CD3 humanizados, en células positivas para CD8 de mono cinomolgo.

[Figura 51] La Figura 51 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de HT1-11 scFv.

10 [Figura 52] La Figura 52 es un diagrama que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica HT1-11 scFv.

[Figura 53] La Figura 53 es un par de diagramas que muestran que el scFv HT1-11 se une a una línea celular positiva para TROP2 humana.

15 La Figura 53A es un diagrama que muestra la unión a la línea celular FaDu de cáncer de células escamosas faríngeas.

La Figura 53B es un diagrama que muestra la unión a la línea celular de cáncer de páncreas HPAF-II.

[Figura 54] La Figura 54 es un diagrama que muestra una secuencia de nucleótidos ORF que codifica T2C-0001.

20 [Figura 55] La Figura 55 es un diagrama que muestra una secuencia de nucleótidos ORF que codifica T2C-0003.

[Figura 56] La Figura 56 es un diagrama que muestra una secuencia de nucleótidos de ORF que codifica T2C-0005.

25 [Figura 57] La Figura 57 es un diagrama que muestra una secuencia de nucleótidos ORF que codifica T2C-0006.

[Figura 58] La Figura 58 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de T2C-0001.

[Figura 59] La Figura 59 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de T2C-0003.

[Figura 60] La Figura 60 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de T2C-0005.

[Figura 61] La Figura 61 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de T2C-0006.

30 [Figura 62] La Figura 62 es un par de diagramas que muestran que las moléculas biespecíficas anti-TROP2-CD3 T2C-0001, T2C-0003, T2C-0005 y T2C-0006 se unen a una línea celular positiva para TROP2.

La Figura 62A es un diagrama que muestra la unión a la línea celular FaDu de cáncer de células escamosas faríngeas.

35 La Figura 62B es un diagrama que muestra la unión a la línea celular de cáncer de páncreas HPAF-II.

[Figura 63] La Figura 63 es un diagrama que muestra la actividad de unión de moléculas biespecíficas anti-TROP2-CD3 T2C-0001, T2C-0003, T2C-0005 y T2C-0006 a CD3 humana (PBMC).

[Figura 64] La Figura 64 es un diagrama que muestra la actividad de unión de moléculas biespecíficas anti-TROP2-CD3 T2C-0001, T2C-0003, T2C-0005 y T2C-0006 a CD3 de mono cinomolgo (PBMC).

[Figura 65]

5 La Figura 65A es un diagrama que muestra TROP2 expresado en FaDu de la línea celular de cáncer de células escamosas de faringe.

La Figura 65B es un diagrama que muestra TROP2 expresado en la línea celular de cáncer de páncreas HPAF-II.

10 La Figura 65C es un diagrama que muestra que TROP2 no se expresa en la línea celular de cáncer de pulmón Calu-6.

[Figura 66]

La Figura 66A es un diagrama que muestra que las moléculas biespecíficas anti-TROP2-CD3 T2C-0001, T2C-0003, T2C-0005 y T2C-0006 tienen actividad citotóxica contra una línea celular FaDu de cáncer de células escamosas faríngeas en presencia de PBMC humanas.

15 La Figura 66B es un diagrama que muestra que las moléculas biespecíficas anti-TROP2-CD3 T2C-0001, T2C-0003, T2C-0005 y T2C-0006 tienen actividad citotóxica contra la línea celular de cáncer de páncreas HPAF-II en presencia de PBMC humanas.

20 La Figura 66C es un diagrama que muestra que las moléculas biespecíficas anti-TROP2-CD3 T2C-0001, T2C-0003, T2C-0005 y T2C-0006 no exhiben actividad citotóxica contra la línea celular de cáncer de pulmón humano Calu-6 en presencia de PBMC humanas.

[Figura 67] La Figura 67 es un diagrama que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica C3E-7078.

[Figura 68] La Figura 68 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de C3E-7078.

25 [Figura 69] La Figura 69 es un diagrama que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica C3E-7079.

[Figura 70] La Figura 70 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de C3E-7079.

[Figura 71] La Figura 71 es un diagrama que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica C3E-7085.

[Figura 72] La Figura 72 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de C3E-7085.

30 [Figura 73] La Figura 73 es un diagrama que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica C3E-7086.

[Figura 74] La Figura 74 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de C3E-7086.

[Figura 75] La Figura 75 es un diagrama que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica C3E-7087.

35 [Figura 76] La Figura 76 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de C3E-7087.

[Figura 77] La Figura 77 es un diagrama que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica C3E-7088.

[Figura 78] La Figura 78 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de C3E-7088.

[Figura 79] La Figura 79 es un diagrama que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica C3E-7089.

[Figura 80] La Figura 80 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de C3E-7089.

[Figura 81] La Figura 81 es un diagrama que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica C3E-7090.

[Figura 82] La Figura 82 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de C3E-7090.

[Figura 83] La Figura 83 es un diagrama que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica C3E-7091.

[Figura 84] La Figura 84 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de C3E-7091.

[Figura 85] La Figura 85 es un diagrama que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica C3E-7092.

[Figura 86] La Figura 86 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de C3E-7092.

[Figura 87] La Figura 87 es un diagrama que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica C3E-7093.

[Figura 88] La Figura 88 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de C3E-7093.

[Figura 89] La Figura 89 es un diagrama que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica C3E-7094.

[Figura 90] La Figura 90 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de C3E-7094.

[Figura 91] La Figura 91 es un diagrama que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica C3E-7095.

[Figura 92] La Figura 92 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de C3E-7095.

[Figura 93] La Figura 93 es un diagrama que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica el cebador HN53R Fw.

[Figura 94] La Figura 94 es un diagrama que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica el cebador HN53R Rv.

[Figura 95] La Figura 95 es un diagrama que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica el cebador HN53S Fw.

[Figura 96] La Figura 96 es un diagrama que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica el cebador HN53S Rv.

[Figura 97] La Figura 97 es un diagrama que muestra una secuencia de nucleótidos ORF que codifica para AXC-0001.

[Figura 98] La Figura 98 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de AXC-0001.

[Figura 99] La Figura 99 es un diagrama que muestra una secuencia de nucleótidos ORF que codifica para AXC-0002.

[Figura 100] La Figura 100 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de AXC-0002.

[Figura 101] La Figura 101 es un diagrama que muestra una secuencia de nucleótidos ORF que codifica MGC-0001.

[Figura 102] La Figura 102 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de MGC-0001.

[Figura 103] La Figura 103 es un diagrama que muestra una secuencia de nucleótidos ORF que codifica MGC-0002.

5 [Figura 104] La Figura 104 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de MGC-0002.

[Figura 105] La Figura 105 muestra una lista de cebadores utilizados en la preparación de variantes de CDR de anticuerpos anti-CD3.

10 [Figura 106-1] La Figura 106-1 es un diagrama que muestra la actividad de unión de variantes de CDR de anticuerpos anti-CD3 a CD3 de mono cinomolgo y humana (PBMC).

[Figura 106-2] La Figura 106-2 es un diagrama que muestra la actividad de unión de variantes de CDR de anticuerpos anti-CD3 a CD3 de mono cinomolgo y humana (PBMC).

15 [Figura 107] La Figura 107 es un diagrama que muestra la expresión de Axl en la línea celular de cáncer de pulmón humano A549 (A), línea celular de cáncer de páncreas humano PANC-1 (B), línea celular de cáncer de páncreas humano MIA PaCa-2 (C), línea celular de mieloma humano U266B1 (D) y línea celular de linfoma de células del manto Jeko-1 (E).

20 [Figura 108] Cada una de las Figuras 108A, 108B y 108C es un diagrama que muestra que las moléculas biespecíficas anti-Axl CD3 AXC-0001 y AXC-0002 tienen actividad citotóxica contra líneas celulares que expresan Axl en presencia de PBMC humanas. Cada una de las Figuras 108D y 108E es un diagrama que muestra que las moléculas biespecíficas anti-Axl CD3 AXC-0001 y AXC-0002 no tienen actividad citotóxica contra líneas celulares que no expresan Axl en presencia de PBMC humanas.

[Figura 109] La Figura 109 es un diagrama que muestra la actividad de unión de MAG-032 scFv en células T2 de la línea celular de fusión de linfoblastos humanos complementadas con péptido MAGEC1 (A) o DMSO (B).

25 [Figura 110]

La Figura 110A es un diagrama que muestra que las moléculas biespecíficas anti-HLA-A2/MAGEC1-CD3 MGC-0001 y MGC-0002 tienen actividad citotóxica contra células T2 complementadas con el péptido MAGEC1 en presencia de PBMC humanas.

30 La Figura 110B es un diagrama que muestra que las moléculas biespecíficas anti-HLA-A2/MAGEC1-CD3 MGC-0001 y MGC-0002 no tienen actividad citotóxica contra T2 complementada con DMSO en presencia de PBMC humanas.

[Figura 111] La Figura 111 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos del péptido MAGEC1.

35 [Figura 112] La Figura 112 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos en la región CDRH2 de una variante de CDR. El primer Xaa y el segundo Xaa representan cada uno un residuo de aminoácido arbitrario de origen natural.

[Figura 113] La Figura 113 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos en la región CDRL2 de una variante de CDR. Xaa representa un residuo de aminoácido natural arbitrario.

[Figura 114] La Figura 114 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de una variante de CDR de C3E-7034. El primer Xaa y el segundo Xaa representan cada uno un residuo de aminoácido arbitrario de origen natural.

[Figura 115] La Figura 115 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos en la región variable de la cadena ligera de una variante de CDR de C3E-7034. Xaa representa un residuo de aminoácido natural arbitrario.

[Figura 116] La Figura 116 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos en la región variable de la cadena ligera de una variante de CDR de C3E-7035. Xaa representa un residuo de aminoácido natural arbitrario.

[Figura 117] La Figura 117 es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos en la región variable de la cadena ligera de una variante de CDR de C3E-7036. Xaa representa un residuo de aminoácido natural arbitrario.

Modalidades de la invención

1. Definiciones

En la presente invención, el término "gen" significa un nucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para los aminoácidos de una proteína o su cadena complementaria. Se pretende que "gen" incluya, por ejemplo, un polinucleótido, un oligonucleótido, ADN, ARNm, ADNc y ARNc a manera del nucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para los aminoácidos de una proteína o su cadena complementaria. Dicho gen es un nucleótido monocatenario, bicatenario, cadena triple u otro nucleótido multcatenario. "Gen" también pretende incluir un agregado de cadenas de ADN y ARN, una mezcla de ribonucleótidos (ARN) y desoxirribonucleótidos (ADN) en una cadena de nucleótidos y un nucleótido de cadena doble, de cadena triple u otro de cadena múltiple que comprende dicha cadena de nucleótidos. En la presente invención, los términos "secuencia de bases" y "secuencia de nucleótidos" tienen el mismo significado.

En la presente invención, el término "polinucleótido" tiene el mismo significado que "ácido nucleico" y "molécula de ácido nucleico" y también pretende incluir, por ejemplo, cualquier ADN, ARN, sonda, oligonucleótido y cebador. Dicho polinucleótido es un polinucleótido monocatenario, de cadena doble, de cadena triple u otro polinucleótido de cadena múltiple. El "polinucleótido" también pretende incluir un agregado de cadenas de ADN y ARN, una mezcla de ribonucleótidos (ARN) y desoxirribonucleótidos (ADN) en una cadena de polinucleótidos y un agregado de dos cadenas o tres o más cadenas que comprenden dicha cadena de polinucleótidos.

En la presente invención, los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" tienen el mismo significado.

En la presente invención, el término "antígeno" a veces se utiliza para significar "inmunógeno".

En la presente invención, el término "célula" también incluye, por ejemplo, cualquier célula derivada de animales individuales, células subcultivadas, células cultivadas primarias, líneas celulares, células recombinantes y células microbianas.

En la presente invención, el término "anticuerpo" tiene el mismo significado que inmunoglobulina. Sin embargo, el "anticuerpo" utilizado para el anticuerpo anti-CD3 de la presente invención significa una inmunoglobulina que tiene regiones constantes y variables. El anticuerpo no está particularmente limitado y puede ser una inmunoglobulina natural o puede ser una inmunoglobulina producida por síntesis parcial o completa. El anticuerpo anti-CD3 de la presente invención se incluye en la "molécula" que se describe a continuación.

La estructura básica de un anticuerpo cuaternario está constituida por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada mediante un enlace disulfuro covalente. Las dos cadenas pesadas están unidas entre sí por uno o más enlaces disulfuro dependiendo de los isotipos de las cadenas pesadas. Cada una de las cadenas ligera y pesada tiene enlaces disulfuro intracatenarios separados regularmente. Cada una de las cadenas pesada y ligera contiene una región constante que exhibe un grado muy alto de similitud de secuencia de aminoácidos y una región variable que exhibe un grado bajo de similitud de secuencia de aminoácidos. La cadena ligera tiene una región variable (VL) en el extremo amino seguido de una región constante (CL). La cadena pesada tiene una región variable (VH) en el extremo amino seguido de tres regiones constantes (CH1, CH2 y CH3). VL y VH están emparejados, y CL está alineado con la primera región constante (CH1) de la cadena pesada. VL y VH se emparejan para formar un único sitio de unión a antígeno.

Las regiones constantes del anticuerpo de la presente invención no están particularmente limitadas. Preferentemente, las regiones constantes derivadas de un anticuerpo humano se utilizan en un anticuerpo de la presente invención para el tratamiento o prevención de enfermedades en humanos. Los ejemplos de las regiones constantes de cadena pesada en el anticuerpo humano incluyen Cy1, Cy2, Cy3, Cy4, Cμ, Cδ, Cα1, Cα2 y Cε. Los ejemplos de regiones constantes de cadena ligera en el anticuerpo humano incluyen Cκ y Cλ.

Fab está compuesto por CH1 de cadena pesada seguida de VH, y CL de cadena ligera seguida de VL. Cada VH y VL contiene regiones determinantes de complementariedad (CDR).

Fc está constituido por las regiones del extremo carboxilo de las regiones constantes de cadena pesada y es un dímero que contiene CH2 y CH3. El Fc de la presente invención puede ser Fc que tiene una secuencia natural o puede ser una forma mutada de Fc que contiene una mutación en la secuencia natural.

La región variable se compone de regiones, llamadas regiones hipervariables (HVR), con variabilidad extrema, y regiones relativamente invariables, llamadas regiones marco (FR), interrumpidas por regiones hipervariables. Las regiones variables naturales de cadena pesada y ligera contienen cada una cuatro FR conectadas por tres regiones hipervariables. Las regiones hipervariables de cada cadena se mantienen en estrecha proximidad junto con las regiones hipervariables de otra cadena mediante FR y contribuyen a la formación de un sitio de unión a antígeno en el anticuerpo.

Cada una de las cadenas pesada y ligera de una molécula de anticuerpo tiene tres regiones determinantes de complementariedad (CDR). Las regiones determinantes de complementariedad también se denominan dominios hipervariables. Estas regiones se encuentran en las regiones variables de las

cadenas pesada y ligera del anticuerpo. Estos sitios tienen una estructura primaria particularmente muy variable y generalmente se separan en tres posiciones en las respectivas estructuras primarias de cadenas de polipéptidos de cadena pesada y ligera. En la presente invención, las regiones determinantes de complementariedad del anticuerpo se denominan CDRH1, CDRH2 y CDRH3 del extremo amino de la
 5 secuencia de aminoácidos de cadena pesada para las regiones determinantes de complementariedad de la cadena pesada y como CDRL1, CDRL2 y CDRL3 del extremo amino de la secuencia de aminoácidos de cadena ligera para las regiones determinantes de complementariedad de la cadena ligera. Estos sitios están cercanos entre sí en la estructura tridimensional y determinan la especificidad para que el antígeno se una.

10 En la presente invención, las posiciones y longitudes de las CDR se determinaron de acuerdo con las definiciones de IMGT (Developmental and Comparative Immunology 27 (2003) 55-77).

Las regiones marco (FR) son regiones variables, excepto los residuos de CDR. Cada región variable generalmente tiene cuatro FR, a saber, FR1, FR2, FR3 y FR4.

15 Las posiciones de CDR y FR también se pueden determinar de acuerdo con otras definiciones conocidas en la materia, por ejemplo, definiciones de IMGT, así como Kabat, Chothia, AbM y definiciones de contacto.

20 En la presente invención, el término "fragmento de unión a antígeno del anticuerpo" significa un fragmento de anticuerpo parcial que tiene regiones variables de cadena pesada y ligera y tiene actividad de unión a un antígeno. Los ejemplos de los "fragmentos de unión a antígeno en el anticuerpo" incluyen, de modo no limitante, fragmentos de unión a antígeno tales como Fab, F(ab')₂, scFv, Fab', Fv y anticuerpos de dominio único (sdAb). Dicho fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo puede obtenerse mediante el tratamiento de una molécula de longitud completa de una proteína de anticuerpo con una enzima tal como papaína o pepsina, o puede ser una proteína recombinante producida en una célula hospedera adecuada usando un gen recombinante.

25 En la presente invención, el "sitio" al que se une un anticuerpo, es decir, el "sitio" reconocido por un anticuerpo, significa un péptido parcial o estructura parcial de orden superior en un antígeno que se une o reconoce por el anticuerpo.

En la presente invención, dicho sitio también se denomina epítipo o sitio de unión a anticuerpos.

30 En la presente invención, el término "mutante de anticuerpo" significa un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo original mediante sustitución, eliminación y/o adición ("adición" incluye inserción) (en lo sucesivo, denominada colectivamente "mutación") de aminoácidos y se une a la CD3 de la presente invención. La cantidad de aminoácidos mutados en dicho mutante de anticuerpo es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 40 o 50. Dicho mutante de anticuerpo puede ser "anticuerpo" de la presente invención.

35 En la presente invención, el término "más" en "1 o más" se refiere a un número de 2 a 10.

En la presente memoria descriptiva, el término "molécula" es una molécula que comprende el anticuerpo anteriormente mencionado o fragmento de unión a antígeno del anticuerpo y también incluye moléculas multiespecíficas formadas por anticuerpos o múltiples fragmentos de unión a antígeno derivados

de estos.

En la presente memoria descriptiva, el término "molécula que es multiespecífica" tiene el mismo significado que una "molécula multiespecífica". Dicha molécula multiespecífica no está particularmente limitada siempre que la molécula sea capaz de unirse a una pluralidad de epítomos diferentes entre sí en una molécula y/o epítomos diferentes entre sí en dos o más moléculas. Una molécula que es multiespecífica también incluye un anticuerpo que comprende regiones variables de cadena pesada (VH) y variables de cadena ligera (VL). Los ejemplos de dichas moléculas multiespecíficas incluyen, de modo no limitante, una molécula de anticuerpo de longitud completa que tiene dos o más tipos de cadenas pesadas y dos o más tipos de cadenas ligeras, es decir, una molécula multiespecífica de tipo IgG, y una molécula que consiste en dos o más tipos de fragmentos de unión a antígeno que tienen VL y VH, es decir, una molécula derivada por una combinación de Fab, Fab', Fv, scFv, sdAb, etc. (es decir, scFv en tándem, diacuerpos, diacuerpos monocatenario y triacuerpos). Además, también se incluye una molécula formada mediante la unión genética o química de una proteína que tiene actividad de unión a antígeno sin un esqueleto de inmunoglobulina, a un fragmento de unión a antígeno en la molécula multiespecífica.

Los ejemplos de actividades o propiedades realizadas por un anticuerpo anti-CD3 de la presente invención, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de la presente invención o una molécula multiespecífica de la presente invención pueden incluir actividades biológicas o propiedades fisicoquímicas y pueden incluir específicamente diversas actividades biológicas, actividad de unión contra un antígeno o un epítomo, estabilidad durante la producción o almacenamiento, y estabilidad térmica.

En la presente invención, la frase "hibridación en condiciones rigurosas" significa hibridación en condiciones que implican hibridación a 65 °C en una solución que contiene 5 x SSC, seguido de lavado a 65 °C durante 20 minutos en una solución acuosa que contiene 2 x SSC-0.1% de SDS, a 65 °C durante 20 minutos en una solución acuosa que contiene 0.5 x SSC-0.1% de SDS, y a 65 °C durante 20 minutos en una solución acuosa que contiene 0.2 x SSC-0.1% de SDS, o hibridación en condiciones equivalentes. SSC significa una solución acuosa de NaCl 150 mM-citrato de sodio 15 mM, y n x SSC significa SSC con n veces la concentración.

En la presente invención, el término "citotoxicidad" se refiere a algún cambio patológico producido en las células y significa no solo trauma directo sino cualquier daño estructural o funcional a las células, incluyendo escisión de ADN, formación de dímeros de base, roturas cromosómicas, daño al aparato mitótico y reducciones en las actividades de diversas enzimas.

En la presente invención, el término "actividad citotóxica" significa actividad que causa la citotoxicidad mencionada anteriormente.

En la presente invención, el término "actividad de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC)" significa el efecto o actividad de dañar células blanco tales como células tumorales mediante células NK a través de anticuerpos.

En la presente invención, el término "actividad citotóxica mediante el redireccionamiento de linfocitos T" significa que la citotoxicidad es causada por una molécula multiespecífica que comprende un anticuerpo antigénico antitumoral y un anticuerpo anti-CD3. Específicamente, el término significa que el

anticuerpo antigénico antitumoral se une a una célula tumoral blanco mientras que el anticuerpo anti-CD3 se une a una célula T para que la célula tumoral blanco y la célula T se acerquen entre sí para inducir citotoxicidad mediada por activación de linfocitos T. La molécula puede estar contenida en una composición farmacéutica.

5

2. Proteína antigénica CD3 (complejo CD3)

En la presente invención, el término "CD3" tiene el mismo significado que la proteína CD3.

CD3 se expresa, como una parte de un complejo de receptores de linfocitos T multimoleculares, en linfocitos T y es un complejo de 5 tipos de cadenas de polipéptidos (γ , δ , ϵ , λ y η) (con pesos moleculares de 25000 a 28000, 21000, 20000, 16000 y 22000, respectivamente).

10

La CD3 utilizada en la presente invención se puede preparar mediante purificación o aislamiento de tejidos animales (que incluyen fluidos corporales), células derivadas de tejidos o cultivos de células, recombinación génica, traducción *in vitro*, síntesis química, etc.

La secuencia de nucleótidos de un ADNc que codifica CD3 ϵ humana se registra en GenBank con el núm. de acceso NM_000733.3. La secuencia de nucleótidos de un ADNc que codifica CD3 de mono cinomolgo se registra en GenBank con el núm. de acceso NM_001283615.1. La secuencia de aminoácidos de CD3 ϵ humana se describe en la SEQ ID NO: 1 del listado de secuencias.

15

El ADNc de CD3 ϵ se puede obtener utilizando, por ejemplo, el denominado método de PCR en el que se realiza una reacción en cadena de polimerasa (en lo sucesivo, denominada "PCR") (Saiki, R.K., et al., Science (1988) 239, 487-489) utilizando una biblioteca de ADNc de órganos que expresan ARNm de CD3 ϵ como plantilla y utilizando cebadores capaces de amplificar específicamente el ADNc de CD3 ϵ .

20

Una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos derivada de los aminoácidos de CD3 mediante la sustitución, eliminación o adición de 1 o más aminoácidos y tiene actividades biológicas equivalentes a CD3 también se incluye en la secuencia de nucleótidos del gen CD3. Una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos de CD3 mediante la sustitución, eliminación o adición de 1 o más aminoácidos y tiene actividades biológicas equivalentes a CD3 también se incluye en CD3.

25

Un polinucleótido hibridado en condiciones rigurosas a un polinucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos que codifica CD3 ϵ de mono cinomolgo o humana, y que codifica una proteína que tiene actividades biológicas equivalentes a CD3 ϵ también se incluye en el ADNc de CD3 ϵ . Además, las variantes de empalme transcritas de *loci* génicos CD3 ϵ de mono cinomolgo o humana, o polinucleótidos hibridados a estos en condiciones rigurosas y que codifican una proteína que tiene actividades biológicas equivalentes a CD3 ϵ también se incluyen en el ADNc de CD3 ϵ .

30

35

3. Anticuerpo anti-CD3

(3-1) Clasificación de anticuerpos

Un anticuerpo anti-CD3 de la presente invención y un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo

(en lo sucesivo, también denominado anticuerpo, etc. de la presente invención) puede ser un anticuerpo monoclonal o policlonal. Los ejemplos de anticuerpos monoclonales de la presente invención incluyen anticuerpos derivados de animales no humanos (anticuerpos de animales no humanos), anticuerpos humanos, anticuerpos quiméricos y anticuerpos humanizados.

5 Los ejemplos de anticuerpos de animales no humanos incluyen anticuerpos derivados de vertebrados tales como mamíferos y aves. Los ejemplos de anticuerpos derivados de mamíferos incluyen anticuerpos derivados de roedores tales como anticuerpos de ratón y anticuerpos de rata. Los ejemplos de anticuerpos derivados de aves incluyen anticuerpos de pollo. Un ejemplo de un anticuerpo monoclonal de rata anti-CD3 humana es C3-147 [Ejemplo 1) -7] de la presente invención.

10 Los ejemplos de anticuerpos quiméricos incluyen, de modo no limitante, anticuerpos que comprenden regiones variables derivadas de anticuerpos de animales no humanos unidas a regiones constantes de anticuerpos humanos (inmunoglobulina humana).

Los ejemplos de anticuerpos humanizados pueden incluir, de modo no limitante, anticuerpos humanos (regiones variables de inmunoglobulina humana) injertados en CDR en regiones variables de anticuerpos de animales no humanos, un anticuerpo humano injertado en CDR así como secuencias parciales de regiones marco en anticuerpos de animales no humanos y anticuerpos que tienen aminoácidos de anticuerpos humanos sustituidos por uno o más aminoácidos derivados de anticuerpos de animales no humanos en cualquiera de estos anticuerpos humanizados. Los ejemplos de CDR en regiones variables de anticuerpos de animales no humanos incluyen CDRH1 a CDRH3 en la región variable de cadena pesada y CDRL1 a CDRL3 en la región variable de cadena ligera derivada del anticuerpo de rata anti-CD3 C3E-7000 de la presente invención, y CDR derivadas de las secuencias de aminoácidos de estas CDR por sustitución de 1 o 2 aminoácidos por diferentes aminoácidos.

El anticuerpo humano no está particularmente limitado siempre y cuando el anticuerpo se una preferentemente a CD3 humana y más preferentemente se una a CD3 humana y a CD3 de mono cinomolgo. Los ejemplos también incluyen anticuerpos humanos que se unen al mismo sitio que en los anticuerpos humanizados de la presente invención. Los ejemplos incluyen anticuerpos humanos que se unen al mismo sitio que C3E-7034.

Preferentemente, el anticuerpo, etc. de la presente invención se une a CD3 humana. Más preferentemente, el anticuerpo, etc. de la presente invención también tiene actividad de unión a CD3 de mono cinomolgo.

El anticuerpo, etc. de la presente invención puede comprender partes derivadas de múltiples anticuerpos diferentes siempre que el anticuerpo se una a CD3 humana y también se una a CD3 de mono cinomolgo. Los ejemplos de estos anticuerpos incluyen anticuerpos que comprenden cadenas pesadas y/o ligeras intercambiadas entre múltiples anticuerpos diferentes, anticuerpos que comprenden cadenas pesadas y/o ligeras de longitud completa intercambiadas entre sí, anticuerpos que comprenden regiones variables o constantes intercambiadas entre sí y anticuerpos que comprenden todas o algunas CDR intercambiadas entre sí. Las regiones variables de cadena pesada y ligera de un anticuerpo quimérico pueden derivar de diferentes anticuerpos de la presente invención. CDRH1 a CDRH3 y CDRL1 a CDRL3

en las regiones variables de cadena pesada y ligera del anticuerpo humanizado pueden derivar de dos o más anticuerpos diferentes de la presente invención. CDRH1 a CDRH3 y CDRL1 a CDRL3 en las regiones variables de cadena pesada y ligera del anticuerpo humano pueden ser una combinación de CDR portadas por dos o más anticuerpos diferentes de la presente invención.

5 Los ejemplos del isotipo del anticuerpo monoclonal de la presente invención pueden incluir, de modo no limitante, IgG tales como IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, IgM, IgA tales como IgA1 e IgA2, IgD e IgE.

El isotipo y subclase del anticuerpo monoclonal se pueden determinar usando, por ejemplo, una prueba de Ouchterlony, un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) o un radioinmunoensayo (RIA). Se puede utilizar un kit comercialmente disponible para la identificación (por ejemplo, kit ELISA de isotipificación de inmunoglobulina de rata (BD Pharmingen)).

(3-2) Especificidad de unión del anticuerpo anti-CD3

El anticuerpo, etc. de la presente invención reconoce CD3. En otras palabras, el anticuerpo, etc. de la presente invención se une a CD3. El anticuerpo, etc. de la presente invención preferentemente se une a CD3 humana y a CD3 de mono, y más preferentemente se une a CD3 humana y a CD3 de mono cinomolgo.

Más específicamente, el anticuerpo de la presente invención y el fragmento de unión a antígeno del mismo, y sus regiones variables, se unen a un dominio similar a Ig presente en la región extracelular de la cadena ϵ (Figura 1, SEQ ID NO: 1) del complejo CD3 humano. Además, estos también se unen a un dominio similar a Ig presente en la región extracelular de la cadena ϵ del complejo CD3 de mono cinomolgo.

Epítomos presentes en la región extracelular de la cadena ϵ (Figura 1, SEQ ID NO: 1) del complejo CD3 humano unido por el anticuerpo, etc. de la presente invención contienen los siguientes aminoácidos:

Ser55, Glu56, Leu58, Trp59, Asn65, Ile66, Ser77, Asp78, Arg101, Gly102, Ser103, Lys104 y Pro105.

25 Preferentemente, el anticuerpo, etc. de la presente invención puede mantener la unión a CD3 humana mediante la unión a una región epítipo que contiene al menos 7 aminoácidos seleccionados de estos 13 aminoácidos.

Cuando un anticuerpo se encuentra adyacente a estos aminoácidos a una distancia de 4 angstrom, se puede confirmar que dicho anticuerpo tiene la misma especificidad de epítipo que la del anticuerpo, etc. de la presente invención. Por otro lado, entre los aminoácidos de epítipo Arg101, Gly102, Ser103, Lys104 y Pro105 están presentes residuos de epítipo que interactúan con el anticuerpo anti-CD3 OKT3 o UCHT1 como se conoce en la materia (Lars Kjer-Nielsen et al., PNAS (2004); y Kelly L Arnett et al., PNAS (2004)). Sin embargo, OKT3 o UCHT1 se une a CD3 humana, pero no se une a CD3 de mono cinomolgo.

En la presente invención, "reconocimiento", es decir, "unión", significa unión que no es adsorción no específica. Ejemplos de criterios para determinar si se logra o no el reconocimiento, es decir, se logra o no la unión, pueden incluir una constante de disociación (en lo sucesivo, denominada "KD"). Preferentemente, el anticuerpo, etc. de la presente invención tiene un valor de KD de 1×10^{-5} M o menor, 5×10^{-6} M o menor, 2×10^{-6} M o menor, o 1×10^{-6} M o menor para CD3.

En la presente invención, la unión del anticuerpo al antígeno se puede analizar o determinar usando un sistema de análisis de interacción biomolecular (por ejemplo, SPR o BLI), ELISA o RIA. La unión del anticuerpo al antígeno expresado en una superficie celular se puede evaluar mediante citometría de flujo.

El método SPR (análisis de resonancia de plasmones superficiales) se utiliza como un enfoque analítico para determinar una constante de disociación (valor KD), etc. como un índice de afinidad mediante la medición de la constante de velocidad de asociación (valor ka) y la constante de velocidad de disociación (valor kd) mediante análisis cinético. Los ejemplos de equipos utilizados en el análisis de SPR incluyen BIAcore(TM) (fabricado por GE Healthcare), ProteOn(TM) (fabricado por Bio-Rad Laboratories), SPR-Navi(TM) (fabricado por BioNavis), Spreeta(TM) (fabricado por Texas Instruments Inc.), SPRi-PlexII (TM) (fabricado por Horiba, Ltd.) y Autolab SPR (TM) (fabricado por Metrohm).

BLI (interferometría de biocapa) es un método que implica medir las interacciones biomoleculares utilizando interferencia de biocapa. Ejemplos de equipos utilizados en el análisis de interacción BLI incluyen el sistema Octet (fabricado por Pall ForteBio Corp.).

ELISA es un método que implica capturar un antígeno o un anticuerpo de interés contenido en una solución de muestra usando un anticuerpo o antígeno específico, mientras se detecta y cuantifica el antígeno o anticuerpo de interés a través del uso de reacción enzimática. Se incorpora un antígeno o anticuerpo marcado con enzimas en el sistema de reacción y se detecta la actividad enzimática. Para la detección de actividad enzimática, se utiliza un sustrato cuyo espectro de absorción es cambiado por la reacción, y el espectro de absorción es digitalizado por cuantificación de absorbancia.

El ELISA en células es un método que consiste en capturar un analito en la superficie celular de cada célula, mientras se detecta y cuantifica el analito mediante el uso de una reacción enzimática.

RIA (radioinmunoensayo) puede cuantificar un anticuerpo marcando el anticuerpo con un material radiactivo y midiendo la radiactividad del anticuerpo.

La citometría de flujo es un enfoque utilizado para analizar ópticamente células individuales mediante la dispersión de células finas en un fluido y la transmisión de una corriente delgada del fluido. Un anticuerpo marcado con colorante fluorescente se une a la superficie celular de un antígeno a través de una reacción antígeno-anticuerpo, y la cantidad de células unidas al anticuerpo se mide usando intensidad de fluorescencia que indica la actividad de unión a antígeno del anticuerpo.

Como se mencionó anteriormente, un anticuerpo, etc. que se une a CD3 humana y a CD3 de mono cinomolgo puede someterse a diversas pruebas de eficacia o seguridad usando primates, particularmente monos cinomolgos, que es esencial para el desarrollo no clínico (desarrollo preclínico) de productos farmacéuticos y por lo tanto preferido. Además, un anticuerpo, etc. que se une a CD3 humana y a CD3 de mono cinomolgo tiene actividad citotóxica y es útil, ya sea solo o como molécula de la presente invención, en el tratamiento o prevención de enfermedades tales como cánceres en humanos y monos cinomolgos. Las composiciones farmacéuticas se describen a continuación.

Un anticuerpo, etc. de la presente invención que se une a CD3 humana y a CD3 de mono cinomolgo no se une a CD3 de ratón. Por lo tanto, se pueden llevar a cabo diversos ensayos o pruebas inmunohistoquímicas utilizando células, tejidos o individuos de ratón transfectados por el gen CD3 humana

(que incluyen animales transgénicos, animales inactivados y animales inactivados) y el anticuerpo, etc., sin la influencia de CD3 de los ratones hospederos. Por lo tanto, el anticuerpo, etc., se prefiere para su uso en investigación y desarrollo no clínico de fármacos en ratones, fármacos en animales y fármacos de diagnóstico que comprenden el anticuerpo, etc.

5

(3-3) Anticuerpos monoclonales

La presente invención proporciona anticuerpos monoclonales. Estos anticuerpos monoclonales incluyen, por ejemplo, anticuerpos monoclonales derivados de animales no humanos tales como anticuerpos de rata, ratón, conejo, pollo y pez, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, fragmentos de unión a antígeno de estos, mutantes de anticuerpo de estos anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno y variantes de estos anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno.

Por ejemplo, C3-147 obtenido mediante el método descrito en el Ejemplo 1 es un anticuerpo monoclonal de rata anti-CD3.

La secuencia de nucleótidos de un ADN que codifica la región variable de cadena pesada de C3-147 se describe en la SEQ ID NO: 6 (Figura 14) del listado de secuencias, y su secuencia de aminoácidos se describe en la SEQ ID NO: 7 (Figura 15). La secuencia de nucleótidos de un ADN que codifica la región variable de cadena ligera de C3-147 se describe en la SEQ ID NO: 8 (Figura 16) del listado de secuencias, y su secuencia de aminoácidos se describe en la SEQ ID NO: 9 (Figura 17).

El mutante de anticuerpo de la presente invención preferentemente puede presentar, por ejemplo, sensibilidad reducida a la degradación u oxidación de proteínas, actividades o funciones biológicas mejoradas o mantenidas, reducción suprimida o deterioro de dichas actividades o funciones biológicas, una capacidad mejorada para unirse a antígenos o propiedades fisicoquímicas o funcionales impartidas a estos. Se sabe comúnmente que una cadena lateral de un aminoácido específico en una proteína puede alterarse, alterando así una actividad o función de la proteína. Los ejemplos de dichas alteraciones incluyen desamidación de una cadena lateral de aspartato e isomerización de una cadena lateral de aspartato. Los mutantes de anticuerpo de la presente invención incluyen aquellos en los que uno o más aminoácidos están sustituidos con otros aminoácidos para evitar dichas alteraciones.

Los ejemplos de estos mutantes de anticuerpo de la presente invención incluyen anticuerpos que tienen una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo original mediante sustitución conservadora de aminoácidos. La sustitución conservadora de aminoácidos es la sustitución que ocurre en un grupo de aminoácidos relacionado con las cadenas laterales de aminoácidos.

Los grupos de aminoácidos preferidos son los siguientes: un grupo ácido que incluye ácido aspártico y ácido glutámico; un grupo básico que incluye lisina, arginina e histidina; un grupo no polar que incluye alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina y triptófano; y una familia polar sin carga que incluye glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina y tirosina. Otros grupos de aminoácidos preferidos son los siguientes: un grupo hidroxil alifático que incluye serina y treonina; un grupo que contiene amida que incluye asparagina y glutamina; un grupo alifático que incluye alanina, valina,

leucina e isoleucina; y un grupo aromático que incluye fenilalanina, triptófano y tirosina. La sustitución de aminoácidos en un mutante de anticuerpo se realiza preferentemente sin reducir la actividad de unión a antígeno del anticuerpo original.

La presente invención también comprende un mutante de anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos, que deriva de la secuencia de aminoácidos compuesta por un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con (1) mencionado anteriormente, por ejemplo, C3-147, en la que se produce (o se realiza) una sustitución conservadora de aminoácidos y/o alguna otra mutación de aminoácidos; un anticuerpo de ratón, un anticuerpo de rata, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano compuesto por CDR que tiene una secuencia de aminoácidos en la que se produce (o se realiza) una mutación conservadora de aminoácidos y/o alguna otra mutación de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de CDRH1 a CDRH3 y CDRL1 a CDRL3 derivada de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con (1) mencionado anteriormente, por ejemplo, C3-147; un fragmento de unión a antígeno de cualquiera de estos mutantes de anticuerpo y anticuerpos mutados; y una molécula que comprende dicho mutante de anticuerpo, anticuerpos mutados o fragmento de unión a antígeno de estos.

(3-4) Fragmento de unión a antígeno de anticuerpo anti-CD3

De acuerdo con un aspecto, la presente invención proporciona un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo anti-CD3 de la presente invención. Un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo significa un fragmento que mantiene al menos actividad de unión a antígeno entre las funciones del anticuerpo, o una variante de este. Los ejemplos de funciones del anticuerpo generalmente incluyen actividad de unión a antígeno, actividad reguladora de la actividad del antígeno, actividad citotóxica celular dependiente del anticuerpo y actividad citotóxica dependiente del complemento. Los ejemplos de funciones de un anticuerpo, etc. de la presente invención y una molécula multiespecífica que comprende el anticuerpo, etc. de la presente invención incluyen el redireccionamiento de linfocitos T, la activación de linfocitos T y la actividad citotóxica contra células cancerosas mediante la activación de linfocitos T.

El fragmento de unión a antígeno del anticuerpo no está particularmente limitado siempre y cuando el fragmento del anticuerpo mantenga al menos actividad de unión a antígeno entre las actividades del anticuerpo. Los ejemplos incluyen, de modo no limitante, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fv monocatenario (scFv) que comprende Fv de cadena pesada y ligera unidos mediante un ligador adecuado y anticuerpo de dominio único (sdAb). El fragmento de unión a antígeno del anticuerpo de la presente invención también pretende incluir una molécula que comprende el fragmento de unión a antígeno del anticuerpo de la presente invención, así como otras partes, tales como scFv que retiene una parte enlazante.

Una molécula que deriva de una proteína de anticuerpo mediante la eliminación de 1 o más aminoácidos en su extremo amino y/o extremo carboxilo y retiene al menos una parte de las funciones del anticuerpo también está comprendida en el significado del fragmento de unión a antígeno del anticuerpo. Dicha variante de un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo también está comprendida por el anticuerpo de la presente invención o fragmento de unión a antígeno del mismo, o una variante (descrita

más adelante) del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno.

De acuerdo con un aspecto, el fragmento de unión a antígeno del anticuerpo de la presente invención es scFv. El scFv se obtiene mediante la unión de las regiones variables de cadena pesada y ligera del anticuerpo mediante un ligador polipeptídico (Pluckthun A., *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies* 113, Rosenberg and Moore, ed., Springer Verlag, Nueva York, 269-315 (1994); y Nature Biotechnology (2005), 23, 1126-1136). Además, el scFv en tándem que comprende dos scFv unidos mediante un ligador polipeptídico se puede utilizar como una molécula biespecífica. Alternativamente, se pueden utilizar triacuerpos y tales que comprenden tres o más scFv como una molécula multiespecífica.

El anticuerpo de la presente invención puede ser un anticuerpo que tiene una única región variable de cadena pesada y no tiene secuencia de cadena ligera. Se ha informado que dicho anticuerpo, llamado anticuerpo de dominio único (sdAb) o un nanocuerpo, retiene la capacidad de unirse a un antígeno (Muyldemans S. et al., *Protein Eng.*, (1994), 7 (9), 1129-35; y Hamers-Casterman C. et al., *Nature* (1993), 363 (6428), 446-448). Estos anticuerpos también están comprendidos en el significado de un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de acuerdo con la presente invención.

La presente invención también incluye una inmunoglobulina monocatenaria que comprende secuencias de cadena pesada y ligera de longitud completa del anticuerpo unidas mediante un ligador adecuado (Lee, H-S, et al., *Molecular Immunology* (1999) 36, 61-71; y Shirmann, T. et al., *mAbs* (2010), 2 (1), 1-4). Dicha inmunoglobulina monocatenaria se puede dimerizar para retener una estructura y actividades similares a las del anticuerpo, que originalmente es un tetrámero.

(3-5) Moléculas que tienen actividad de unión a antígeno

La molécula de la presente invención comprende el anticuerpo anti-CD3 de la presente invención o fragmento de unión a antígeno del mismo.

La molécula de la presente invención puede comprender además, por ejemplo, una secuencia señal, una etiqueta para purificación, Gly de extremo amino, una parte ligadora de fármaco de ADC, un polipéptido de unión a albúmina, un polímero tal como PEG, un anticuerpo distinto del anticuerpo anti-CD3, un fragmento de unión a antígeno del mismo y una proteína que tiene actividad de unión a antígeno sin tener un esqueleto de inmunoglobulina, que se describirá más adelante.

La molécula de la presente invención se une a CD3 humana y a CD3 de mono cinomolgo.

La molécula de la presente invención incluye una molécula multiespecífica descrita más adelante.

La molécula de la presente invención puede ser una forma de introducción en una célula o una forma de presentación en la superficie celular, tal como CAR-T, etc.

(3-6) Moléculas multiespecíficas y moléculas biespecíficas

La molécula multiespecífica de la presente invención es una molécula que tiene dos o más sitios de unión a antígeno. Específicamente, la molécula multiespecífica de la presente invención es una molécula capaz de unirse a dos o más epítomos diferentes entre sí en una molécula, o epítomos diferentes entre sí en dos o más moléculas, y comprende múltiples fragmentos de unión a antígeno diferentes entre sí. Los

ejemplos de moléculas multiespecíficas incluyen, de modo no limitante, moléculas multiespecíficas de tipo IgG y moléculas multiespecíficas que tienen dos o más tipos de regiones variables, por ejemplo, fragmentos de anticuerpo tales como scFv en tándem, diacuerpos monocatenarios, diacuerpos, triacuerpos y fragmentos de anticuerpo unidos por un enlace covalente o un enlace no covalente. La molécula multiespecífica puede contener Fc.

Una molécula multiespecífica de la presente invención comprende un anticuerpo anti-CD3 de la presente invención o fragmento de unión a antígeno del anticuerpo. La molécula multiespecífica de la presente invención comprende un anticuerpo, etc. de la presente invención y 1 o 2 o más anticuerpos adicionales o fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos. Los ejemplos de un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo incluyen Fab, F(ab)', Fv, scFv y sdAb.

La molécula multiespecífica de la presente invención se une específicamente a CD3 o puede unirse adicionalmente a un blanco tal como un receptor Fc en células efectoras.

Los ejemplos preferidos de moléculas multiespecíficas de la presente invención incluyen moléculas biespecíficas. El término "biespecífico" significa la capacidad de unirse a dos epítomos diferentes entre sí en una molécula, o epítomos diferentes entre sí en dos moléculas. La presente invención abarca un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno que tiene dicha biespecificidad. Una molécula biespecífica de la presente invención se une a CD3 y se une a un epítomo que está ausente de CD3 pero presente en otro antígeno. Más específicamente, dicha molécula biespecífica (i) se une a un epítomo en CD3 (epítomo 1) y (ii) se une a un epítomo diferente del epítomo 1 en CD3 (epítomo 2), o se une a un epítomo en un antígeno distinto de CD3 (epítomo 3).

Por ejemplo, en una molécula biespecífica tipo scFv en tándem tipificada por BiTE, un sitio de unión a antígeno en la región variable de cadena pesada de un primer anticuerpo y un sitio de unión a antígeno en la región variable de cadena ligera del primer anticuerpo se unen ya sea a través de un ligador o directamente sin un ligador para formar un primer polipéptido. Además, un sitio de unión a antígeno en la región variable de cadena pesada de un segundo anticuerpo y un sitio de unión a antígeno en la región variable de cadena ligera del segundo anticuerpo se unen ya sea a través de un ligador o directamente sin un ligador para formar un segundo polipéptido. El primer polipéptido y el segundo polipéptido están unidos ya sea mediante un ligador o directamente sin un ligador. Alternativamente, el primer polipéptido y el segundo polipéptido pueden unirse mediante una molécula adicional.

En una molécula biespecífica de tipo diacuerpo, un sitio de unión a antígeno en la región variable de cadena pesada de un primer anticuerpo y un sitio de unión a antígeno en la región variable de cadena ligera de un segundo anticuerpo se unen ya sea mediante un ligador o directamente sin un ligador. Además, un sitio de unión a antígeno en la región variable de cadena ligera del primer anticuerpo y un sitio de unión a antígeno en la región variable de cadena pesada del segundo anticuerpo están unidos ya sea a través de un ligador o directamente sin un ligador. Además, se puede preparar una molécula biespecífica mediante la dimerización adicional de moléculas biespecíficas de tipo diacuerpo. Además, la molécula biespecífica de tipo diacuerpo puede unirse a una sola cadena o ambas cadenas de Fc a través de un ligador (molécula biespecífica de tipo diacuerpo-Fc).

En una molécula biespecífica de tipo scFv dual, dos scFv que se unen a epítomos diferentes se unen a las dos cadenas de Fc dimérico, ya sea a través de ligadores o directamente sin ligadores. Alternativamente, dos tipos de scFv para unirse a diferentes epítomos están unidos a CH y CL, respectivamente, mediante ligadores y unidos adicionalmente a dos cadenas del Fc dimérico, respectivamente, mediante ligadores.

En una molécula biespecífica de tipo IgG, dos Fab que se unen a epítomos diferentes se unen a las dos cadenas de Fc dimérico, ya sea a través de ligadores o directamente sin ligadores.

Alternativamente, una molécula biespecífica de la presente invención puede ser un anticuerpo biespecífico en el que el Fab y el scFv para unirse a diferentes epítomos están unidos a las dos cadenas del Fc dimérico, ya sea a través de ligadores o directamente sin ligadores. Alternativamente, una molécula biespecífica de la presente invención puede ser una molécula biespecífica en la que el Fab en el primer anticuerpo y el scFv en el segundo anticuerpo están unidos a las dos cadenas de Fc dimérico mediante ligadores.

El scFv y el Fab contenidos en una molécula biespecífica de la presente invención son preferentemente scFv y Fab de un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano, y el Fc es preferentemente Fc de un anticuerpo humano.

En una región variable comprendida en un anticuerpo biespecífico de la presente invención, una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera pueden unirse en este orden, o una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada pueden unirse en este orden, desde el extremo amino. Un anticuerpo biespecífico de la presente invención opcionalmente tiene un ligador entre ambas regiones variables y puede (opcionalmente) tener un residuo de glicina en el extremo amino de una región variable que se coloca en el lado del extremo amino. Un anticuerpo biespecífico del tipo scFv en tándem de la presente invención opcionalmente tiene un ligador, etiqueta FLAG y/o etiqueta HIS en el extremo carboxilo de una región variable que se coloca en el lado del extremo carboxilo terminal. Los ejemplos preferibles de anticuerpos biespecíficos de la presente invención incluyen un anticuerpo biespecífico, en el que una región variable de cadena pesada, un primer ligador, una región variable de cadena ligera, un segundo ligador, una etiqueta FLAG y una etiqueta His se unen en este orden desde el extremo amino.

El ligador también incluye un polipéptido monocatenario o un oligopéptido monocatenario, o productos sintéticos tales como PEG, nucleótidos, cadenas de azúcar y compuestos. Además, cualquier ligador conocido en la técnica se puede utilizar sin limitaciones particulares siempre y cuando el ligador enlace dos polipéptidos.

La longitud del ligador es de 5 a 30 aminoácidos para, por ejemplo, un ligador peptídico. Cuando la molécula biespecífica contiene múltiples ligadores, todos los ligadores peptídicos utilizados pueden tener la misma longitud o los ligadores peptídicos utilizados pueden tener longitudes diferentes.

Un ejemplo de un ligador peptídico es una unidad repetida (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser). Se pueden añadir uno o más residuos de aminoácidos distintos de Gly y Ser.

(3-7) Anticuerpos anti-CD3 humanizados

De acuerdo con un aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-CD3 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

Los ejemplos de anticuerpos humanizados de la presente invención incluyen anticuerpos derivados de seres humanos que contienen solo regiones determinantes de complementariedad (CDR) (Nature (1986) 321, 522-525) y anticuerpos humanos injertados en secuencias de CDR y en algunos residuos de aminoácidos de regiones marco mediante injerto de CDR (publicación internacional núm. WO1990/07861A1).

Preferentemente, la región variable de cadena pesada contenida en un anticuerpo anti-CD3 humanizado de la presente invención o un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo retiene

CDRH1 que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 26 (Figura 24) (GVTFNYYG) y CDRH2 que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 98 (Figura 112) (IT X_{aa} X_{aa} GGRI) (en donde el primer X_{aa} y el segundo X_{aa} representan cada uno un residuo de aminoácido arbitrario de origen natural. En adelante, el primer X_{aa} también se denomina X₁, y el segundo X_{aa} también se denomina X₂), y

CDRH3 que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 28 (Figura 26) (TLDGRDGWVAY).

También preferentemente, la región variable de cadena ligera contenida en un anticuerpo anti-CD3 humanizado de la presente invención o un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo retiene

CDRL1 que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 29 (Figura 27) (TGNIGSNY),

CDRL2 que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 99 (Figura 113) (R X_{aa} D) (en donde X_{aa} representa un residuo de aminoácido arbitrario de origen natural. En lo sucesivo, X_{aa} de CDRL2 también se denomina X₃), y

CDRL3 que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 31 (Figura 29) (QSYSSGFI).

En CDRH2 (ITX₁X₂GGRI) mencionado anteriormente, preferentemente, X₁ se selecciona a partir de un grupo que consiste en A, E, G, H, I, L, T, V, R y S, y X₂ es S; o X₁ es N, y X₂ se selecciona a partir de un grupo que consiste en E, R, F, Y, L, V, I, K y T.

En CDRL2 (RX₃D) mencionado anteriormente, preferentemente, X₃ se selecciona a partir de un grupo que consiste en Q, A, G, S, N y D.

En CDRH2 (ITX₁X₂GGRI) mencionado anteriormente, más preferentemente, X₁ se selecciona a partir de un grupo que consiste en R y S, y X₂ es S.

En CDRL2 (RX₃D) mencionado anteriormente, más preferentemente, X₃ se selecciona a partir de un grupo que consiste en Q, A, G, S, N y D.

Los ejemplos preferidos de regiones variables de cadena pesada contenidas en dichos anticuerpos anti-CD3 humanizados de la presente invención o fragmentos de unión a antígeno del anticuerpo incluyen una región variable de cadena pesada que comprende los residuos de aminoácidos representados por la

SEQ ID NO: 100 (Figura 114).

Además, los ejemplos preferidos de regiones variables de cadena ligera contenidas en anticuerpos anti-CD3 humanizados de la presente invención o fragmentos de unión a antígeno del anticuerpo incluyen una región variable de cadena ligera que comprende los residuos de aminoácidos representados por la SEQ ID NO: 101 (Figura 115), SEQ ID NO: 102 (Figura 116), o SEQ ID NO: 103 (Figura 117).

Los ejemplos preferidos específicos de regiones variables de cadena pesada contenidas en anticuerpos anti-CD3 humanizados de la presente invención o fragmentos de unión a antígeno del anticuerpo incluyen

una región variable de cadena pesada que retiene

CDRH1 que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 26 (Figura 24) (GVTFNYYG),

CDRH2 que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 27 (Figura 25) (ITNSGGRI), y

CDRH3 que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 28 (Figura 26) (TLDGRDGWVAY).

Los ejemplos preferidos específicos de regiones variables de cadena ligera contenidas en anticuerpos anti-CD3 humanizados de la presente invención o fragmentos de unión a antígeno del anticuerpo incluyen

una región variable de cadena ligera que retiene

CDRL1 que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 29 (Figura 27) (TGNIGSNY),

CDRL2 que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 30 (Figura 28) (RDD), y

CDRL3 que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 31 (Figura 29) (QSYSSGFI).

En la presente invención, las posiciones y longitudes de las CDR se determinaron de acuerdo con las definiciones de IMGT (Developmental and Comparative Immunology 27 (2003) 55-77).

Los ejemplos específicos de regiones variables de cadena pesada de la presente invención incluyen una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16.

Los ejemplos específicos de regiones variables de cadena ligera de la presente invención incluyen una secuencia de aminoácidos que comprende residuos de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17, 20 o 23.

Los ejemplos preferidos específicos de anticuerpos anti-CD3 humanizados de la presente invención o fragmentos de unión a antígeno del anticuerpo incluyen

un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende del 2.º al 119.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 60 y una región variable de cadena ligera que comprende del 135.º al 241.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 60,

un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo que comprende una región

variable de cadena pesada que comprende del 2.º al 119.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 64 y una región variable de cadena ligera que comprende del 135.º al 241.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 64,

un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende del 2.º al 119.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 66 y una región variable de cadena ligera que comprende del 135.º al 243.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 66,

un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende del 2.º al 119.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 68 y una región variable de cadena ligera que comprende del 135.º al 243.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 68,

un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende del 2.º al 119.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 70 y una región variable de cadena ligera que comprende del 135.º al 243.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 70,

un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende del 2.º al 119.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 72 y una región variable de cadena ligera que comprende del 135.º al 243.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 72,

un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende del 2.º al 119.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 74 y una región variable de cadena ligera que comprende del 135.º al 243.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 74,

un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende del 2.º al 119.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 76 y una región variable de cadena ligera que comprende del 135.º al 243.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 76,

un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende del 2.º al 119.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 78 y una región variable de cadena ligera que comprende del 135.º al 243.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 78,

un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende del 2.º al 119.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 80 y una región variable de cadena ligera que comprende del 135.º al 243.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 80,

un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende del 2.º al 119.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 82 y una región variable de cadena ligera que comprende del 135.º al 243.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 82, o

un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende del 2.º al 119.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 84 y una región variable de cadena ligera que comprende del 135.º al 243.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 84.

Los ejemplos específicos de anticuerpos anti-CD3 humanizados o fragmentos de unión a antígeno del anticuerpo de la presente invención incluyen un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada que incluye una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 16, un ligador y una región variable de cadena ligera que incluye una secuencia de aminoácidos representada por

cualquiera de las SEQ ID NO: 17, 20 y 23.

En las regiones variables que comprenden anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los anticuerpos de la presente invención, una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera pueden unirse en este orden, o una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada pueden unirse en este orden, desde el extremo amino. Las regiones variables pueden comprender un residuo de glicina en sus extremos amino. Un ligador, etiqueta FLAG y/o etiqueta HIS pueden unirse al final de los extremos carboxilo de las regiones variables.

Los ejemplos preferidos específicos de anticuerpos anti-CD3 humanizados de la presente invención o fragmentos de unión a antígeno del anticuerpo incluyen

un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo que comprende del 2.º al 243.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 19,

un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo que comprende del 2.º al 243.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 22, y

un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo que comprende del 2.º al 241.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 25.

Los ejemplos preferidos más específicos de anticuerpos anti-CD3 humanizados de la presente invención o fragmentos de unión a antígeno del anticuerpo incluyen

un anticuerpo (ID de clon: C3E-7078) o un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo que comprende del 1.º al 243.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 60 (Figura 68),

un anticuerpo (ID de clon: C3E-7085) o un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo que comprende del 1.º al 241.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 64 (Figura 72),

un anticuerpo (ID de clon: C3E-7086) o un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo que comprende del 1.º al 243.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 66 (Figura 74),

un anticuerpo (ID de clon: C3E-7087) o un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo que comprende del 1.º al 243.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 68 (Figura 76),

un anticuerpo (ID de clon: C3E-7088) o un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo que comprende del 1.º al 243.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 70 (Figura 78),

un anticuerpo (ID de clon: C3E-7089) o un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo que comprende del 1.º al 243.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 72 (Figura 80),

un anticuerpo (ID de clon: C3E-7090) o un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo que comprende del 1.º al 243.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 74 (Figura 82),

un anticuerpo (ID de clon: C3E-7091) o un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo que comprende del 1.º al 243.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 76 (Figura 84),

un anticuerpo (ID de clon: C3E-7092) o un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo que comprende del 1.º al 243.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 78 (Figura 86),

un anticuerpo (ID de clon: C3E-7093) o un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo que comprende del 1.º al 243.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 80 (Figura 88),

un anticuerpo (ID de clon: C3E-7094) o un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo que

comprende del 1.º al 243.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 82 (Figura 90), y

un anticuerpo (ID de clon: C3E-7095) o un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo que comprende del 1.º al 243.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 84 (Figura 92).

Ejemplos preferidos específicos de anticuerpos anti-CD3 humanizados de la presente invención o fragmentos de unión a antígeno del anticuerpo, en donde una región variable de cadena pesada, un ligador y una región variable de cadena ligera se unen en este orden al final del extremo amino, y adicionalmente, un segundo ligador, etiqueta FLAG y etiqueta HIS se unen al final del extremo carboxilo de la región variable de cadena ligera, incluyen anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno del anticuerpo escrito en el punto (16) mencionado anteriormente que comprenden

una secuencia de aminoácidos que comprende del 2.º al 269.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 22,

una secuencia de aminoácidos que comprende los residuos de aminoácidos 2º a 267º de la SEQ ID NO: 25,

una secuencia de aminoácidos que comprende del 2.º al 269.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 60,

una secuencia de aminoácidos que comprende del 2.º al 267.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 64,

una secuencia de aminoácidos que comprende del 2.º al 269.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 66,

una secuencia de aminoácidos que comprende del 2.º al 269.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 68,

una secuencia de aminoácidos que comprende del 2.º al 269.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 70,

una secuencia de aminoácidos que comprende del 2.º al 269.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 72,

una secuencia de aminoácidos que comprende del 2.º al 269.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 74,

una secuencia de aminoácidos que comprende del 2.º al 269.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 76,

una secuencia de aminoácidos que comprende del 2.º al 269.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 78,

una secuencia de aminoácidos que comprende del 2.º al 269.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 80,

una secuencia de aminoácidos que comprende del 2.º al 269.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 82, o

una secuencia de aminoácidos que comprende del 2.º al 269.º residuo de aminoácido de la SEQ ID NO: 84.

El anticuerpo, etc. de la presente invención puede ser una molécula que incluye un anticuerpo, etc.

que comprende una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena pesada y/o una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena ligera que es 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% la misma que la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada y/o la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera contenida en el anticuerpo anti-CD3 anteriormente mencionado de la presente invención o fragmento de unión a antígeno del anticuerpo, y se une a CD3 humana y a CD3 de mono cinomolgo.

El anticuerpo, etc., de la presente invención puede ser un anticuerpo cuya capacidad para unirse a CD3 puede optimizarse mediante la introducción de una mutación al anticuerpo anti-CD3 humanizado anteriormente mencionado o fragmento de unión a antígeno del anticuerpo. Los ejemplos específicos del método para introducir una mutación pueden incluir mutagénesis aleatoria usando PCR propensa a errores, mutagénesis de aminoácidos dirigida a sitio usando una biblioteca NNK, mutagénesis dirigida a sitio usando información de estructura y combinaciones de estos.

Las actividades de ADCC y CDC de un anticuerpo, etc. de la presente invención pueden reducirse mediante la sustitución de regiones constantes para disminuir la actividad efectora del anticuerpo.

Para evitar la citotoxicidad en células normales que expresan CD3 humana, es deseable que el anticuerpo tenga baja actividad efectora. Se sabe que la actividad efectora difiere entre subclases de anticuerpos. Por ejemplo, IgG4 tiene baja actividad de ADCC y CDC, e IgG2 tiene actividad de CDC pero baja actividad de ADCC. Usando estas características, se puede preparar un anticuerpo con actividad reducida de ADCC y CDC mediante la sustitución de las regiones constantes de IgG1 con las regiones constantes de IgG2 o IgG4. Además, se puede preparar un anticuerpo IgG1 con actividad reducida de ADCC y CDC mediante la sustitución de una parte de las regiones constantes de IgG1 con referencia a IgG2 o IgG4. Por ejemplo, Marjan Hezareh et al., Journal of Virology, 75 (24): 12161-12168 (2001) muestran que la actividad de ADCC y CDC se reduce mediante la sustitución de los residuos de leucina 234° y 235° (los números se basan en el índice EU de acuerdo con Kabat et al.) de IgG1 con residuos de alanina.

(3-8) Anticuerpos que se unen al mismo sitio y también se unen a CD3 de mono cinomolgo

Un "anticuerpo que se une al mismo sitio" incluye un anticuerpo, etc. de la presente invención y "se une a CD3 de mono cinomolgo" también incluye un anticuerpo, etc. de la presente invención. El "anticuerpo que se une al mismo sitio" como en el caso de un anticuerpo determinado significa otro anticuerpo que se une a un sitio en una molécula de antígeno reconocida por el anticuerpo. Si un segundo anticuerpo se une a un péptido parcial o una estructura tridimensional parcial en una molécula de antígeno unida por un primer anticuerpo, se determina que el primer y el segundo anticuerpo se unen al mismo sitio.

De manera alternativa, se determina que el primer y segundo anticuerpo se unen al mismo sitio al confirmar que el segundo anticuerpo compite con el primer anticuerpo por la unión a antígeno, es decir, el segundo anticuerpo interfiere con la unión del primer anticuerpo al antígeno, incluso si no se determina la secuencia peptídica o la estructura tridimensional del sitio de unión específico.

Cuando el primer y el segundo anticuerpo se unen al mismo sitio y el primer anticuerpo tiene una característica de efecto de un aspecto de un anticuerpo de la presente invención, tal como actividad

citotóxica, el segundo anticuerpo también tiene una probabilidad excesivamente alta de tener la misma actividad.

Por lo tanto, si un segundo anticuerpo anti-CD3 se une a un sitio unido por un primer anticuerpo anti-CD3 y el segundo anticuerpo anti-CD3 se une a CD3 de mono cinomolgo, el primer y segundo anticuerpos se pueden determinar como que se unen al mismo sitio en la proteína CD3. Un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo que se une al mismo sitio en CD3 humana que el unido por un anticuerpo anti-CD3 de la presente invención o un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo, y se une a CD3 de mono cinomolgo también se incluye entre los anticuerpos, etc. de la presente invención.

Alternativamente, el primer y el segundo anticuerpo anti-CD3 se pueden determinar como que se unen al mismo sitio en la proteína CD3 al confirmar que el segundo anticuerpo anti-CD3 compite con el primer anticuerpo anti-CD3 por la unión a la proteína CD3 y el segundo anticuerpo anti-CD3 se une a CD3 de mono cinomolgo. Un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo que compite con el anticuerpo anti-CD3 de la presente invención o fragmento de unión a antígeno del anticuerpo para unirse a CD3 humana, y que se une a CD3 de mono cinomolgo también se incluye en el antígeno, etc. de la presente invención.

El sitio de unión a anticuerpo se puede determinar usando cualquier método conocido por los expertos en la materia, tal como inmunoensayo. Por ejemplo, se puede preparar una serie de péptidos mediante la escisión secuencial adecuada de la secuencia de aminoácidos del antígeno de su extremo carboxilo o extremo amino, y luego estudiar la reactividad del anticuerpo para determinar aproximadamente un sitio de reconocimiento. Luego, se sintetizan péptidos más cortos y se puede estudiar la reactividad del anticuerpo a estos péptidos para determinar el sitio de unión. Los péptidos del fragmento de antígeno se pueden preparar usando una técnica tal como recombinación génica o síntesis peptídica.

Un anticuerpo, etc. de la presente invención reconoce y se une a una región que constituye la estructura tridimensional de CD3, es decir, un dominio similar a Ig. Dicho sitio de unión (epítipo) para el anticuerpo se puede determinar mediante la identificación de residuos de aminoácidos en el antígeno adyacente al anticuerpo usando análisis estructural de rayos X.

(3-9) Variantes de anticuerpos anti-CD3 o fragmentos de unión a antígeno de estos

La presente invención proporciona una variante de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo. La variante del anticuerpo de la presente invención o fragmento de unión a antígeno del mismo significa un anticuerpo de la presente invención o un fragmento de unión a antígeno del mismo provisto de modificación química o biológica. La variante química incluye, por ejemplo, una forma que tiene un esqueleto de aminoácidos conjugado con un resto químico y una forma que tiene una cadena de carbohidratos unida a N u O modificada químicamente. La variante biológica incluye, por ejemplo, una forma que se ha sometido a modificación postraducciona (por ejemplo, glucosilación unida a N u O, procesamiento de una región de extremo amino o carboxilo, desamidación, isomerización de ácido aspártico u oxidación de metionina) y una forma que contiene un residuo de metionina agregado al extremo amino mediante expresión usando células hospederas procariotas. Dicha variante también pretende incluir

una forma marcada para permitir la detección o el aislamiento del anticuerpo o el antígeno de la presente invención, por ejemplo, una forma marcada con enzimas, una forma marcada con fluorescencia o una forma marcada con afinidad. Dicha variante del anticuerpo de la presente invención o fragmento de unión a antígeno del mismo es útil para mejorar la estabilidad y retención sanguínea del anticuerpo original de la presente invención o el fragmento de unión a antígeno original del mismo, reducir la antigenicidad y detectar o aislar el anticuerpo o el antígeno, etc.

Los ejemplos de porciones químicas contenidas en las variantes químicas incluyen polímeros solubles en agua tales como polietilenglicol, copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano y alcohol polivinílico.

Los ejemplos de variantes biológicas incluyen formas modificadas mediante tratamiento enzimático o tratamiento celular, formas fusionadas con otros péptidos, tales como una etiqueta, agregadas mediante recombinación génica y formas preparadas a partir de células hospederas que expresan una enzima modificadora de la cadena de azúcar endógena o exógena.

Dicha modificación se puede realizar en una posición arbitraria o en una posición deseada en el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo. Alternativamente, se pueden realizar las mismas o diferentes modificaciones en una o dos o más posiciones en estas.

En la presente invención, una "variante de un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo" también pretende incluir un "fragmento de una variante de un anticuerpo".

Por ejemplo, se sabe que la cadena pesada de un anticuerpo producido por células de mamífero cultivadas carece de un residuo de lisina en el extremo carboxilo (Journal of Chromatography A, 705: 129-134 (1995)). Además, se sabe que la cadena pesada de dicho anticuerpo carece de dos residuos de aminoácidos (glicina y lisina) en el extremo carboxilo y en su lugar tiene un residuo de prolina amidada en el extremo carboxilo (Analytical Biochemistry, 360: 75-83 (2007)). Además, se sabe que un residuo de glutamina o ácido glutámico N (amino)-terminal en la cadena pesada o ligera de un anticuerpo se modifica mediante piroglutamilación durante la preparación del anticuerpo, y el anticuerpo de la presente invención puede tener dicha modificación (publicación internacional núm. WO2013/147153A1).

Las eliminaciones en estas secuencias de cadena pesada o modificaciones en estas secuencias de cadena pesada o ligera, sin embargo, no influyen mucho en la capacidad del anticuerpo para unirse al antígeno y sus funciones efectoras (activación del complemento, efectos citotóxicos dependientes del anticuerpo, etc.). Por lo tanto, la presente invención también comprende anticuerpos que han sido sometidos a eliminación o modificación (en lo sucesivo denominadas "variantes de eliminación"). Los ejemplos incluyen una variante de eliminación derivada de una cadena pesada mediante eliminación de 1 o 2 aminoácidos en el extremo carboxilo, una forma amidada de la variante de eliminación (por ejemplo, una cadena pesada que tiene un residuo de prolina amidada en el sitio del extremo carboxilo) y un anticuerpo que tiene un residuo amino-terminal piroglutamilado en su cadena pesada o ligera. Sin embargo, una variante de eliminación en el extremo carboxilo de la cadena pesada y ligera del anticuerpo de acuerdo con la presente invención no se limita a los tipos descritos anteriormente siempre y cuando la variante de eliminación conserve al menos cierta capacidad de unirse al antígeno. Dos o más cadenas (por ejemplo,

cadenas pesadas) presentes en un anticuerpo de acuerdo con la presente invención pueden ser cadenas (por ejemplo, cadenas pesadas) de cualquier tipo seleccionadas de un grupo que consiste en cadenas de longitud completa (por ejemplo, cadenas pesadas) y las variantes de eliminación descritas anteriormente, así como cualquier combinación de dos o más cadenas (por ejemplo, cadenas pesadas) de cualesquiera dos tipos seleccionados de estas. La relación cuantitativa o molecular de cada variante de eliminación puede verse influenciada por el tipo de células de mamífero cultivadas que producen el anticuerpo de acuerdo con la presente invención y las condiciones de cultivo. Los ejemplos incluyen la eliminación de un residuo de aminoácido del extremo carboxilo cada una de las dos cadenas pesadas como componentes principales del anticuerpo de acuerdo con la presente invención.

En la presente invención, una "variante de un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo" también pretende incluir un "fragmento de una variante de un anticuerpo".

La actividad citotóxica celular dependiente de anticuerpos del anticuerpo de la presente invención puede potenciarse mediante la regulación de la modificación (glucosilación, defucosilación, etc.) de la cadena de azúcar unida con el anticuerpo. Por ejemplo, en Publicación Internacional Núms. WO99/54342A1, WO00/61739A1 y WO02/31140A1 dan a conocer una técnica para regular la modificación de la cadena de azúcar de un anticuerpo, aunque esta técnica no se limita a esta. Un anticuerpo de la presente invención y un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo también incluyen un anticuerpo y un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo que se ha sometido a la modificación de la cadena de azúcar regulada de este modo.

En la presente invención, "eliminaciones" y "modificaciones" de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, y mezcla de los mismos se encuentran dentro del alcance del "anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo". Y, "deleciones" y "modificaciones" de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, y mezclas de los mismos se encuentran dentro del alcance de "un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo" que comprende una molécula que se une a un antígeno, molécula multiespecífica, molécula biespecífica o similares de la presente invención que se describe en (3-5) y (3-6).

4. Producción de anticuerpos

(4-1) Método que utiliza hibridoma

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, las células productoras de anticuerpos anti-CD3 se aíslan de los bazo de animales inmunizados con la proteína CD3 de acuerdo, por ejemplo, con el método de Kohler y Milstein (Kohler y Milstein, Nature (1975) 256, p. 495-497; y Kennet, R. ed., Monoclonal Antibodies, p. 365-367, Plenum Press, N.Y. (1980)). Las células se fusionan con células de mieloma para establecer hibridomas. Los anticuerpos monoclonales se pueden obtener de cultivos de estos hibridomas.

(4-1-1) Preparación de antígeno

El antígeno para la preparación de un anticuerpo anti-CD3 se puede obtener de acuerdo con, por ejemplo, el método para preparar una proteína CD3 natural o recombinante (antígeno monocatenario

CD3εγ humano). Los ejemplos de antígenos que pueden prepararse de este modo incluyen la proteína CD3, fragmentos de proteína CD3 y derivados de estos que comprenden además una secuencia de aminoácidos arbitraria o portador agregado (en lo sucesivo, denominados colectivamente "CD3").

La CD3 natural se puede purificar y aislar de, por ejemplo, células derivadas del tejido humano o cultivos de las células. El antígeno monocatenario CD3εγ humano recombinante se puede preparar transfectando células hospederas con un gen que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos del antígeno monocatenario CD3εγ humano y recuperando el antígeno de cultivos de las células. CD3 obtenida mediante síntesis de proteínas libres de células en un sistema de traducción *in vitro* de un gen que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos del antígeno CD3 también se incluye entre los "antígenos CD3" de la presente invención.

(4-1-2) Producción de anticuerpos monoclonales anti-CD3

Un anticuerpo monoclonal se produce comúnmente a través de las siguientes etapas:

- (a) preparar un antígeno,
- (b) preparar células productoras de anticuerpos,
- (c) preparar células de mieloma (en lo sucesivo, denominados "mielomas"),
- (d) fusionar las células productoras de anticuerpos con los mielomas,
- (e) la detección de un grupo de hibridoma que produce el anticuerpo de interés, y
- (f) obtención de clones monocelulares (clonación).

Este método de producción implica además (g) una etapa de cultivo de los hibridomas, una etapa de crianza de animales trasplantados por hibridomas, etc., y (h) una etapa de ensayo o determinación de la actividad biológica del anticuerpo monoclonal, etc., si es necesario.

Este método para preparar anticuerpos monoclonales se describirá ahora en detalle con referencia a estas etapas. Sin embargo, el método para preparar el anticuerpo no se limita a estas etapas. Por ejemplo, se pueden utilizar células productoras de anticuerpos distintas de las células del bazo y mielomas.

a) Etapa de preparación de antígenos

Una proteína CD3 de la presente invención se puede preparar mediante purificación o aislamiento de tejidos animales (que incluyen fluidos corporales), células derivadas de los tejidos o cultivos de las células, recombinación génica, síntesis de proteínas libres de células, síntesis química, etc.

(b) Etapa de preparación de células productoras de anticuerpos

El antígeno obtenido en la etapa (a) se mezcla con un adyuvante tal como un adyuvante de Freund completo o incompleto o sulfato de aluminio potásico, y los animales de laboratorio se inmunizan con el inmunógeno resultante. Cualquier animal de laboratorio utilizado en un método de preparación de hibridoma conocido en la materia se puede utilizar sin limitaciones. Por ejemplo, se pueden utilizar ratones, ratas, cabras, ovejas, ganado y caballos. Desde el punto de vista de las células de mieloma fácilmente disponibles que se fusionarán con células productoras de anticuerpos aisladas, etc., los animales que se inmunizarán son preferentemente ratones o ratas.

La cepa de ratones o ratas realmente utilizada no está particularmente limitada. En el caso de

ratones, por ejemplo, se puede utilizar A, AKR, BALB/c, BALB/cAnNCrj, BDP, BA, CE, C3H, 57BL, C57BL, C57L, DBA, FL, HTH, HT1, LP, NZB, NZW, RF, R III, SJL, SWR, WB o 129. En el caso de ratas, por ejemplo, se pueden utilizar Wistar, Low, Lewis, Sprague-Dawley, ACI, BN o Fischer.

Estos ratones y ratas están disponibles de criadores o distribuidores de animales de laboratorio, por ejemplo, CLEA Japan, Inc. o Charles River Laboratories Japan, Inc.

De esos ratones y ratas, se prefiere particularmente una cepa de ratón BALB/c o cepas de rata Wistar y Low como animales a inmunizar en consideración de la compatibilidad de fusión con las células de mieloma descritas más adelante.

Además, en consideración de la homología entre antígenos humanos y de ratón, también se utilizan preferentemente ratones cuyo mecanismo biológico para eliminar autoanticuerpos se ha reducido, es decir, ratones con enfermedad autoinmunitaria.

En este contexto, estos ratones o ratas tienen preferentemente 5 a 12 semanas de edad, y más preferentemente 6 a 8 semanas de edad, en el momento de la inmunización.

Los animales se pueden inmunizar con la proteína CD3 usando, por ejemplo, el método de Weir, D. M., Handbook of Experimental Immunology vol. I. II. III., Blackwell Scientific Publications, Oxford (1987), o Kabat, E. A. y Mayer, M. M., Experimental Immunochemistry, Charles C Thomas Publisher Springfield, Illinois (1964).

Los ejemplos de métodos para determinar títulos de anticuerpos pueden incluir, de modo no limitante, inmunoensayos tales como RIA y ELISA.

Las células productoras de anticuerpos derivadas de células esplénicas o linfocitos separados de los animales inmunizados se pueden preparar de acuerdo con un método conocido en la materia, por ejemplo, Kohler et al., Nature (1975) 256, 495; Kohler et al., Eur. J. Immunol. (1977) 6, 511; Milstein et al., Nature (1977), 266, 550; o Walsh, Nature (1977) 266, 495.

En el caso de las células del bazo, se puede adoptar un método general, que implica cortar los bazos, filtrar las células a través de una malla de acero inoxidable y luego hacer flotar las células resultantes en medio esencial mínimo (MEM) de Eagle para separar las células productoras de anticuerpos.

(c) Etapa de preparación de mielomas

Las células de mieloma utilizadas en la fusión celular no están particularmente limitadas y se pueden seleccionar para su uso a partir de líneas celulares conocidas en la materia. Por ejemplo, una línea con deficiencia de hipoxantina-guanina fosforribosil transferasa (HGPRT), es decir, línea derivada de ratón X63-Ag8 (X63), NS1-ANS/1 (NS1), P3X63-Ag8.UI (P3UI), X63-Ag8.653 (X63.653), SP2/0-Ag14 (SP2/0), MPC11-45.6TG1.7 (45.6TG), FO, S149/5XXO, o BU.1, derivada de rata 210.RSY3.Ag.1.2.3 (Y3), o derivada de humano U266AR (SKO-007), GM1500-GTG-A12 (GM1500), UC729-6, LICR-LOW-HMy2 (HMy2), o 8226AR/NIP4-1 (NP41), cuyos procedimientos de selección ya se han establecido, se utilizan preferentemente en consideración de conveniencia en la selección de hibridomas de células de fusión. Estas líneas con deficiencia de HGPRT están disponibles, por ejemplo, en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC).

Estas líneas celulares se subcultivan en un medio adecuado, por ejemplo, un medio de 8-

azaguanina [medio RPMI-1640 complementado con glutamina, 2-mercaptoetanol, gentamicina y suero fetal bovino (en lo sucesivo, denominado "FCS") y complementado adicionalmente con 8-azaguanina], un medio de Dulbecco modificado de Iscove (en lo sucesivo, denominado "IMDM") o un medio de Eagle modificado de Dulbecco (en lo sucesivo, denominado "DMEM") y subcultivo en un medio normal [por ejemplo, medio ASF104 (fabricado por Ajinomoto Co., Inc.) que contiene FCS al 10%] durante 3 a 4 días antes de la fusión celular para garantizar que la cantidad de células sea igual o mayor que 2×10^7 células el día de la fusión celular.

(d) Etapa de fusión de células productoras de anticuerpos con células de mieloma

Las células productoras de anticuerpos se pueden fusionar con las células de mieloma en condiciones que impiden que la viabilidad celular se reduzca excesivamente, de acuerdo con cualquier método conocido en la materia (por ejemplo, Weir, D.M., Handbook of Experimental Immunology Vol. I. II. III., Blackwell Scientific Publications, Oxford (1987), Kabat, E. A. y Mayer, M. M., Experimental Immunochemistry, Charles C Thomas Publisher Springfield, Illinois (1964)). Por ejemplo, se puede utilizar un método químico que implica mezclar células productoras de anticuerpos con células de mieloma en una solución de alta concentración de un polímero tal como polietilenglicol, o un método físico que utiliza estimulación eléctrica.

(e) Etapa de selección para el grupo de hibridoma que produce el anticuerpo de interés

El método utilizado para seleccionar hibridomas obtenidos por fusión celular no está particularmente limitado, pero se utiliza comúnmente un método de selección de hipoxantina-aminopterina timidina (HAT) (Kohler et al., Nature (1975) 256, 495; Milstein et al., Nature (1977) 266, 550). Este método es eficaz para obtener hibridomas utilizando una línea celular de mieloma con deficiencia de HGPRT, que no puede sobrevivir en presencia de aminopterina. Específicamente, las células e hibridomas no utilizados se pueden cultivar en un medio HAT para permitir que los hibridomas resistentes a la aminopterina vivan y crezcan selectivamente.

f) Etapa de obtención de clones monocelulares (clonación)

Los hibridomas se pueden clonar usando cualquier método conocido en la materia, por ejemplo, un método de metilcelulosa, agarosa blanda o dilución limitante (por ejemplo, Barbara, B.M. y Stanley, M.S.: Selected Methods in Cellular Immunology, W.H. Freeman and Company, San Francisco (1980)). Se prefiere el método de dilución limitante.

(g) Etapa de cultivo de hibridomas y etapa de crianza de animales trasplantados por hibridomas

Los hibridomas seleccionados se pueden cultivar para producir anticuerpos monoclonales. Preferentemente, los hibridomas deseados se clonan y luego se someten a la producción de anticuerpos.

El anticuerpo monoclonal producido por dicho hibridoma puede recuperarse de cultivos del hibridoma. Además, se puede recuperar un anticuerpo recombinante de cultivos de células transfectadas con el gen de anticuerpo monoclonal. Alternativamente, el hibridoma puede inyectarse vía intraperitoneal en ratones de la misma cepa (por ejemplo, ratones BALB/cAnNCrj descritos anteriormente) o ratones Nu/Nu y dejarse crecer. Luego, los anticuerpos monoclonales se pueden recuperar de sus ascitis.

(h) Etapa de ensayo o determinación de la actividad biológica de los anticuerpos monoclonales

Varias pruebas biológicas pueden ser seleccionadas y aplicadas dependiendo del propósito.

(4-2) Método de inmunización celular

Las células que expresan CD3 natural o células que expresan CD3 recombinante o su fragmento se pueden utilizar como inmunógenos para preparar un anticuerpo anti-CD3 usando el método de hibridoma descrito anteriormente.

Los ejemplos de células que expresan CD3 de origen natural incluyen células de timo humano y linfocitos T. Estas células que expresan CD3 se utilizan en una cantidad de 1×10^5 a 1×10^9 células, preferentemente 1×10^6 a 1×10^8 células, más preferentemente 0.5 a 2×10^7 células, e incluso más preferentemente 1×10^7 células, por inyección de inmunización. El número de células utilizadas para la inmunización se puede cambiar dependiendo del nivel de expresión de CD3. Los inmunógenos se administran generalmente por vía intraperitoneal, pero pueden administrarse por vía intradérmica. Los hibridomas se pueden preparar mediante la aplicación del método descrito en la sección (4-1-2).

(4-3) Método de inmunización con ADN

También se puede obtener un anticuerpo anti-CD3 de la presente invención mediante el uso de un método de inmunización de ADN. Este método implica transfectar un animal individual, por ejemplo, ratón o rata, con un plásmido de expresión de antígeno y expresar el antígeno en el individuo para inducir así inmunidad contra el antígeno. Los ejemplos del enfoque de transfección incluyen un método para inyectar directamente el plásmido en el músculo, un método para inyectar un reactivo de transfección tal como un liposoma o polietilenimina en una vena, un enfoque usando un vector viral, un enfoque para inyectar partículas de oro fijadas con plásmido usando una pistola de genes y un método hidrodinámico para inyectar rápidamente una gran cantidad de solución de plásmido en una vena.

Un ejemplo real de un anticuerpo de rata anti- CD3 humana obtenido de este modo es C3-147. La secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de C3-147 se muestra en la SEQ ID NO: 9 del listado de secuencias (Figura 17). La secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de C3-147 se muestra en la SEQ ID NO: 7 del listado de secuencias (Figura 15).

(4-4) Recombinación genética

Para preparar un anticuerpo de la presente invención, se introduce en las células hospederas un nucleótido (nucleótido de cadena pesada) que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de su cadena pesada y un nucleótido (nucleótido de cadena ligera) que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de su cadena ligera, o un vector que tiene un inserto del nucleótido de cadena pesada y un vector que tiene un inserto del nucleótido de cadena ligera, se cultivan las células y el anticuerpo se recupera del cultivo. El nucleótido de cadena pesada y el nucleótido de cadena ligera se pueden insertar en un vector.

Las células procariotas o eucariotas se pueden utilizar como células hospederas. Cuando se utilizan células eucariotas hospedadoras, se pueden utilizar células animales, células vegetales o microbios

eucariotas.

Los ejemplos de células animales incluyen células derivadas de mamíferos, es decir, células renales embrionarias humanas células HEK293F (Subedi GP et al., J Vis Exp. (2015) 106), células COS derivadas de riñón de mono (Gluzman, Y. Cell (1981), 23, 175-182, ATCC CRL-1650), fibroblasto de ratón
5 NIH3T3 (ATCC No. CRL-1658), células de ovario de hámster chino (células CHO, ATCC CCL-61), líneas de este con deficiencia de dihidrofolato reductasa (CHOdhr-; Urlaub, G. y Chasin, L.A. PNAS (1980), 77, 4126-4220), células derivadas de aves como pollos, y células derivadas de insectos.

Además, las células modificadas para mejorar las actividades biológicas de los anticuerpos mediante la modificación de las estructuras de la cadena de azúcar se pueden utilizar como hospedadores.

10 Por ejemplo, las células CHO modificadas de modo que la proporción de cadenas de azúcar con fucosa no unida con N-acetilglucosamina en sus extremos reductores sea de 20% o más entre cadenas de azúcar unidas a N-glucósido de tipo complejo para unirse a la región Fc del anticuerpo, se pueden utilizar para preparar un anticuerpo que tiene actividad de ADCC mejorada o actividad de CDC (Publicación Internacional Núm. WO02/31140A1).

15 Los ejemplos de microbios eucariontes incluyen levaduras. Los ejemplos de células procariotas incluyen *E. coli* y *Bacillus subtilis*.

Un péptido señal para la secreción de un anticuerpo de la presente invención (anticuerpos monoclonales derivados de cada animal, anticuerpos de rata, anticuerpos de ratón, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, etc.) no se limita a la señal secretora de un anticuerpo de
20 la misma especie, el mismo tipo o el mismo subtipo que el anticuerpo de la presente invención o al anticuerpo de la propia señal secretora de la presente invención. Se puede seleccionar y utilizar cualquier señal secretora de un anticuerpo de un tipo o subtipo diferente o cualquier señal secretora de una proteína derivada de una especie eucariota o especie procariota diferente.

Un anticuerpo secretado, etc. que contiene el péptido señal también está comprendido por el
25 anticuerpo, etc. de la presente invención o la molécula de la presente invención.

(4-5) Métodos para diseñar y preparar anticuerpos humanizados

Los ejemplos de anticuerpos humanizados incluyen, de modo no limitante, anticuerpos derivados de seres humanos que tienen CDR reemplazadas con las CDR de anticuerpos de animales no humanos
30 (véase Nature (1986), 321, p. 522-525), anticuerpos humanos injertados en secuencias de CDR y algunos residuos de aminoácidos de regiones marco mediante injerto de CDR (véase WO90/07861A1 y US6972323B2), y anticuerpos que tienen uno o más aminoácidos de anticuerpos humanos reemplazados por uno o más aminoácidos derivados de anticuerpos de animales no humanos en cualquiera de estos anticuerpos humanizados.

(4-6) Método para preparar anticuerpos humanos

Otros ejemplos de anticuerpos de la presente invención incluyen anticuerpos humanos. El anticuerpo anti-CD3 humana significa un anticuerpo anti-CD3 que consiste en la secuencia de aminoácidos

de un anticuerpo derivado de humanos. Se puede obtener un anticuerpo anti-CD3 humana mediante un método que utiliza ratones productores de anticuerpos humanos que portan fragmentos de ADN genómico humano que comprenden genes de cadena pesada y ligera de anticuerpos humanos (véase, por ejemplo, Tomizuka, K. et al., *Nature Genetics* (1997) 16, 133-143; Kuroiwa, Y. et al., *Nuc. Acids Res.* (1998) 26, 3447-3448; Yoshida, H. et al., *Animal Cell Technology: Basic and Applied Aspects* vol. 10, 69-73 (Kitagawa, Y., Matuda, T. e Iijima, S. eds.), Kluwer Academic Publishers, 1999.; Tomizuka, K. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2000) 97, 722-727).

Específicamente, los animales productores de anticuerpos humanos se pueden preparar alterando los *loci* génicos de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina endógena de mamíferos no humanos e introduciendo *loci* génicos de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina humana mediante, por ejemplo, vectores de cromosoma artificial de levadura (YAC, por sus siglas en inglés). Alternativamente, las células eucariotas pueden transformarse con ADNc que codifican las cadenas pesada y ligera, respectivamente, de dicho anticuerpo humano, preferentemente con vectores que comprenden los ADNc, mediante una técnica de recombinación génica. Las células transformadas que producen un anticuerpo monoclonal humano recombinante se pueden cultivar. Este anticuerpo se puede obtener del sobrenadante de cultivo.

En este contexto, por ejemplo, las células eucariotas, preferentemente células de mamíferos tales como células HEK293F o células CHO, se pueden utilizar como hospedadores.

Además, también se conoce un método para obtener un anticuerpo humano derivado de la presentación en fagos seleccionado de una biblioteca de anticuerpos humanos. Por ejemplo, se puede utilizar un método de presentación en fagos que implica permitir que las regiones variables de un anticuerpo humano se expresen como scFv en una superficie de fagos y seleccionar los fagos que se unen al antígeno. Un fago seleccionado en función de su capacidad para unirse al antígeno se puede someter a análisis génico para determinar secuencias de ADN que codifican las regiones variables de la unión del anticuerpo humano al antígeno. Si se determina la secuencia de ADN de unión de scFv al antígeno, se puede preparar un vector de expresión con esta secuencia y se puede introducir a un huésped adecuado para permitirles expresar el anticuerpo humano (WO92/01047A1, WO92/20791 A1, WO93/06213 A1, WO93/11236 A1, WO93/19172 A1, WO95/01438 A1, WO95/15388 A1, *Annu. Rev. Immunol* (1994) 12, 433-455).

(4-7) Método para preparar fragmentos de anticuerpos de unión a antígeno

El método para preparar scFv es conocido en la materia (véase, por ejemplo, en las Patentes de EE.UU. Núms. 4,946,778, 5,260,203, 5,091,513, y 5,455,030). En este scFv, una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera se unen mediante un ligador que evita que formen un conjugado, preferentemente un ligador polipeptídico (Huston, J.S. et al., *PNAS* (1988), 85, 5879-5883). La región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera en scFv pueden derivar del mismo anticuerpo o pueden derivar de diferentes anticuerpos.

Por ejemplo, se utiliza un péptido monocatenario arbitrario que consiste en 5 a 30 residuos como el ligador polipeptídico que une estas regiones variables.

Para obtener ADN que codifica scFv de las secuencias de ADN que codifican la región variable de

cadena pesada o cadena pesada del anticuerpo y ADN que codifica la región variable de cadena ligera o cadena ligera de este, cada parte de ADN que codifica la secuencia de aminoácidos completa o deseada se utiliza como plantilla y se amplifica mediante PCR usando un par cebador que flanquea ambos extremos de la plantilla. Posteriormente, el ADN que codifica la porción del ligador polipeptídico se amplifica
 5 adicionalmente en combinación con un par cebador que flanquea ambos extremos del ADN de modo que el fragmento resultante pueda unirse en sus extremos a los ADN de cadena pesada y ligera. Alternativamente, el ADN que codifica toda la región scFv puede obtenerse mediante síntesis neta.

El ADN que codifica scFv se puede utilizar para preparar, de acuerdo con un método de rutina, un vector de expresión que contiene el ADN y las células hospederas transformadas con el vector de
 10 expresión. Además, las células hospederas se pueden cultivar y el scFv se puede recuperar de los cultivos usando un método de rutina.

También para obtener cualquier otro fragmento de unión a antígeno del anticuerpo, se obtiene un gen que codifica el fragmento de unión a antígeno de acuerdo con el método descrito anteriormente e introducido en las células. El fragmento de unión a antígeno de interés se puede recuperar de cultivos de
 15 las células.

El anticuerpo, etc. de la presente invención se puede multimerizar para mejorar su afinidad por el antígeno. En este caso, los anticuerpos del mismo tipo se pueden multimerizar, o se pueden multimerizar múltiples anticuerpos que reconocen múltiples epítomos, respectivamente, del mismo antígeno. Los ejemplos de métodos para multimerizar estos anticuerpos pueden incluir la unión de dos scFv a un dominio
 20 CH3 de IgG, la unión de estos a estreptavidina y la introducción de un motivo de hélice giratoria.

El anticuerpo, etc. de la presente invención puede ser una mezcla de tipos plurales de anticuerpos anti-CD3 que difieren en la secuencia de aminoácidos, es decir, un anticuerpo policlonal. Los ejemplos del anticuerpo policlonal pueden incluir una mezcla de múltiples tipos de anticuerpos con conjuntos de CDR que difieren total o parcialmente. Dicho anticuerpo policlonal se puede recuperar de cultivos de células
 25 productoras de anticuerpos diferentes cultivadas mixtas (WO2004/061104A1). Alternativamente, los anticuerpos preparados por separado se pueden mezclar. El antisuero, que es un aspecto del anticuerpo policlonal, se puede preparar inmunizando animales con el antígeno deseado y recuperando suero de los animales de acuerdo con un método convencional.

Los anticuerpos conjugados con diversas moléculas tales como polietilenglicol (PEG) también se
 30 pueden utilizar como variantes del anticuerpo.

El anticuerpo, etc. de la presente invención puede ser cualquier conjugado formado por estos anticuerpos con otras moléculas a través de ligadores (inmunoconjugados). Un complejo anticuerpo-
 fármaco en el que el anticuerpo se conjuga con un material radiactivo o un compuesto (fármaco) que tiene acción farmacológica puede incluir ADC (conjugado anticuerpo-fármaco) (Methods Mol Biol. (2013) 1045:
 35 1-27).

El anticuerpo, etc. de la presente invención puede ser además cualquiera de los anticuerpos conectados a otros polipéptidos funcionales. Un ejemplo de dicho complejo anticuerpo-péptido es un complejo del anticuerpo y un polipéptido de unión a albúmina (Protein Eng Des Sel. (2012) (2): 81-8).

(4-8) Purificación del anticuerpo y fragmento de unión a antígeno del anticuerpo

El anticuerpo resultante y el fragmento de unión a antígeno del anticuerpo se pueden purificar hasta que sean homogéneos para no contener materiales distintos del anticuerpo, etc. Se pueden utilizar métodos comunes de separación y purificación de proteínas para la separación y purificación del anticuerpo y el fragmento de unión a antígeno del anticuerpo.

El anticuerpo se puede separar y purificar mediante metodologías seleccionadas o combinadas adecuadamente, por ejemplo, columnas de cromatografía, filtros, ultrafiltración, precipitación por salado, diálisis, electroforesis en gel de poliacrilamida preparativa y enfoque isoeléctrico, aunque el método de separación y purificación no está limitado.

El método de separación y purificación se lleva a cabo preferentemente, por ejemplo, mediante la preparación de un vector de expresión usando una secuencia de ADN que codifica una etiqueta His o una etiqueta FLAG agregada al extremo carboxilo de una región variable de anticuerpo, transformación de células con este vector, y luego el cultivo de las células para expresar el anticuerpo y el fragmento de unión a antígeno del anticuerpo, y la extracción del sobrenadante del cultivo después de la finalización del cultivo, seguida de purificación usando cromatografía de afinidad metálica (por ejemplo, Ni o Co), columnas de anticuerpos anti-etiqueta FLAG, filtración en gel o cromatografía de intercambio iónico.

El anticuerpo expresado y los fragmentos de unión a antígeno del anticuerpo que contienen una secuencia de aminoácidos que codifica una etiqueta tal como una etiqueta His o una etiqueta FLAG también están comprendidos por el antígeno, etc. de la presente invención o la molécula de la presente invención.

(4-9) Moléculas multiespecíficas y moléculas biespecíficas

Los ejemplos de métodos para preparar la molécula biespecífica y la molécula multiespecífica de la presente invención incluyen un método que implica introducir plásmidos de expresión en células hospederas para provocar expresión transitoria, un método que implica introducir plásmidos en células hospederas y luego seleccionar una línea celular de expresión estable mediante selección de fármaco para provocar expresión permanente, un método que implica síntesis sin células y un método que implica preparar anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno mediante cualquiera de los métodos descritos anteriormente y luego enlazar químicamente estos anticuerpos o fragmentos mediante el uso de un ligador peptídico sintético.

En cuanto a la preparación de moléculas biespecíficas mediante el uso de regiones variables de anticuerpo, los ejemplos incluyen un método que implica conectar dos anticuerpos monocatenario (scFv) mediante un ligador peptídico (scFv en tándem), un método que implica el apareamiento cruzado de dominios de dos anticuerpos que difieren en especificidad, y formar un dímero mediante un enlace no covalente (diacuerpo), un método que implica el apareamiento cruzado de dominios de dos anticuerpos que difieren en especificidad y formar una cadena simple (diacuerpo monocatenario), y un método que implica preparar diacuerpos monocatenario y luego formar un dímero mediante un enlace no covalente (TandAb, US7129330B2).

La presente invención también proporciona un gen que codifica el anticuerpo de la presente invención o fragmento de unión a antígeno del anticuerpo, o una variante del antígeno, etc., un vector recombinante que tiene un inserto del gen, una célula transfectada con el gen o vector y una célula que produce el anticuerpo de la presente invención.

5

5. Composiciones farmacéuticas

La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-CD3 o fragmento de unión a antígeno del mismo, o la variante del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, y/o la molécula de la presente invención que comprende cualquiera de ellos, por ejemplo, la molécula multiespecífica.

10

En la presente invención, el tratamiento y/o prevención de una enfermedad incluye, de modo no limitante, la prevención del inicio de la enfermedad, la supresión o inhibición del avance o avance de la misma, el alivio de uno o dos o más síntomas exhibidos por un individuo afectado por la enfermedad, la supresión o remisión del avance o avance de la misma, y el tratamiento o prevención de una enfermedad secundaria, etc. En el caso de la molécula, los ejemplos de enfermedades incluyen cánceres.

15

La composición farmacéutica de la presente invención puede comprender una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz del anticuerpo anti-CD3 o fragmento de unión a antígeno del anticuerpo y un diluyente, vehículo, solubilizante, emulsionante, conservante y/o aditivo farmacéuticamente aceptable.

"Cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz" significa una cantidad que tiene efectos terapéuticos o profilácticos sobre una enfermedad particular mediante una forma de dosificación y una vía de administración particulares.

20

La composición farmacéutica de la presente invención puede comprender materiales para cambiar, mantener o retener el pH, la presión osmótica, la viscosidad, la transparencia, el color, la tonicidad, la esterilidad o la estabilidad, solubilidad, liberación sostenida, absortividad, permeabilidad, forma de dosificación, resistencia, propiedades, forma, etc., de la composición o el anticuerpo comprendido en esta (en lo sucesivo, denominados "materiales farmacéuticos"). Los materiales farmacéuticos no están particularmente limitados siempre y cuando los materiales sean farmacéuticamente aceptables. Por ejemplo, la toxicidad baja o no tóxica es una propiedad preferentemente poseída por estos materiales farmacéuticos.

25

Los ejemplos de materiales farmacéuticos incluyen, de modo no limitante, los siguientes: aminoácidos tales como glicina, alanina, glutamina, asparagina, histidina, arginina y lisina; agentes antimicrobianos; antioxidantes tales como ácido ascórbico, sulfato de sodio y bisulfito de sodio; amortiguadores tales como amortiguadores de fosfato, citrato o borato, bicarbonato de sodio y soluciones de Tris-HCl; rellenos tales como manitol y glicina; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA); agentes de formación de complejos tales como cafeína, polivinilpirrolidina, β -ciclodextrina e hidroxipropil- β -ciclodextrina; agentes espesantes tales como glucosa, manosa y dextrina; hidrocarburos tales como monosacáridos, disacáridos, glucosa, manosa y dextrina; agentes colorantes; correctores; diluyentes; emulsionantes; polímeros hidrófilos tales como

30

35

polivinilpirrolidina; polipéptidos de bajo peso molecular; contraiones formadores de sales; antisépticos tales como cloruro de benzalconio, ácido benzoico, ácido salicílico, timerosal, alcohol feniletílico, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, ácido sórbico, y peróxido de hidrógeno; disolventes tales como glicerina, propilenglicol, y polietilenglicol; alcoholes de azúcar tales como manitol y sorbitol; agentes de suspensión; 5 agentes tensoactivos tales como PEG, éster de sorbitano, polisorbato 20 y polisorbato 80, tritón, trometamina, lecitina y colesterol; potenciadores de la estabilidad tales como sacarosa y sorbitol; potenciadores de la elasticidad tales como cloruro de sodio, cloruro de potasio, manitol y sorbitol; agentes de transporte; diluyentes; excipientes; y aditivos farmacéuticos.

La cantidad de estos materiales farmacéuticos añadidos es de 0.001 a 1000 veces, 10 preferentemente de 0.01 a 100 veces, y más preferentemente de 0.1 a 10 veces el peso del anticuerpo anti-CD3 o fragmento de unión a antígeno del mismo, o la variante del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, o una molécula de la presente invención tal como una molécula multiespecífica.

Un inmunoliposoma que comprende un anticuerpo anti-CD3 de la presente invención o un 15 fragmento de unión a antígeno del mismo, o una variante del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, o una molécula de la presente invención tal como una molécula multiespecífica, encapsulada en un liposoma, o una composición farmacéutica que comprende una forma de anticuerpo modificada que comprende el anticuerpo conjugado con un liposoma (Patente de EE.UU. Núm. 6,214,388, etc.) también se incluyen entre las composiciones farmacéuticas de la presente invención.

Los excipientes o portadores no están particularmente limitados siempre y cuando sean materiales 20 líquidos o sólidos que se utilizan habitualmente en agua inyectable, solución salina, fluidos cerebroespinales artificiales y otras preparaciones para administración oral o parenteral. Los ejemplos de solución salina pueden incluir solución salina neutra y solución salina que contiene albúmina sérica.

Los ejemplos de amortiguadores pueden incluir un amortiguador Tris ajustado para llevar el pH final de la composición farmacéutica a 7.0 a 8.5, un amortiguador de acetato ajustado para llevar el pH final 25 a 4.0 a 5.5, un amortiguador de citrato ajustado para llevar el pH final a 5.0 a 8.0 y un amortiguador de histidina ajustado para llevar el pH final a 5.0 a 8.0.

Una composición farmacéutica de la presente invención es un sólido, un líquido o una suspensión. Otro ejemplo de una composición farmacéutica de la presente invención es una preparación liofilizada. Las preparaciones liofilizadas se pueden formar utilizando un excipiente tal como sacarosa.

La vía de administración para una composición farmacéutica de la presente invención puede ser 30 cualquiera de administración enteral, administración local o administración parenteral, y preferentemente se selecciona dependiendo de la enfermedad blanco. Los ejemplos específicos incluyen administración intravenosa, administración intraarterial, administración intramuscular, administración intradérmica, administración hipodérmica, administración intraperitoneal, administración transdérmica, administración 35 intraósea y administración intraarticular.

La composición de la composición farmacéutica se puede determinar en función del método de administración, la afinidad de unión del anticuerpo para la proteína CD3, etc.

La dosis de un anticuerpo anti-CD3 de la presente invención o fragmento de unión a antígeno del

mismo, o una variante del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, o una molécula de la presente invención tal como una molécula multiespecífica se puede determinar en función de la especie del individuo, el tipo de enfermedad, los síntomas, el sexo, la edad, las afecciones preexistentes, la afinidad de unión del anticuerpo por la proteína CD3 o su actividad biológica y otros factores. Por lo general, se puede administrar una dosis de 0.01 a 1000 mg/kg, preferentemente de 0.1 a 100 mg/kg, una vez al día durante 180 días o dos o tres o más veces al día.

Los ejemplos de formas para la composición farmacéutica incluyen inyecciones (que incluyen preparaciones liofilizadas y gotas), supositorios, preparaciones de absorción transnasal, preparaciones de absorción transdérmica, formulaciones sublinguales, cápsulas, comprimidos, ungüentos, gránulos, aerosoles, píldoras, polvos, suspensiones, emulsiones, gotas oftálmicas y formulaciones de implantes biológicos.

Un anticuerpo anti-CD3 de la presente invención o fragmento de unión a antígeno del mismo, o una variante del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, y/o una molécula de la presente invención que comprende cualquiera de ellos tal como molécula multiespecífica (en lo sucesivo, denominado "anticuerpo anti-CD3, etc.") se puede utilizar en combinación con otro fármaco. El anticuerpo anti-CD3, etc. o la composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-CD3, etc. como ingrediente activo se puede administrar de forma simultánea o separada del otro fármaco, es decir, una composición farmacéutica que comprende un fármaco distinto del anticuerpo anti-CD3, etc. como ingrediente activo. Por ejemplo, la composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-CD3, etc. como ingrediente activo puede administrarse después de la administración del otro fármaco, o el otro fármaco puede administrarse después de la administración de la composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-CD3, etc. como ingrediente activo. Alternativamente, la composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-CD3, etc. como ingrediente activo y el otro fármaco se puede administrar de forma simultánea. En la presente invención, un caso en el que el anticuerpo anti-CD3, etc. y el otro fármaco están contenidos como ingredientes activos en una única composición farmacéutica y un caso en el que estos ingredientes activos están contenidos por separado en una pluralidad de composiciones farmacéuticas están incluidos en el alcance de la "composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-CD3, etc. y otro fármaco". En la presente invención, la "composición farmacéutica" tiene el mismo significado que una "composición farmacéutica en la que el anticuerpo anti-CD3, etc. se administrará en combinación con otro fármaco".

En la presente invención, la frase "administrado en combinación" utilizada para el anticuerpo anti-CD3, etc. y el otro fármaco significa que el anticuerpo anti-CD3, etc. y el otro fármaco se introducen en el cuerpo de un receptor dentro de un período determinado. Se puede administrar una única preparación que contiene el anticuerpo anti-CD3, etc. y el otro fármaco, o el anticuerpo anti-CD3, etc. y el otro fármaco se puede formular y administrar por separado como preparaciones separadas. En el caso de preparaciones separadas, el momento de administración no está particularmente limitado, y las preparaciones pueden administrarse simultáneamente o pueden administrarse en momentos diferentes o en días diferentes de manera alterna. En un caso en el que el anticuerpo anti-CD3, etc. y el otro fármaco se administran por separado en momentos diferentes o en días diferentes, el orden de administración no está particularmente

limitado. Dado que las preparaciones separadas generalmente se administran de acuerdo con sus respectivos métodos de administración, la frecuencia de administración puede ser la misma o diferente. Además, las preparaciones separadas pueden administrarse mediante el mismo método de administración (vía de administración) o pueden administrarse mediante diferentes métodos de administración (vías de administración). No es necesario que el anticuerpo anti-CD3, etc. y el otro fármaco estén presentes en el cuerpo simultáneamente, y es suficiente que el anticuerpo anti-CD3, etc. y el otro fármaco se introduzcan en el cuerpo durante un determinado período de tiempo (por ejemplo, durante 1 mes, preferentemente durante 1 semana, más preferentemente durante varios días, incluso más preferentemente durante 1 día). Alternativamente, cuando se administra uno de los ingredientes activos, el otro ingrediente activo puede haber desaparecido del cuerpo.

Los ejemplos de formas de dosificación para la "composición farmacéutica en la que se administrará el anticuerpo anti-CD3, etc. en combinación con el otro fármaco" pueden incluir 1) la administración de una única preparación que contiene el anticuerpo anti-CD3, etc. y el otro fármaco, 2) la administración simultánea a través de la misma vía de administración de dos preparaciones obtenidas mediante la formulación separada del anticuerpo anti-CD3, etc. y el otro fármaco, 3) la administración de manera alterna a través de la misma vía de administración de dos preparaciones obtenidas mediante la formulación separada del anticuerpo anti-CD3, etc. y el otro fármaco, 4) la administración simultánea a través de diferentes vías de administración de dos preparaciones obtenidas mediante la formulación separada del anticuerpo anti-CD3, etc. y el otro fármaco, y 5) la administración de manera alterna a través de diferentes vías de administración de dos preparaciones obtenidas mediante la formulación separada del anticuerpo anti-CD3, etc. y el otro fármaco. La dosis, intervalo de dosificación, forma de dosificación, preparación, etc., de la "composición farmacéutica en la que se administrará el anticuerpo anti-CD3, etc. en combinación con el otro fármaco" depende de la composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-CD3, etc., de modo no limitante.

Una composición farmacéutica formulada en dos preparaciones diferentes puede estar en forma de un kit que contiene estas preparaciones.

En la presente invención, la "combinación" del anticuerpo anti-CD3, etc. y el otro fármaco significa que el anticuerpo anti-CD3, etc. y el otro fármaco se "administran en combinación".

También se puede utilizar un fármaco adicional en la combinación o la composición farmacéutica de la presente invención.

La presente invención proporciona un método para tratar o prevenir enfermedades relacionadas con CD3, el uso del anticuerpo de la presente invención para preparar una composición farmacéutica para el tratamiento o prevención de las enfermedades y el uso del anticuerpo de la presente invención para tratar o prevenir las enfermedades. La presente invención también comprende un kit para tratamiento o prevención que comprende el anticuerpo de la presente invención.

Ejemplos

La presente invención se describirá ahora con más detalle con referencia a ejemplos. Sin embargo,

la presente invención no queda limitada a estos ejemplos. Los procedimientos relacionados con la manipulación génica en los ejemplos a continuación se realizaron de acuerdo con los métodos descritos en "Molecular Cloning" (Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), o utilizando reactivos o kits comercialmente disponibles de acuerdo con los manuales de instrucciones, a menos que se especifique lo contrario.

(Ejemplo 1) Preparación de anticuerpo de rata anti-CD3 humana

1)-1 Diseño del vector de expresión de CD3εδ humana

Se preparó un vector de control pcDNA3.1-DEST modificado genéticamente como un vector de destino utilizando el sistema de conversión de vectores Gateway (Thermo Fisher Scientific Inc.). Un ADNc que codifica la proteína CD3ε humana (secuencia de referencia de NCBI: NP_000724.1) que se muestra en la Figura 1 (SEQ ID NO: 1) se compró a Sino Biological Inc. y se clonó en el vector pcDNA3.1-DEST usando la mezcla de enzimas de clonación Gateway LR (Thermo Fisher Scientific Inc.) para construir hCD3ε-pcDNA3.1. Un ADNc que codifica la proteína CD3δ humana (NP_000723.1) que se muestra en la Figura 2 (SEQ ID NO: 2) se amplificó mediante PCR usando un ADNc derivado de linfocitos T humanos como una plantilla de acuerdo con un método conocido por los expertos en la materia y se clonó en pcDNA3.1 (+) (Thermo Fisher Scientific Inc.) para construir un vector de expresión hCD3δ-pcDNA3.1. Para la preparación a gran escala de cada vector de expresión, se utilizó Endofree Plasmid Giga Kit (Qiagen N.V.).

1)-2 Inmunización

Para la inmunización, se utilizaron ratas hembra WKY/lzm (Japan SLC, Inc.). Primero, ambos muslos inferiores de cada rata fueron pretratados con hialuronidasa (Sigma-Aldrich Corp.). Luego, los vectores de expresión de hCD3ε-pcDNA3.1 y hCD3δ-pcDNA3.1 preparados en el Ejemplo 1) - 1 se inyectaron por vía intramuscular en estos sitios. Posteriormente, la electroporación *in vivo* de estos sitios se llevó a cabo utilizando ECM830 (BTX) y un electrodo de dos agujas. La misma electroporación *in vivo* que la anterior se repitió aproximadamente una vez cada dos semanas. Luego, los ganglios linfáticos o los bazo se extrajeron de las ratas y se utilizaron en la preparación del hibridoma.

1)-3 Preparación del hibridoma

Las células de ganglios linfáticos o las células del bazo se fusionaron eléctricamente con células SP2/0-ag14 de mieloma de ratón (ATCC, No. CRL-1 581) utilizando LF301 Cell Fusion Unit (BEX Co., Ltd.). Las células fusionadas se diluyeron con medio de selección D de ClonaCell-HY (StemCell Technologies Inc.) y se cultivaron. Se recuperaron colonias de hibridomas para preparar hibridomas monoclonales. Cada colonia de hibridoma así recuperada se cultivó usando medio de selección E de ClonaCell-HY (StemCell Technologies Inc.), y el sobrenadante de cultivo de hibridoma resultante se utilizó para detectar un hibridoma que produce anticuerpos anti-CD3 humana.

1)-4 Detección de anticuerpos mediante ELISA en células

1)-4-1 Preparación de células que expresan genes del antígeno para ELISA en células

Las células HEK293 α (línea celular derivada de HEK293 de expresión estable que expresa integrina α v e integrina β 3) se ajustaron a 7.5×10^5 células/mL en un medio DMEM que contenía FBS. hCD3 ϵ -pcDNA3.1 al 10% y hCD3 δ -pcDNA3.1, o se transfectó un pcDNA3.1-DEST de control a estas de acuerdo con los procedimientos de transfección usando Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc.). Las células resultantes se dispensaron en una cantidad de 100 μ L/pocillo a una placa de 96 pocillos (Corning Inc.) y se cultivaron durante la noche a 37 °C en condiciones de CO₂ al 5% en un medio DMEM que contenía FBS al 10%. Las células transfectadas resultantes se utilizaron en el estado unido en ELISA en células.

1)-4-2 ELISA en células

Después de retirar el sobrenadante de cultivo de las células HEK293 α transfectadas por vector de expresión preparadas en el Ejemplo 1)-4-1, se agregó cada sobrenadante de cultivo de hibridoma a las células HEK293 α transfectadas por hCD3 ϵ -pcDNA3.1- y hCD3 δ -pcDNA3.1- o pcDNA3.1-DEST, y la placa se dejó en reposo a 4 °C durante 1 hora. Las células en los pocillos se lavaron una vez con PBS que contenía FBS al 5%. Luego, se añadió IgG anti-rata y HRP ligado a anticuerpo completo de cabra (GE Healthcare Bio-Sciences Corp.) diluidos 500 veces con PBS que contenía FBS al 5%, y la placa se dejó en reposo a 4 °C durante 1 hora. Las células en los pocillos se lavaron dos veces con PBS que contenía FBS al 5%. Luego, se añadió una solución cromogénica OPD (solución OPD (diclorhidrato de o-fenilendiamina (Wako Pure Chemicals Industries, Ltd.) y H₂O₂ disueltos a concentraciones de 0.4 mg/mL y 0.6% (v/v), respectivamente, en citrato trisódico 0.05 M y fosfato de hidrógeno disódico dodecahidratado 0.1 M, pH 4.5)) a una concentración de 100 μ L/pocillo. La reacción de color se realizó con agitación ocasional y se detuvo mediante la adición de HCl 1 M a una concentración de 100 μ L/pocillo. Luego, la absorbancia se midió a 490 nm usando un lector de placas (ENVISION; PerkinElmer, Inc.). Para seleccionar un hibridoma que produce una unión de anticuerpo a CD3 humana expresada en la superficie de la membrana celular, se seleccionaron hibridomas que produjeron un sobrenadante de cultivo que exhibe mayor absorbancia para las células HEK293 α transfectadas por vector de expresión hCD3 ϵ -pcDNA3.1 y hCD3 δ -pcDNA3.1 en comparación con las células HEK293 transfectadas por PDEST de control como hibridomas positivos para la producción de anticuerpos anti-CD3 humana.

1)-5 Detección de anticuerpos basada en la activación de linfocitos T humanos

El anticuerpo anti-CD3 obtenido a partir de hibridoma se evaluó para su activación de linfocitos T con la detección de una etiqueta de activación de CD69 como un índice. Línea de linfocitos T humanos de células Jurkat (ATCC, No. TIB-152) se ajustaron a una concentración de 5×10^6 células/mL en un medio RPMI1640 que contenía FBS y se añadieron a una concentración de 100 μ L/pocillo a una placa de 96 pocillos. Después de retirar el sobrenadante mediante centrifugación, se agregó el sobrenadante de cultivo de cada hibridoma positivo para la producción de anticuerpo anti-CD3 humana seleccionado por el ELISA

en células en el Ejemplo 1) -4 o un anticuerpo de control de isotipo IgG de rata (R&D Systems, Inc.) a una concentración final de 5 µg/mL a las células Jurkat, y la placa se dejó en reposo a 37 °C durante 30 minutos. Luego, se agregó el agente de entrecruzamiento específico del fragmento Fcγ IgG anti-rata de cabra (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) a una concentración final de 10 µg/pocillo y las células se cultivaron durante la noche a 37 °C en condiciones de CO₂ al 5%. Al día siguiente, se retiró el sobrenadante y las células en los pocillos se lavaron una vez con PBS que contenía FBS al 5%. Luego, se añadió anticuerpo anti-CD69 humana de ratón PE (BD Biosciences) a una concentración de 20 µL/pocillo, y la placa se dejó en reposo a 4 °C durante 30 minutos. Las células en los pocillos se lavaron dos veces con PBS que contenía FBS al 5% y luego se volvieron a suspender en PBS que contenía FBS al 5%, seguido de detección usando un citómetro de flujo (FC500; Beckman Coulter Inc.). Los datos se analizaron utilizando Flowjo (Tree Star Inc.). La intensidad de fluorescencia de PE se graficó en un histograma. Los hibridomas que produjeron una muestra que exhibió un cambio a una intensidad de fluorescencia más fuerte en el histograma de intensidad de fluorescencia de PE que en el histograma de intensidad de fluorescencia del anticuerpo de control de isotipo IgG de rata se seleccionaron como hibridomas productores de anticuerpos anti-CD3 humana positivos para la capacidad de activar linfocitos T humanos.

1)-6 Detección basada en la actividad de unión selectiva a CD3 humana o de mono mediante citometría de flujo

1)-6-1 Preparación de células que expresan genes del antígeno humano

Se agregaron células Lenti-X293T (Takara Bio Inc., # de cat. 632180) a una densidad de 5.3×10^4 células/cm² a un matraz de 225 cm² y se cultivaron durante la noche a 37 °C en condiciones de CO₂ al 5% en un medio DMEM que contenía FBS al 10%. Al día siguiente, hCD3ε-pcDNA3.1 y hCD3δ-pcDNA3.1 o un pcDNA3.1-DEST de control se transfectó a las células Lenti-X293T usando Lipofectamine 2000, y las células se cultivaron adicionalmente durante la noche a 37 °C en condiciones de CO₂ al 5%. Al día siguiente, las células Lenti-X293T transfectadas por vector de expresión se trataron con TrypLE Express (Thermo Fisher Scientific Inc.), se lavaron con DMEM que contenía FBS al 10% y luego se ajustaron a una concentración de 5×10^6 células/mL en PBS que contenía FBS al 5%. La suspensión celular resultante se utilizó en el análisis de citometría de flujo.

1)-6-2 Análisis de citometría de flujo de la actividad de unión a CD3 humana

La especificidad de unión a CD3 humana del anticuerpo producido por cada hibridoma determinado como positivo para la capacidad de activar linfocitos T humanos en el Ejemplo 1) -5 se confirmó adicionalmente mediante citometría de flujo. Cada suspensión de células Lenti-X293T preparada en el Ejemplo 1)-6-1 se añadió a una concentración de 100 µL/pocillo a una microplaca de 96 pocillos con fondo en U y se centrifugó para retirar el sobrenadante. Las células Lenti-X293T transfectadas con hCD3ε-pcDNA3.1- y hCD3δ-pcDNA3.1- o las células Lenti-X293T transfectados con pcDNA3.1-DEST se suspendieron mediante la adición del sobrenadante de cultivo de hibridoma y se dejaron en reposo a 4 °C durante 1 hora. Las células se lavaron una vez con PBS que contenía FBS al 5%, luego se suspendieron

mediante la adición de conjugado FITC de IgG anti-rata (Sigma-Aldrich Corp.) diluido 500 veces con PBS que contenía FBS al 5% y se dejaron en reposo a 4 °C durante 30 minutos. Las células se lavaron dos veces con PBS que contenía FBS al 5% y luego se volvieron a suspender en PBS que contenía FBS al 5% y 2 µg/mL de 7-aminoactinomicina D (Molecular Probes, Inc.), seguido de detección usando un citómetro de flujo. Los datos se analizaron utilizando Flowjo. Después de la eliminación de células muertas positivas para 7-aminoactinomicina D mediante compartimentación, se graficó la intensidad de fluorescencia FITC de células vivas en un histograma. Los hibridomas que produjeron una muestra que exhibió un cambio a una intensidad de fluorescencia más fuerte en el histograma de las células Lenti-X293T transfectadas con hCD3ε-pcDNA3.1- y hCD3δ-pcDNA3.1- que en el histograma de intensidad de fluorescencia de las células Lenti-X293T transfectadas con pcDNA3.1-DEST de control se seleccionaron como hibridomas que producen anticuerpos que se unen a CD3 humana.

1)-6-3 Diseño del vector de expresión CD3εδ de ADNc de mono

Se amplificaron ADNc que codifican la proteína CD3ε de mono (secuencia de referencia NCBI: NP_001270544.1) y la proteína CD3δ de mono (Secuencia de referencia de NCBI: NP_001274617.1) mediante PCR usando un ADNc derivado de linfocitos T de mono como plantilla de acuerdo con un método conocido por los expertos en la materia, y se clonaron en pcDNA3.1(+) (Thermo Fisher Scientific Inc.) para construir vectores de expresión cynoCD3ε-pcDNA3.1 y cynoCD3δ-pcDNA3.1.

1)-6-4 Preparación de células que expresan genes del antígeno de mono

Se inocularon células Lenti-X293T a una densidad de 5.3×10^4 células/cm² a un matraz de 225 cm² y se cultivaron durante la noche a 37 °C en condiciones de CO₂ al 5% en un medio DMEM que contenía FBS al 10%. Al día siguiente, cynoCD3ε-pcDNA3.1 y cynoCD3δ-pcDNA3.1 o un pcDNA3.1-DEST de control se transfectó a las células Lenti-X293T usando Lipofectamine 2000, y las células se cultivaron adicionalmente durante la noche a 37 °C en condiciones de CO₂ al 5%. Al día siguiente, las células Lenti-X293T transfectadas por vector de expresión se trataron con TrypLE Express, se lavaron con DMEM que contenía FBS al 10% y luego se ajustaron a una concentración de 5×10^6 células/mL en PBS que contenía FBS al 5%. La suspensión celular resultante se utilizó en el análisis de citometría de flujo.

1)-6-5 Análisis de citometría de flujo de la actividad de unión a CD3 de mono

La especificidad de unión a CD3 de mono del anticuerpo producido por cada hibridoma determinado para producir la unión del anticuerpo a CD3 humana en el Ejemplo 1)-6-2 se confirmó adicionalmente mediante citometría de flujo. Cada suspensión de células Lenti-X293T preparada en el Ejemplo 1)-6-4 se añadió a una concentración de 100 µL/pocillo a una microplaca de 96 pocillos con fondo en U y se centrifugó para retirar un sobrenadante. Las células Lenti-X293T transfectadas con cynoCD3ε-pcDNA3.1- y cynoCD3δ-pcDNA3.1- o las células Lenti-X293T transfectados con pcDNA3.1-DEST se suspendieron mediante la adición del sobrenadante de cultivo de hibridoma y se dejaron en reposo a 4 °C durante 1 hora. Las células se lavaron una vez con PBS que contenía FBS al 5%, luego se suspendieron

mediante la adición de conjugado FITC de IgG anti-rata diluido 500 veces con PBS que contenía FBS al 5% y se dejaron en reposo a 4 °C durante 30 minutos. Las células se lavaron dos veces con PBS que contenía FBS al 5% y luego se volvieron a suspender en PBS que contenía FBS al 5% y 2 µg/mL de 7-aminoactinomicina D, seguido de detección usando un citómetro de flujo. Los datos se analizaron utilizando Flowjo. Después de la eliminación de células muertas positivas para 7-aminoactinomicina D mediante compartimentación, se graficó la intensidad de fluorescencia FITC de células vivas en un histograma. Los hibridomas que produjeron una muestra que exhibe un cambio a una intensidad de fluorescencia más fuerte en el histograma de las células Lenti-X293T transfectadas con cynoCD3ε-pcDNA3.1- y cynoCD3δ-pcDNA3.1- que en el histograma de intensidad de fluorescencia de las células Lenti-X293T transfectadas con PDEST de control se seleccionaron como hibridomas que producen anticuerpos que se unen a CD3 de mono.

1)-6-6 Preparación de células que expresan genes CD3δ humanos

Se inocularon células Lenti-X293T a una densidad de 5.3×10^4 células/cm² a un matraz de 225 cm² y se cultivaron durante la noche a 37 °C en condiciones de CO₂ al 5% en un medio DMEM que contenía FBS al 10%. Al día siguiente, se transfectó hCD3δ-pcDNA3.1 o un pcDNA3.1-DEST de control a las células Lenti-X293T usando Lipofectamina 2000 y las células se cultivaron adicionalmente durante la noche a 37 °C en condiciones de CO₂ al 5%. Al día siguiente, las células Lenti-X293T transfectadas por vector de expresión se trataron con TrypLE Express, se lavaron con DMEM que contenía FBS al 10% y luego se ajustaron a una concentración de 5×10^6 células/mL en PBS que contenía FBS al 5%. La suspensión celular resultante se utilizó en el análisis de citometría de flujo.

1)-6-7 Análisis de citometría de flujo de la actividad de unión contra CD3δ humano

La especificidad de unión a CD3δ humana del anticuerpo producido por cada hibridoma determinado para producir la unión del anticuerpo a CD3 de mono en el Ejemplo 1)-6-5 se confirmó adicionalmente mediante citometría de flujo. Cada suspensión de células Lenti-X293T preparada en el Ejemplo 1)-6-6 se añadió a una concentración de 100 µL/pocillo a una microplaca de 96 pocillos con fondo en U y se centrifugó para retirar un sobrenadante. Las células Lenti-X293T transfectadas con hCD3δ-pcDNA3.1o las células Lenti-X293T transfectadas con pcDNA3.1-DEST se suspendieron mediante la adición del sobrenadante de cultivo de hibridoma y se dejaron en reposo a 4 °C durante 1 hora. Las células se lavaron una vez con PBS que contenía FBS al 5%, luego se suspendieron mediante la adición de conjugado FITC de IgG anti-rata diluido 500 veces con PBS que contenía FBS al 5% y se dejaron en reposo a 4 °C durante 30 minutos. Las células se lavaron dos veces con PBS que contenía FBS al 5% y luego se volvieron a suspender en PBS que contenía FBS al 5% y 2 µg/mL de 7-aminoactinomicina D, seguido de detección usando un citómetro de flujo. Los datos se analizaron utilizando Flowjo. Después de la eliminación de células muertas positivas para 7-aminoactinomicina D mediante compartimentación, se graficó la intensidad de fluorescencia FITC de células vivas en un histograma. Los hibridomas que produjeron una muestra que exhibió un cambio a una intensidad de fluorescencia más fuerte en el

histograma de las células Lenti-X293T transfectadas con hCD3δ-pcDNA3.1 que en el histograma de intensidad de fluorescencia de las células Lenti-X293T transfectadas con pcDNA3.1-DEST de control se excluyeron como hibridomas que producen anticuerpos que se unen a CD3δ humano.

5 1)-6-8 Análisis de citometría de flujo de la actividad de unión a líneas de linfocitos T de mono

La especificidad de unión a la línea de linfocitos T de mono del anticuerpo producido por cada hibridoma que produce anticuerpos que no se excluyó en el Ejemplo 1)-6-7 se confirmó adicionalmente mediante citometría de flujo. Una línea de linfocitos T de mono cinomolgo HSC-F (JCRB Cell Bank, No. JCRB1164) se ajustó a una concentración de 5×10^6 células/mL en un medio RPMI1640 que contenía FBS y se añadió a una concentración de 100 µL/pocillo a una placa de 96 pocillos. Después de retirar el sobrenadante mediante centrifugación, se agregó el sobrenadante de cultivo del hibridoma productor de anticuerpos que no se excluyó en el Ejemplo 1)-5- 7, o un anticuerpo de control de isotipo IgG de rata a las células HSC-F, y la placa se dejó en reposo a 4 °C durante 1 hora. Luego, se retiró el sobrenadante y las células en los pocillos se lavaron una vez con PBS que contenía FBS al 5%, luego se suspendieron mediante la adición de conjugado FITC de IgG anti-rata diluido 500 veces con PBS que contenía FBS al 5% y se dejaron en reposo a 4 °C durante 1 hora. Las células se lavaron tres veces con PBS que contenía FBS al 5% y luego se volvieron a suspender en PBS que contenía FBS al 5% y 2 µg/mL de 7-aminoactinomicina D, seguido de detección usando un citómetro de flujo. Los datos se analizaron utilizando Flowjo. Después de la eliminación de células muertas positivas para 7-aminoactinomicina D mediante compartimentación, se graficó la intensidad de fluorescencia FITC de células vivas en un histograma. Los hibridomas que produjeron una muestra que exhibió un cambio a una intensidad de fluorescencia más fuerte en el histograma de intensidad de fluorescencia de FITC que en el histograma de intensidad de fluorescencia del anticuerpo de control de isotipo IgG de rata se seleccionaron como hibridomas que producen anticuerpos que también se unen a la línea de linfocitos T de mono.

25 1)-7 Isotipificación de anticuerpos

C3-147 que sugiere la unión a CD3ε humana y de mono y también la unión a una línea de linfocitos T de mono, y que tiene la alta capacidad de activar linfocitos T humanos se seleccionó de entre los hibridomas productores de anticuerpos de rata anti-CD3 obtenidos en el Ejemplo 1-6, e identificados mediante isotipificación de anticuerpos. El isotipo se determinó usando el kit ELISA de isotipificación de inmunoglobulina de rata (BD Pharmingen). Como resultado, se confirmó que el isotipo del anticuerpo monoclonal de rata anti-CD3 C3-147 eran cadenas IgG2b y λ.

35 (Ejemplo 2) Estudio de la actividad de unión de anticuerpos monoclonales de rata anti-CD3 (C3-147) a CD3 humana

2)-1 Preparación de anticuerpos monoclonales a partir de sobrenadante de hibridoma

2)-1-1 Cultivo de hibridoma que produce C3-147

El anticuerpo monoclonal de rata anti-CD3 se purificó a partir del sobrenadante de cultivo de

hibridoma. Primero, se permitió que el hibridoma que produce C3-147 creciera a una cantidad suficiente en el medio de selección E de ClonaCell-HY (StemCell Technologies Inc.). Luego, el medio se reemplazó con un SFM de hibridoma (Thermo Fisher Scientific Inc.) que contenía 5 µg/mL de gentamicina (Thermo Fisher Scientific Inc.) complementado con FBS de IgG ultrabaja al 20% (Thermo Fisher Scientific Inc.),
5 seguido de cultivo durante 7 días. Este sobrenadante cultivado se recuperó y esterilizó a través de un filtro de 0.22 µm (Corning Inc.).

2)-1-2 Purificación

El anticuerpo se purificó mediante cromatografía de afinidad de proteína G a partir del
10 sobrenadante de cultivo de hibridoma preparado en el Ejemplo 2) -1-1. El anticuerpo se adsorbió en una columna de proteína G (GE Healthcare Bio-Sciences Corp.) y la columna se lavó con PBS, seguido de elución con una solución acuosa de glicina/ácido clorhídrico 0.1 M (pH 2.7). El producto eluido se ajustó a un pH de 7.0 a 7.5 mediante la adición de Tris-HCl 1 M (pH 9.0). Luego, el amortiguador se reemplazó con PBS usando UF centrífuga, dispositivo de filtración VIVASPIN20 (corte de peso molecular: UF30K,
15 Sartorius Japan K.K.) mientras que el anticuerpo se concentró y ajustó a una concentración de anticuerpo de 2 mg/mL. Finalmente, el concentrado se filtró a través de un filtro Minisart-Plus (Sartorius Japan K.K.) y se utilizó como una muestra purificada.

2)-2 Unión del anticuerpo de rata anti-CD3 obtenido (C3-147) a antígenos monocatenarios
20 humanos

2)-2-1 Preparación de antígenos monocatenarios CD3εγ humanos

Se obtuvo una secuencia de aminoácidos que codifica CD3ε o CD3γ de la estructura cristalina (PDBID: 1SY6) de un complejo de antígeno monocatenario CD3εγ humano OTK3 presentado al banco de
25 datos de proteínas. El mismo ligador peptídico compuesto por 26 aminoácidos que se informó en la referencia (Kim, K.S. et al., (2000) J. Mol. Biol. 302, 899-916) como un ligador para conectar el extremo carboxilo de CD3ε al extremo amino de CD3γ. El gen que codifica el antígeno monocatenario CD3εγ humano que se muestra en la Figura 3 (SEQ ID NO: 4) del Listado de Secuencias se sintetizó añadiendo sitios de restricción BamHI e HindIII a los extremos 5' y 3', respectivamente (GeneArt Gene Synthesis Service/Thermo Fisher Scientific Inc.). Un fragmento de aproximadamente 4.8 kb obtenido mediante
30 digestión de un plásmido pQE80L (Qiagen N.V.) con enzimas de restricción BamHI e HindIII se ligó con un fragmento de aproximadamente 0.6 kb obtenido mediante digestión del gen de antígeno monocatenario CD3εγ humana con BamHI e HindIII, usando Ligation High (Toyobo Co., Ltd.) para preparar un plásmido pQE80L-scCD3εγ para expresión en *E. coli*. La secuencia de aminoácidos del scCD3εγ resultante se describe en la Figura 4 (SEQ ID NO: 5) del listado de secuencias. *E. coli* BL21 (DE3) se transformó con el
35 plásmido pQE80L-scCD3εγ para expresión, y la colonia resultante se agregó a 1 L de MagicMedia (Invitrogen Corp.) usando matraces Ultra Yield TM (Thomson Instrument Company) y se cultivó en agitación a 250 rpm a 30 °C durante 21 horas. Las células bacterianas cultivadas de este modo se recuperaron. Las células bacterianas se alteraron usando un homogeneizador ultrasónico en presencia de una solución

amortiguadora Tris que contenía una solución Triton al 1% y se repitió el ciclo de congelación-descongelación. Finalmente, los cuerpos de inclusión se recuperaron mediante centrifugación a 15000 rpm a 4 °C durante 15 minutos. Los procedimientos desde el replegamiento de los cuerpos de inclusión hasta la purificación se realizaron de acuerdo con el enfoque de la referencia (Kjer-Nielsen et al. (2004) PNAS vol. 101, núm. 20, 7675-7680) excepto que el anticuerpo anti-CD3 utilizado en una columna de anticuerpos fue un anticuerpo monoclonal anti-CD de ratón OKT3 (Sgro, Toxicology 105 (1995), 23-29, Orthoclone, Janssen-Cilag) en lugar de 2C11 utilizado en la bibliografía.

2)-2-2 Medición de SPR de la actividad de unión a antígenos monocatenarios CD3εγ humanos

El anticuerpo se analizó para determinar su unión a antígeno usando BIAcore 3000 (GE Healthcare Bio-Sciences Corp.) mediante el método de captura, que implica capturar el anticuerpo como un ligando en un anticuerpo IgG anti-ratón inmovilizado y analizar el antígeno como un analito. El antígeno utilizado fue el CD3εγ humano preparado en el Ejemplo 2) -2-1. Aproximadamente 11000 RU del anticuerpo IgG antirratón (Mouse Antibody Capture Kit, GE Healthcare Bio-Sciences Corp.) se unió covalentemente a un chip sensor CM5 (GE Healthcare Bio-Sciences Corp.) mediante el método de acoplamiento de amina. De manera similar, este anticuerpo se inmovilizó en una célula de referencia. El amortiguador de corrimiento utilizado fue HBS-EP+ (HEPES 10 mM (pH 7.4), NaCl 0.15 M, EDTA 3 mM y agente tensoactivo P20 al 0.05%). El anticuerpo se añadió al chip inmovilizado con anticuerpo IgG anti-ratón durante aproximadamente 1 minuto y luego se capturó como un ligando. Luego, se añadieron 100 nM del antígeno a una velocidad de flujo de 30 µL/min durante 120 segundos y se controló la unión a antígeno. Se añadió glicina-HCl 10 mM (pH 1.7) como una solución regeneradora a una velocidad de flujo de 10 µL/min durante 3 minutos. Como resultado, la señal de unión de C3-147 después de 120 segundos fue 34 RU.

2)-3 Confirmación del sitio de unión a antígeno en el anticuerpo de rata anti-CD3 resultante (C3-147) mediante SPR

El método para confirmar un sitio de unión a antígeno se realizó de la misma manera que en el Ejemplo 2)-2-2. Como resultado, la señal de unión obtenida para C3-147 fue 34 RU. Por otro lado, un sitio de unión a antígeno en SP34 (BD Pharmingen), un anticuerpo anti-CD3 conocido en la materia, se confirmó de manera similar como un ejemplo comparativo. La señal de unión de 34 RU no se observó en SP34. Estos resultados indicaron que un sitio de unión en la superficie de CD3εγ reconocido por C3-147 es diferente del reconocido por SP34.

(Ejemplo 3) Secuenciación de ADNc que codifican regiones variables en anticuerpos de rata anti-CD3 (C3-147)

Los ADNc que codifican las regiones variables del anticuerpo de rata anti-CD3 (C3-147) se secuenciaron mediante el siguiente método.

3)-1 síntesis de ADNc

Los lisados celulares (Tris-HCl 50 mM (pH 7.5), LiCl 250 mM, EDTA 5 mM (pH 8), dodecilsulfato de litio al 0.5% (LiDS) y ditioneitol 2.5 mM (DTT)) del hibridoma que produce anticuerpo de rata anti-CD3 (C3-147) se mezclaron con microesferas magnéticas unidas a dT25 de oligo del kit DIRECT de ARNm Dynabeads (Thermo Fisher Scientific Inc.) de modo que el ARNm se unió a las microesferas magnéticas. A continuación, las perlas magnéticas se lavaron una vez cada una con solución de lavado A de ARNm (Tris-HCl 10 mM (pH 7.5), LiCl 0.15 M, EDTA 1 mM, LiDS 0.1% y Triton X-100 0.1%) y una solución para síntesis de ADNc (Tris-HCl 50 mM (pH 8.3), KCl 75 mM, MgCl₂ 3 mM, DTT 5 mM, dNTP 0.5 mM, Triton X-100 0.2% y 1.2 unidades de inhibidor de RNasa (Thermo Fisher Scientific Inc.). Luego, se sintetizó un ADNc usando una solución para la síntesis de ADNc complementada con 12 unidades de transcriptasa inversa SuperScript III (Thermo Fisher Scientific Inc.). Posteriormente, el ADNc se lavó con una solución de reacción de adición de cola 3' (fosfato de potasio 50 mM, MgCl₂ 4 mM, dGTP 0.5 mM, Triton X-100 al 0.2% y 1.2 unidades de inhibidor de RNasa), seguido de reacción de adición de cola 3' con una solución de reacción complementada con 48 unidades de Transferasa terminal, recombinante (Roche Applied Science).

3)-2 Amplificación y secuenciación de fragmentos génicos de región variable de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina de rata

Las perlas magnéticas se lavaron con una solución TE (Tris-HCl 10 mM (pH 7.5), EDTA 1 mM y Triton X-100 al 0.1%). Luego, los genes de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina de rata se amplificaron mediante PCR 5'-RACE. Específicamente, las perlas magnéticas se transfirieron a una solución de reacción de PCR (cebadores 0.2 µM, dNTP 0.2 mM y 0.25 unidades de PrimeSTAR HS DNA Polymerase (Takara Bio Inc.)) y se sometieron a 35 ciclos de reacción cada uno involucrando 94 °C durante 30 segundos y 68 °C durante 90 segundos. Los conjuntos de cebadores utilizados se describen a continuación.

Conjunto de cebadores PCR para amplificación génica de cadena pesada

Imprimación sensorial Nhe-polyC-S

5'-GCTAGCGCTACCGGACTCAGATCCCCCCCCCCCCDN-3'; Figura 5 (SEQ ID NO: 50)

Primer cebador antisentido rlgY-AS1

5'-TCACTGAGCTGGTGAGAGTGTAGAGCCC-3'; Figura 6 (SEQ ID NO: 51)

Segundo cebador antisentido rlgY-AS2

5'-TCACCGAGCTGCTGAGGGTGTAGAGCCC-3'; Figura 7 (SEQ ID NO: 52)

Conjunto de cebadores PCR para amplificación génica de cadena ligera

Imprimación sensorial Nhe-polyC-S2

5'-GCTAGCGCTACCGGACTCAGATCCCCCCCCCCCCDN-3'; Figura 8 (SEQ ID NO: 53)

Primer cebador antisentido rlgL-AS1

5'-TTCCACATCACTCGGGTAGAAATCAG-3'; Figura 9 (SEQ ID NO: 54)

Segundo cebador antisentido rlgY-AS2

5'-TAACACCAGGGTAGAAATCTGTCACCAT-3'; Figura 10 (SEQ ID NO: 55)

Se llevó a cabo el análisis de secuencias en las secuencias de nucleótidos de los fragmentos amplificados por la reacción de PCR. Los cebadores utilizados se describen a continuación.

Cebador sensorial rlgY-seq para secuenciación de cadena pesada

5 5'-CTGGCTCAGGGAAATAGCC-3'; Figura 11 (SEQ ID NO: 56)

Cebador antisentido rlgL-seq1 para secuenciación de cadena ligera

5'-TCCCTGGAGCTCCTCAGT-3'; Figura 12 (SEQ ID NO: 57)

Cebador antisentido rlgL-seq2 para secuenciación de cadena ligera

5'-GCCTTGTCAGTCTTGAGC-3'; Figura 13 (SEQ ID NO: 58)

10 El análisis de secuencias se llevó a cabo utilizando un analizador de secuencia génica ("ABI PRISM 3700 DNA Analyzer; Applied Biosystems, Inc." o "Applied Biosystems 3730xl Analyzer; Applied Biosystems, Inc."). El sistema de secuenciación del ciclo del terminador de colorante con ADN polimerasa AmpliTaq (Life Technologies Corp.) y GeneAmp 9700 (Applied Biosystems, Inc.) se utilizaron en la reacción de secuenciación.

15 La secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada C3-147 determinada por el análisis de secuencia se describe en la Figura 14 (SEQ ID NO: 6), y su secuencia de aminoácidos se describe en la Figura 15 (SEQ ID NO: 7). La secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera C3-147 se describe en la Figura 16 (SEQ ID NO: 8), y su secuencia de aminoácidos se describe en la Figura 17 (SEQ ID NO: 9).

20 (Ejemplo 4) Preparación de scFv de rata anti-CD3 (C3E-7000) y su forma humanizada (C3E-7034)
 4)-1 Preparación de scFv de anticuerpo de rata anti-CD3 (C3-147)
 4)-1-1 Diseño del vector de expresión de scFv de anticuerpo de rata CD3 (pC3E-7000)

Un oligonucleótido de cadena homosenido (Figura 18 (SEQ ID NO: 10)) de un fragmento de ADN
 25 que tiene secuencias adicionales de 15 bases corriente arriba y corriente abajo de una secuencia de ADN que codifica un ligador que se insertará entre la región variable de cadena pesada (VH) y la región variable de cadena ligera (VL) de C3-147, y un oligonucleótido de cadena antisentido de este (Figura 19 (SEQ ID NO: 11)) se sintetizaron (Sigma-Aldrich Corp., Custom Oligo Synthesis Service) y se ajustaron a 100 pmol/μL. Luego, se mezclaron 20 μL cada uno de estos oligonucleótidos y se dejaron en reposo a 96 °C
 30 durante 10 minutos, a 70 °C durante 2 minutos, a 60 °C durante 2 minutos, a 40 °C durante 2 minutos, y a 30 °C durante 2 minutos para recocer para preparar un fragmento de ADN del ligador que se insertará entre VH y VL. A continuación, un fragmento de ADN amplificado por PCR para agregar una secuencia señal de cadena pesada de IgG humana, el fragmento de ADN (que se muestra en la Figura 14 (SEQ ID NO: 6)) de VH del anticuerpo de rata anti-CD3 C3-147 amplificado por PCR, el fragmento de ADN del ligador que se
 35 insertará entre VH y VL, y un fragmento de ADN amplificado por PCR en el que se agregó una secuencia de ADN que codifica una etiqueta FLAG-His a una región que contiene la secuencia de ADN VL C3-147 (que se muestra en la Figura 16 (SEQ ID NO: 8)) de modo que el etiqueta FLAG-His se ubicara en el extremo carboxilo, se ligaran con una estructura principal del vector derivada de un vector de expresión

pcDNA-3.3TOPO para células animales (Thermo Fisher Scientific Inc.) usando kit de clonación In-Fusion HD (Clontech Laboratories, Inc.) para preparar un vector de expresión scFv pC3E-7000 que contiene la secuencia de nucleótidos de la Figura 20 (SEQ ID NO: 14) en ORF.

5 4)-1-2 Expresión y purificación de scFv de rata anti-CD3 (C3E-7000)

Las células Expi293F (Thermo Fisher Scientific Inc.) se subcultivaron y cultivaron de acuerdo con el manual. El vector de expresión de scFv se transfectó a las células Expi293F en la fase de crecimiento logarítmico. El scFv se expresó transitoriamente, se filtró y luego se utilizó en la purificación. La purificación se llevó a cabo mediante dos etapas que implicaron cromatografía de afinidad con Ni usando His Trap Excel (GE Healthcare Bio-Sciences Corp.) y filtración en gel usando Superdex 200 increase (GE Healthcare Bio-Sciences Corp.). Se recuperó un pico correspondiente al peso molecular del monómero scFv y se utilizó como una muestra de proteína purificada. Para la purificación, se utilizó el sistema de cromatografía AKTA y todas las etapas se realizaron a 4 °C. Se utilizó HBSor (histidina 25 mM/sorbitol al 5%, pH 5.0) como amortiguador para la proteína purificada. La muestra de proteína purificada se aplicó a SEC para su análisis para determinar su pureza y concentración. Luego, la muestra se utilizó en varios ensayos. La secuencia de aminoácidos en C3E-7000 se describe en la Figura 21 (SEQ ID NO: 15).

4)-2 Humanización de scFv de rata anti-CD3 (C3E-7000)

4)-2-1 Diseño de humanización de anticuerpo anti-CD3

El modelado molecular de las regiones variables del anticuerpo de rata se realizó de acuerdo con un método conocido en la materia como modelado de homología (Methods in Enzymology, 203, 121-153, (1991)) usando un programa de análisis de estructura tridimensional de proteína disponible comercialmente Discovery Studio 3.5 (Dassault Systems S.A.).

La humanización se realizó mediante un método generalmente conocido como injerto de CDR (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029-10033 (1989)). Se seleccionó un anticuerpo aceptor de secuencias de consenso de subgrupos humanos especificadas por KABAT et al. (Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) o las secuencias de línea germinal en función de la identidad de aminoácidos dentro de las regiones marco, puntuaciones esperadas de predicción de inmunogenicidad o propiedades físicas, etc. Además, la retromutación se seleccionó con referencia a criterios, etc., proporcionados por Queen et al. (PNAS (1989) 86, 10029-10033) mediante el uso del modelo de estructura tridimensional construido por el enfoque descrito anteriormente.

35 4)-2-2 Diseño de la secuencia de aminoácidos humanizados C3E-7000

Sobre la base del enfoque descrito en el Ejemplo 4)-2-1, la secuencia de aminoácidos de C3E-7034 que sirve como una forma humanizada de C3E-7000 se diseñó con secuencias de consenso de subgrupos humanos $\gamma 3$ y $\lambda 6$ como aceptores. La secuencia de aminoácidos de C3E-7034VH diseñada a

partir de la secuencia de aminoácidos de C3-147VH que se muestra en la Figura 15 (SEQ ID NO: 7) mediante el reemplazo de arginina en la posición de aminoácido 16 con glicina, alanina en la posición de aminoácido 17 con serina, lisina en la posición de aminoácido 19 con arginina, valina en la posición de aminoácido 23 con alanina, valina en la posición de aminoácido 24 con alanina, serina en la posición de aminoácido 88 con alanina y treonina en la posición de aminoácido 93 con valina se describe en la Figura 22 (SEQ ID NO: 16).

La secuencia de aminoácidos de C3E-7034VL diseñada a partir de la secuencia de aminoácidos de C3-147VL que se muestra en la Figura 17 (SEQ ID NO: 9) mediante el reemplazo de glutamina en la posición de aminoácido 1 con asparagina, valina en la posición de aminoácido 3 con metionina, asparagina en la posición de aminoácido 8 con histidina, treonina en la posición de aminoácido 12 con ácido glutámico, asparagina en la posición de aminoácido 13 con serina, leucina en la posición de aminoácido 14 con prolina, treonina en la posición de aminoácido 16 con lisina, ácido glutámico en la posición de aminoácido 19 con treonina, leucina en la posición de aminoácido 20 con isoleucina, arginina en la posición de aminoácido 43 con serina, leucina en la posición de aminoácido 75 con serina, asparagina en la posición de aminoácido 79 con serina, valina en la posición de aminoácido 81 con leucina y glutamina en la posición de aminoácido 82 con lisina se describe en la Figura 23 (SEQ ID NO: 17).

Las secuencias de CDR de C3E-7000 y C3E-7034 en función de la definición de CDR de IMGT se describen en la Figura 24 (SEQ ID NO: 26) para CDR-H1, Figura 25 (SEQ ID NO: 27) para CDR-H2, Figura 26 (SEQ ID NO: 28) para CDR-H3, Figura 27 (SEQ ID NO: 29) para CDR-L1, Figura 28 (SEQ ID NO: 30) para CDR-L2 y la Figura 29 (SEQ ID NO: 31) para CDR-L3.

4)-2-3 Modificación de scFv anti-CD3 humanizado C3E-7034

Para preparar variantes con actividad de unión distintiva y actividad citotóxica mientras se mantiene la reactividad cruzada con CD3ε de mono, se diseñaron variantes, de la misma manera que en el enfoque descrito en el Ejemplo 4)-2-1, mediante el reemplazo de aminoácidos en las regiones marco de VL de C3E-7034 con los correspondientes en VL de scFv (secuencia que contiene las cuatro mutaciones A2S, S8P, V13A y F80L en IGLV1-40*01).

4)-2-3-1 Diseño de secuencia de aminoácidos de C3E-7035

Se diseñó la secuencia de aminoácidos de C3E-7035 que sirve como una variante de C3E-7034. La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera C3E-7035 diseñada a partir de la región variable de cadena ligera C3E-7034 que se muestra en la Figura 23 (SEQ ID NO: 17) por el reemplazo de asparagina en la posición de aminoácido 1 con glutamina, el reemplazo de fenilalanina en la posición de aminoácido 2 con alanina, el reemplazo de metionina en la posición de aminoácido 3 con valina, el reemplazo de histidina en la posición de aminoácido 8 con serina, el reemplazo de ácido glutámico en la posición de aminoácido 12 con glicina, el reemplazo de serina en la posición de aminoácido 13 con valina, el reemplazo de lisina en la posición de aminoácido 16 con glutamina, el reemplazo de treonina en la posición de aminoácido 17

con arginina, el reemplazo de histidina en la posición de aminoácido 40 con leucina, el reemplazo de ácido glutámico en la posición de aminoácido 41 con prolina, el reemplazo de serina en la posición de aminoácido 43 con treonina, el reemplazo de serina en la posición de aminoácido 44 con alanina, el reemplazo de treonina en la posición de aminoácido 46 con lisina, el reemplazo de treonina en la posición de aminoácido 47 con leucina, el reemplazo de isoleucina en la posición de aminoácido 48 con leucina, el reemplazo de ácido aspártico en la posición de aminoácido 72 con serina, el reemplazo de serina en la posición de aminoácido 60 con prolina, el reemplazo de isoleucina en la posición de aminoácido 67 con lisina, la eliminación de ácido aspártico en la posición de aminoácido 68, el reemplazo de arginina en la posición de aminoácido 69 con serina en la posición de aminoácido 71 con leucina, el reemplazo de aminoácido 72 con treonina, la sustitución de treonina en la posición de aminoácido 77 con alanina, la sustitución de serina en la posición de aminoácido 79 con treonina, la sustitución de asparagina en la posición de aminoácido 80 con glicina, la sustitución de leucina en la posición del aminoácido 81 por fenilalanina, la sustitución de lisina en la posición amino ácido 82 con glutamina, la sustitución de treonina en la posición de aminoácido 83 con alanina, y la sustitución de fenilalanina en la posición de aminoácido 90 con tirosina se describe en la Figura 30 (SEQ ID NO: 20). La secuencia de longitud completa de C3E-7035 que contiene metionina y alanina insertada inmediatamente antes de la región variable de cadena ligera se describe en la Figura 31 (SEQ ID NO: 22) del Listado de Secuencias.

4)-2-3-2 Diseño de secuencia de aminoácidos de C3E-7036

Se diseñó la secuencia de aminoácidos de C3E-7036 que sirve como una variante de C3E-7034. La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera C3E-7036 diseñada a partir de la región variable de cadena ligera C3E-7034 que se muestra en la Figura 23 (SEQ ID NO: 17) por el reemplazo de histidina en la posición de aminoácido 8 con serina, el reemplazo de ácido glutámico en la posición de aminoácido 12 con glicina, el reemplazo de serina en la posición de aminoácido 13 con valina, el reemplazo de lisina en la posición de aminoácido 16 con glutamina, el reemplazo de treonina en la posición de aminoácido 17 con arginina, el reemplazo de lisina en la posición de aminoácido 23 con treonina, el reemplazo de arginina en la posición de aminoácido 24 con glicina, el reemplazo de histidina en la posición de aminoácido 40 con leucina, el reemplazo de ácido glutámico en la posición de aminoácido 41 con prolina, el reemplazo de serina en la posición de aminoácido 43 con treonina, el reemplazo de serina en la posición de aminoácido 44 con alanina, el reemplazo de treonina en la posición de aminoácido 46 con lisina, el reemplazo de treonina en la posición de aminoácido 47 con leucina, el reemplazo de isoleucina en la posición de aminoácido 48 con leucina, el reemplazo de ácido aspártico en la posición de aminoácido 57 con serina, el reemplazo de serina en la posición de aminoácido 60 con prolina, el reemplazo de isoleucina en la posición de aminoácido 67 con lisina, la eliminación de ácido aspártico en la posición de aminoácido 68 con arginina 69, el reemplazo de serina en la posición de aminoácido 71 con glicina, el reemplazo de aminoácido en la posición de aminoácido 72 con treonina, el reemplazo de aminoácido en la posición 77 con alanina, la sustitución de serina en la posición de aminoácido 79 con treonina, la sustitución de asparagina en la posición de aminoácido 80 con glicina, la sustitución de leucina en la posición del aminoácido 81 por

fenilalanina, la sustitución de lisina en la posición de aminoácido 82 con glutamina, la sustitución de treonina en la posición de aminoácido 83 con alanina, y la sustitución de fenilalanina en la posición de aminoácido 90 con tirosina se describe en la Figura 32 (SEQ ID NO: 23). La secuencia de aminoácidos de longitud completa de C3E-7036 se describe en la Figura 33 (SEQ ID NO: 25).

5

4)-2-3-3 Diseño de aminoácidos en variantes de CDR

Con el fin de eliminar un sitio de desaminación presente en C3E-7034 CDRH2 (Figura 25, SEQ ID NO: 27), C3E-7078 que tiene arginina sustituida por asparagina en la posición de aminoácido 53 en la región variable de cadena pesada C3E-7034 que se muestra en la Figura 22 (SEQ ID NO: 16) y C3E-7079 con serina sustituida por esta. Además, se diseñó C3E-7085 con arginina sustituida por asparagina en la posición de aminoácido 53 en la región variable de cadena pesada C3E-7036. Toda la secuencia de aminoácidos de C3E-7078 se enumera en la Figura 68 (SEQ ID NO: 60). Toda la secuencia de aminoácidos de C3E-7079 se enumera en la Figura 70 (SEQ ID NO: 62). Toda la secuencia de aminoácidos de C3E-7085 se enumera en la Figura 72 (SEQ ID NO: 64).

Con el fin de reducir la afinidad de C3E-7078 por CD3 humana, se diseñaron C3E-7086 con glicina sustituida por ácido aspártico en la posición de aminoácido 52 en la región variable de cadena ligera C3E-7078, C3E-7087 con glutamina sustituida por esta, C3E-7088 con asparagina sustituida por esta, C3E-7089 con serina sustituida por esta y C3E-7090 con alanina sustituida por esta. Asimismo, con el fin de reducir la afinidad de C3E-7079 por CD3 humana, se diseñaron C3E-7091 con glicina sustituida por ácido aspártico en la posición de aminoácido 52 en la región variable de cadena ligera C3E-7079, C3E-7092 con glutamina sustituida por esta, C3E-7093 con asparagina sustituida por esta, C3E-7094 con serina sustituida por esta y C3E-7095 con alanina sustituida por esta. Toda la secuencia de aminoácidos de C3E-7086 se enumera en la Figura 74 (SEQ ID NO: 66). Toda la secuencia de aminoácidos de C3E-7087 se enumera en la Figura 76 (SEQ ID NO: 68). Toda la secuencia de aminoácidos de C3E-7088 se enumera en la Figura 78 (SEQ ID NO: 70). Toda la secuencia de aminoácidos de C3E-7089 se enumera en la Figura 80 (SEQ ID NO: 72). Toda la secuencia de aminoácidos de C3E-7090 se enumera en la Figura 82 (SEQ ID NO: 74). Toda la secuencia de aminoácidos de C3E-7091 se enumera en la Figura 84 (SEQ ID NO: 76). Toda la secuencia de aminoácidos de C3E-7092 se enumera en la Figura 86 (SEQ ID NO: 78). Toda la secuencia de aminoácidos de C3E-7093 se enumera en la Figura 88 (SEQ ID NO: 80). Toda la secuencia de aminoácidos de C3E-7094 se enumera en la Figura 90 (SEQ ID NO: 82). Toda la secuencia de aminoácidos de C3E-7095 se enumera en la Figura 92 (SEQ ID NO: 84).

4)-3 Preparación de scFv anti-CD3 humanizado (C3E-7034, C3E-7035 y C3E-7036)

4)-3-1 Diseño del vector de expresión de scFv anti-CD3 humanizado (C3E-7034) pC3E-7034

Un fragmento de ADN que comprende una secuencia de ADN de scFv que contiene una cadena ligera C3E-7034 (que se muestra en la Figura 23 (SEQ ID NO: 17)) conectado al extremo carboxilo de la cadena pesada C3E-7034 (que se muestra en la Figura 22 (SEQ ID NO: 16)) mediante un ligador flexible de 15 aminoácidos se sintetizó con secuencias adicionales de 15 bases unidas corriente arriba y corriente

35

abajo (GeneArt Gene Synthesis Service/Thermo Fisher Scientific Inc.). Una región que contenía el ADN C3E-7034 y secuencias adicionales corriente arriba y corriente abajo se amplificó mediante PCR usando este fragmento de ADN como plantilla para obtener un fragmento de ADN insertado. Una región vectorial excepto por la región scFv se amplificó mediante PCR usando el vector de expresión pC3E-7000 preparado en el Ejemplo 4)-1-1 como una plantilla para obtener un fragmento vectorial. Estos fragmentos de ADN se hibridaron usando el kit de clonación In-Fusion HD (Clontech Laboratories, Inc.) para preparar un vector de expresión scFv anti-CD3 humanizado pC3E-7034 que contiene la secuencia de nucleótidos de la Figura 34 (SEQ ID NO: 18) en ORF.

4)-3-2 Diseño del vector de expresión de scFv anti-CD3 humanizado (C3E-7035) pC3E-7035

Un fragmento de ADN que comprende una secuencia de ADN de scFv que contiene la cadena ligera C3E-7035 (que se muestra en la Figura 30 (SEQ ID NO: 20)) conectado al extremo carboxilo de la cadena pesada C3E-7034 (que se muestra en la Figura 22 (SEQ ID NO: 16)) mediante un ligador flexible de 17 aminoácidos se sintetizó con secuencias adicionales de 15 bases unidas corriente arriba y corriente abajo (GeneArt Gene Synthesis Service/Thermo Fisher Scientific Inc.). Un vector de expresión de C3E-7035 que contiene la secuencia de nucleótidos de la Figura 35 (SEQ ID NO: 21) en ORF se construyó de la misma manera que en el Ejemplo 4)-3-1. El vector de expresión resultante se designó como "pC3E-7035".

4)-3-3 Diseño del vector de expresión de scFv anti-CD3 humanizado (C3E-7036) pC3E-7036

Un fragmento de ADN que comprende una secuencia de ADN de scFv que contiene la cadena ligera C3E-7036 (que se muestra en la Figura 32 (SEQ ID NO: 23)) conectado al extremo carboxilo de la cadena pesada C3E-7034 (que se muestra en la Figura 22 (SEQ ID NO: 16)) a través de un ligador flexible de 15 aminoácidos se sintetizó con secuencias adicionales de 15 bases unidas corriente arriba y corriente abajo (GeneArt Gene Synthesis Service/Thermo Fisher Scientific Inc.). Un vector de expresión de C3E-7036 que contiene la secuencia de nucleótidos de la Figura 36 (SEQ ID NO: 24) en ORF se construyó de la misma manera que en el Ejemplo 4)-3-1. El vector de expresión resultante se designó como "pC3E-7036".

4)-3-4 Diseño de vectores de expresión de scFv de anticuerpo humanizado CDR modificado

La mutagénesis dirigida al sitio basada en PCR se realizó usando pC3E-7034 que contenía la secuencia de nucleótidos de C3E-7034 que se muestra en la Figura 34 (SEQ ID NO: 18) en ORF como plantilla y usando cebadores que tienen las secuencias de nucleótidos que se muestran en las Figuras 93 y 94 (SEQ ID NO: 85 y 86) para preparar un vector de expresión de C3E-7078 que contiene la secuencia de nucleótidos de C3E-7078 que tiene arginina sustituida por asparagina en la posición de aminoácido 53 en la región variable de cadena pesada C3E-7034, en ORF. El vector de expresión resultante se designó como "pC3E-7078". Asimismo, se realizó mutagénesis dirigida al sitio basada en PCR usando pC3E-7034 como plantilla y utilizando cebadores de las Figuras 95 y 96 (SEQ ID NO: 87 y 88) para preparar un vector

de expresión de C3E-7079 que contiene la secuencia de nucleótidos de C3E-7079 que tiene serina sustituida por asparagina en la posición de aminoácido 53 en la región variable de cadena pesada C3E-7034. El vector de expresión resultante se designó como "pC3E-7079". Asimismo, se realizó mutagénesis dirigida al sitio basada en PCR usando pC3E-7036 como plantilla y utilizando cebadores de las Figuras 93 y 94 (SEQ ID NO: 85 y 86) para preparar un vector de expresión de C3E-7085 que contiene la secuencia de nucleótidos de C3E-7085 que tiene arginina sustituida por asparagina en la posición de aminoácido 53 en la región variable de cadena pesada C3E-7036. El vector de expresión resultante se designó como "pC3E-7085".

Los vectores de expresión que contienen la secuencia de nucleótidos de C3E-7086 con glicina sustituida por ácido aspártico en la posición de aminoácido 52 en la región variable de cadena ligera C3E-7078, C3E-7087 con glutamina sustituida por esta, C3E-7088 con asparagina sustituida por esta, C3E-7089 con serina sustituida por esta o C3E-7090 con alanina sustituida por esta en ORF y vectores de expresión que contienen la secuencia de nucleótidos de C3E-7091 con glicina sustituida por ácido aspártico en la posición de aminoácido 52 en la región variable de cadena ligera C3E-7079, C3E-7092 con glutamina sustituida por esta, C3E-7093 con asparagina sustituida por esta, C3E-7094 con serina sustituida por esta o C3E-7095 con alanina sustituida por esta en ORF también se prepararon mediante el mismo enfoque que se describió anteriormente. En la Tabla 1 se resume una lista de los nombres de los vectores, plantillas y cebadores preparados, y una lista de cebadores se resume en la Figura 105.

Tabla 1

ID del clon	Plantilla	Cebador directo (Fw)	Cebador inverso (Rv)
C3E-7078	C3E-7034	HN53R Fw	HN53R Rv
C3E-7079	C3E-7034	HN53S Fw	HN53S Rv
C3E-7085	C3E-7036	HN53R Fw	HN53R Rv
C3E-7086	C3E-7078	LD52G Fw	LD52G Rv
C3E-7087	C3E-7078	LD52Q Fw	LD52Q Rv
C3E-7088	C3E-7078	LD52N Fw	LD52N Rv
C3E-7089	C3E-7078	LD52S Fw	LD52S Rv
C3E-7090	C3E-7078	LD52A Fw	LD52A Rv
C3E-7091	C3E-7079	LD52G Fw	LD52G Rv
C3E-7092	C3E-7079	LD52Q Fw	LD52Q Rv
C3E-7093	C3E-7079	LD52N Fw	LD52N Rv
C3E-7094	C3E-7079	LD52S Fw	LD52S Rv
C3E-7095	C3E-7079	LD52A Fw	LD52A Rv

4)-3-5 Expresión y purificación de scFv anti-CD3 humanizado

C3E-7034, C3E-7035 y C3E-7036 se expresaron y purificaron de la misma manera que en el

Ejemplo 4)-1-2.

4)-3-6 Expresión y purificación de scFv anti-CD3 humanizado modificado por CDR

Las variantes de CDR; C3E-7078, C3E-7079, C3E-7085, C3E-7086, C3E-7087, C3E-7088, C3E-7089, C3E-7090, C3E-7091, C3E-7092, C3E-7093, C3E-7094 y C3E-7095, se expresaron y purificaron de la misma manera que en el Ejemplo 4)-1-2.

(Ejemplo 5) Análisis de estructura cristalina de scFv anti-CD3 humanizado (C3E-7034)

5)-1 Preparación de un complejo de antígeno monocatenario CD3 ϵ y humano anti-CD3 scFv humanizado (C3E-7034)

CD3 ϵ y preparado en el Ejemplo 2)-2-1 y C3E-7034 preparado en el Ejemplo 4)-3-1 se mezclaron a una proporción molar de 1:2. La solución amortiguadora se reemplazó con Tris HCl 10 mM (pH 7.5) y NaCl 50 mM usando Amicon Ultra 15 MWCO 10K (Merck Millipore), y la solución resultante se concentró a 3.5 mg/mL. Este concentrado se purificó mediante cromatografía de filtración en gel usando Superdex 200 10/300GL (GE Healthcare Bio-Sciences Corp.). Una fracción del complejo se concentró en aproximadamente 4.0 mg/mL usando Amicon Ultra 15 MWCO 10K (Millipore).

5)-2 Cristalización

El complejo resultante de CD3 ϵ y y C3E-7034 se cristalizó mediante el método de difusión de vapor. A 0.5 μ L de la solución de proteína, se agregó una cantidad igual de una solución precipitante (monohidrato de MES 0.1 M (pH 6.5), sulfato de amonio 1.6 M y 1,4-dioxano al 10% v/v) y la solución resultante se colocó en un recipiente sellado que contenía 0.05 mL de una solución precipitante de modo que las soluciones no tuvieran contacto entre sí. El recipiente se dejó reposando a 25 °C. Un mes más tarde, se obtuvieron cristales similares a varillas de 0.1 mm x 0.05 mm x 0.05 mm.

5)-3 Análisis de la estructura cristalina de rayos X e identificación del epítipo

El cristal resultante se sumergió en perfluoropolíéter PFO-X175/08 (Hampton Research Corp.) y posteriormente se congeló en nitrógeno líquido. Los datos de difracción de rayos X se recolectaron utilizando la línea de haz BL41XU (SPring-8, Hyogo, Japón). La intensidad de difracción se digitalizó a partir de la imagen de difracción resultante utilizando el software imosflm (CCP4: Collaborative Computational Project No. 4) para determinar los factores de estructura cristalina. Los cristales se encontraban en un sistema hexagonal con un grupo espacial de P6₂ y celdas unitarias de a = 193.54 angstrom, b = 193.54 angstrom y c = 43.88 angstrom.

El método de reemplazo molecular se realizó utilizando los factores estructurales resultantes y las coordenadas estructurales tridimensionales de los modelos de homología para determinar las fases. Un fáser de software (CCP4: Collaborative Computational Project No. 4) se utilizó en el cálculo. Los cristales contenían un complejo en una unidad asimétrica.

El refinamiento de la estructura se realizó utilizando el software Refmac5 (CCP4: Collaborative

Computational Project No. 4), y la corrección del modelo se realizó utilizando el software Coot. Esta operación se realizó repetidamente para obtener un factor R final del 22.1% y un factor R libre del 27.0% con una resolución de 3.3 angstrom. El modelo final contenía residuos de aminoácidos 1 a 108 de la región de cadena ligera C3E-7034 (Figura 23, SEQ ID NO: 17), los residuos de aminoácidos 1 a 118 de la región de cadena pesada C3E-7034 (Figura 22, SEQ ID NO: 16), residuos de aminoácidos 33 a 67 y 71 a 118 de la región CD3 ϵ (Figura 1, SEQ ID NO: 1), y los residuos de aminoácidos 23 a 103 de la región CD3 γ (Figura 37, SEQ ID NO: 3). Residuos de aminoácidos 68 a 70 de la región CD3 ϵ (Figura 1, SEQ ID NO: 1), y la región del extremo amino (residuo de aminoácido 1), la parte enlazadora (residuos de aminoácidos 120 a 134), y la región del extremo carboxilo (residuos de aminoácidos 243 a 269) de C3E-7034 (Figura 38, SEQ ID NO: 19) no se incluyeron en el modelo debido a su poco detectable densidad eléctrica. La Figura 39 muestra el modelo de cinta de todo el complejo y la superficie.

La Figura 40 muestra la interacción entre CD3 ϵ y las cadenas ligera y pesada de C3E-7034. El panel A es un diagrama en el que los aminoácidos de CD3 ϵ que tienen una distancia dentro de 4 angstrom de la región variable de cadena ligera de C3E-7034 se indican mediante barras gruesas en el modelo, y los otros aminoácidos se indican mediante barras delgadas en el modelo. En el diagrama, Ser55, Glu56, Arg101, Gly102, Ser103, Lys104 y Pro105 indicados por el nombre del residuo y el número de residuo dentro de los recuadros son residuos de aminoácidos de CD3 ϵ que tienen una distancia dentro de 4 angstrom de la región variable de cadena ligera de C3E-7034, y cada posición del aminoácido corresponde a una posición en la SEQ ID NO: 1 del listado de secuencias. El panel B es un diagrama en el que los residuos de aminoácidos de CD3 ϵ que tienen una distancia dentro de 4 angstrom de la región variable de cadena pesada de C3E-7034 se indican mediante barras gruesas en el modelo, y los otros aminoácidos se indican mediante barras delgadas en el modelo. En el diagrama; Ser55, Glu56, Leu58, Trp59, Asn65, Ile66, Ser77, Asp78 y Arg101 indicados por el nombre del residuo y el número de residuo dentro de los recuadros son aminoácidos de CD3 ϵ , y cada posición de aminoácido corresponde a la posición en la SEQ ID NO: 1 del listado de secuencias. Los siguientes residuos de aminoácidos tienen una distancia dentro de 4 angstrom de C3E-7034 y se han interpretado como epítopos en CD3 ϵ para C3E-7034: Ser55, Glu56, Leu58, Trp59, Asn65, Ile66, Ser77, Asp78, Arg101, Gly102, Ser103, Lys104 y Pro105.

Entre estos epítopos en CD3 ϵ para C3E-7034, Arg101, Gly102, Ser103, Lys104 y Pro105 se encuentran residuos de epítopos comunes en CD3 ϵ para OKT3 y UCHT1 (Kjer-Nielsen et al., PNAS 101 (2004), p. 7675-80; y Arnett et al., PNAS 101 (2004), p. 16268-73). También se ha revelado que C3E-7034 no interactúa con las posiciones de aminoácidos 22 a 48 en la SEQ ID NO: 1, que corresponden a epítopos para anticuerpos anti-CD3 tales como I2C y H2C como se describe en WO2008/119565A2. La Figura 41 muestra residuos que interactúan en la secuencia de CD3 ϵ . La secuencia señal de CD3 ϵ se indica mediante letras en cursiva y se subrayan los aminoácidos que tienen una distancia dentro de 4 angstrom de C3E-7034.

(Ejemplo 6) Preparación de scFv de OKT3 humanizado

6)-1 Diseño del vector de expresión scFv OKT3 pC3E-3000

scFv de un anticuerpo monoclonal anti-CD3 de ratón OKT3 (Sgro, Toxicology 105 (1995), 23-29, Orthoclone, Janssen-Cilag) se preparó mediante el mismo enfoque que en el Ejemplo 4)-1-1 y se insertó en un vector de expresión derivado de pcDNA3.3 para células animales. El vector de expresión resultante se designó como "pC3E-3000".

5

6)-2 Diseño de secuencia de aminoácidos humanizados de scFv OKT3 (C3E-3000)

Sobre la base del enfoque descrito en el Ejemplo 4)-2-1, la secuencia de aminoácidos de C3E-3007 que sirve como una forma humanizada de OKT3 se diseñó con secuencias de consenso de subgrupos humanos gamma 1 y kappa 4 como aceptores. Se introdujeron aminoácidos kappa 1 en algunos sitios en consideración de la influencia en las puntuaciones de inmunogenicidad y en las propiedades físicas. La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera C3E-3007 diseñada a partir de la región variable de cadena pesada OKT3 que se muestra en la Figura 42 (SEQ ID NO: 36) mediante el reemplazo de glutamina en la posición del aminoácido 5 con valina, leucina en la posición del aminoácido 11 con serina, alanina en la posición del aminoácido 12 con lisina, arginina en la posición del aminoácido 13 con lisina, metionina en la posición del aminoácido 20 con valina, lisina en la posición del aminoácido 38 con arginina, arginina en la posición del aminoácido 40 con alanina, isoleucina en la posición del aminoácido 48 con metionina, lisina en la posición del aminoácido 67 con arginina, alanina en la posición del aminoácido 68 con valina, leucina en la posición del aminoácido 70 con isoleucina, treonina en la posición del aminoácido 72 con alanina, serina en la posición del aminoácido 76 con treonina, glutamina en la posición del aminoácido 82 con ácido glutámico, treonina en la posición del aminoácido 87 con arginina, serina en la posición del aminoácido 91 con treonina, treonina en la posición del aminoácido 114 con leucina y leucina en la posición del aminoácido 115 con valina se describe en la Figura 43 (SEQ ID NO: 38).

La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera C3E-3007 diseñada a partir de la región variable de cadena ligera OKT3 que se muestra en la Figura 44 (SEQ ID NO: 37) mediante el reemplazo de valina en la posición del aminoácido 3 con glutamina, leucina en la posición del aminoácido 4 con metionina, alanina en la posición del aminoácido 9 con serina, isoleucina en la posición del aminoácido 10 con serina, metionina en la posición del aminoácido 11 con leucina, serina en la posición del aminoácido 12 con alanina, alanina en la posición del aminoácido 13 con valina, prolina en la posición del aminoácido 15 con leucina, lisina en la posición del aminoácido 18 con arginina, valina en la posición del aminoácido 19 con alanina, metionina en la posición del aminoácido 21 con isoleucina, serina en la posición del aminoácido 39 con prolina, treonina en la posición del aminoácido 41 con lisina, serina en la posición del aminoácido 42 con alanina, alanina en la posición del aminoácido 59 con ácido aspártico, histidina en la posición del aminoácido 60 con arginina, arginina en la posición del aminoácido 62 con serina, serina en la posición del aminoácido 69 con ácido aspártico, tirosina en la posición del aminoácido 70 con fenilalanina, serina en la posición del aminoácido 71 con treonina, glicina en la posición del aminoácido 76 con serina, metionina en la posición del aminoácido 77 con leucina, ácido glutámico en la posición de 78 con glutamina, alanina en la posición del aminoácido 82 con valina, serina en la posición del aminoácido 99 con glutamina, y leucina en la posición del aminoácido 103 con valina se describe en la Figura 45 (SEQ ID NO: 39).

6)-3 Diseño del vector de expresión de scFv OKT3 humanizado (C3E-3007) pC3E-3007

Un fragmento de ADN que comprende una secuencia de ADN de scFv que contiene la cadena ligera C3E-3007 (que se muestra en la Figura 45 (SEQ ID NO: 39)) región conectada al extremo carboxilo de la cadena pesada C3E-3007 (que se muestra en la Figura 43 (SEQ ID NO: 38)) mediante un ligador flexible de 15 aminoácidos y se sintetizaron secuencias adicionales de 15 bases corriente arriba y corriente abajo de estas (GeneArt Gene Synthesis Service/Thermo Fisher Scientific Inc.). Un vector de expresión de C3E-3007 que contiene la secuencia de nucleótidos de la Figura 46 (SEQ ID NO: 34) en ORF se construyó de la misma manera que en el Ejemplo 4)-3-1. El vector de expresión resultante se designó como "pC3E-3007".

6)-4 Expresión y purificación de scFv de OKT3 humanizado (C3E-3007)

C3E-3007 se expresó y purificó de la misma manera que en el Ejemplo 4)-1-2. La secuencia de aminoácidos de C3E-3007 se describe en la Figura 47 (SEQ ID NO: 35).

(Ejemplo 7) Actividad *in vitro* de scFv anti-CD3 humanizado

7)-1 Estudio de la actividad de unión de scFv anti-CD3 humanizado (C3E-3007, C3E-7034, C3E-7035 y C3E-7036) contra CD3 humana

7)-1-1 Estudio de la actividad de unión de scFv anti-CD3 humanizado (C3E-3007, C3E-7034, C3E-7035 y C3E-7036) a CD3 humana mediante citometría de flujo

Se ajustaron PBMC humanas comercialmente disponibles (Cellular Technology Ltd. (CTL)) a una concentración adecuada con PBS que contenía FBS al 5%. Se añadieron el kit de tinción de células muertas LIVE/DEAD Fixable Near-IR Dead Cell Stain Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.) y un anticuerpo anti-CD19 (Beckman Coulter Inc.) a las células, que luego se dejaron en reposo a 4 °C durante 30 minutos. Las células se lavaron dos veces con PBS que contenía FBS al 5%, luego se ajustaron a una concentración de 1×10^6 células/mL con PBS que contenía FBS al 5%, se agregaron a una concentración de 100 μ L/pocillo a una microplaca con fondo en U de 96 pocillos y se centrifugaron para retirar un sobrenadante. Cada scFv anti-CD3 humanizado (C3E-3007, C3E-7034, C3E-7035 y C3E-7036) diluido con PBS que contenía FBS al 5% se añadió a una concentración de 100 μ L/pocillo y la placa se dejó en reposo a 4 °C durante 60 minutos. Las células se lavaron dos veces con PBS que contenía FBS al 5%. Luego, se añadió Penta-His Alexa Fluor 488 (Qiagen N.V.) diluido con PBS que contenía FBS al 5% a una concentración de 30 μ L/pocillo, y la placa se dejó en reposo a 4 °C durante 30 minutos. Las células se lavaron dos veces con PBS que contenía FBS al 5% y luego se volvieron a suspender en PBS que contenía FBS al 5%, seguido de detección usando un citómetro de flujo (FACSCanto(TM) II; Becton, Dickinson y Company). Los datos se analizaron utilizando Flowjo (Tree Star Inc.). Se calculó la intensidad media de fluorescencia (MFI) de Alexa Fluor 488 en una fracción libre de células muertas y células CD19 positivas. El valor de MFI de la muestra no suministrada por scFv se resta del valor de MFI de la muestra suministrada por scFv para calcular un valor relativo de MFI (rMFI). Tal como se muestra en la Figura 48, se descubrió que los scFv anti-CD3

humanizados se unen a CD3 humana.

7)-1-2 Estudio de la actividad de unión de scFv anti-CD3 humanizados (C3E-3007, C3E-7034, C3E-7035 y C3E-7036) a CD3 humana mediante SPR

5 La afinidad de cada scFv anti-CD3 humanizado (C3E-3007, C3E-7034, C3E-7035 y C3E-7036) por CD3 se determinó mediante el método de resonancia de plasmones superficiales usando BIAcore T-200 (GE Healthcare Bio-Sciences Corp.). Se inyectaron cinco concentraciones diferentes del scFv en CD3 inmovilizado en un chip sensor. R_{max} se estimó a partir de la respuesta resultante, y la concentración de anticuerpo que alcanzó 1/2 de esta se definió como la constante de disociación del scFv para CD3. Como
10 resultado, las constantes de disociación de estos scFv para CD3 fueron 400, 4.5, 22 y 25 nM, respectivamente.

7)-2 Un estudio de la actividad de unión del anticuerpo humanizado CD3 scFv (C3E-3007, C3E-7034 y C3E-7036) con CD3 de mono cinomolgo

15 7)-2-1 Preparación de PBMC de mono cinomolgo

Se recogieron PBMC de la sangre de un mono cinomolgo de acuerdo con el método estándar usando SepMate (StemCell Technologies Inc.) y Lymphocyte Separation Solution (Nacalai Tesque Inc.).

20 7)-2-2 Estudio de la actividad de unión de scFv anti-CD3 humanizados (C3E-3007, C3E-7034, C3E-7035 y C3E-7036) a CD3 de mono cinomolgo mediante citometría de flujo

Las PBMC de mono cinomolgo obtenidas en el Ejemplo 7) -2-1 se ajustaron a una concentración adecuada con PBS que contenía FBS al 5% y se tiñeron y analizaron de la misma manera que en el Ejemplo 7) -1-1. Como se muestra en la Figura 49, se encontró que los scFv anti-CD3 humanizados (C3E-7034, C3E-7035 y C3E-7036) se unen a CD3 de mono cinomolgo.

25

7)-3 Activación de linfocitos T de scFv anti-CD3 humanizados (C3E-3007 y, C3E-7034)

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humana se aislaron de las capas leucocíticas frescas de donantes aleatorios mediante el método de centrifugación de gradiente de densidad usando Lympholyte-H (Cedarlane). Cada scFv anti-CD3 humanizado (C3E-3007 y C3E-7034) diluido a 100
30 nM con LR10 (RPMI1640 que contiene FBS de IgG ultrabaja al 10% (Thermo Fisher Scientific Inc.)) y la misma concentración de anticuerpo anti-His (Qiagen N.V.) se mezclaron en las mismas cantidades. Las PBMC humanas o de mono se ajustaron a 2×10^5 células con LR10 y se mezcló con la mezcla del scFv anti-CD3 humanizado y anticuerpo anti-His, en las mismas cantidades en una microplaca de 96 pocillos con fondo en U, y se cultivó a 37 °C durante 24 horas en condiciones de CO₂ al 5%. Después de completar
35 la reacción, la solución de reacción se centrifugó y se añadió un amortiguador clasificador (HBSS(-) (Thermo Fisher Scientific Inc.), BSA al 0.1% (Sigma-Aldrich Corp.) y azida sódica al 0.1% (Sigma-Aldrich Corp.)). Después de la centrifugación, se añadió el kit de tinción de células muertas LIVE/DEAD Fixable Near-IR Dead Cell Stain Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.) a las células, que luego se dejaron en reposo a

4 °C durante 20 minutos. Las células se lavaron con un amortiguador clasificador. Luego, se agregaron a las células un anticuerpo anti-CD69 marcado con PE (Becton, Dickinson and Company) y un anticuerpo anti-CD8 marcado con FITC (Becton, Dickinson and Company) diluido con un amortiguador clasificador, que luego se dejaron en reposo a 4 °C durante 20 minutos. Las células se lavaron con un amortiguador clasificador y luego se volvieron a suspender en PBS (Wako Pure Chemicals Industries, Ltd.) que contenía paraformaldehído al 1%, seguido de detección usando un citómetro de flujo (FACSCanto II; Becton, Dickinson and Company). Los datos se analizaron utilizando Flowjo (Tree Star Inc.). La proporción de una fracción de CD8 con alta expresión y PE con alta expresión a una fracción libre de células muertas se calculó como porcentaje con respecto a la población (% de parentales). Tal como se muestra en la Figura 50, se descubrió que los scFv anti-CD3 humanizados activan células CD8 humanas y monos con alta expresión.

7)-4 Comparación de la actividad de unión de scFv anti-CD3 humanizado modificado por CDR con CD3 humana y de mono cinomolgo mediante citometría de flujo

Las PBMC humanas obtenidas en el Ejemplo 7) -1-1 y las PBMC de mono cinomolgo obtenidas en el Ejemplo 7) -2-1 se ajustaron cada una a una concentración adecuada con PBS que contenía FBS al 5% y se tiñeron y analizaron de la misma manera que en el Ejemplo 7) -1-1. Tal como se muestra en la Figura 106, se confirmó que los scFv anti-CD3 humanizados modificados por CDR tienen actividad de unión con CD3 humana y de mono.

(Ejemplo 8) Preparación de scFv anti-TROP2 humanizado

8)-1 Diseño del vector de expresión de scFv HT1-11 pHT1-11scFv

Se sintetizó un fragmento de ADN que comprende una secuencia de ADN que codifica los aminoácidos de scFv HT1-11 que se muestra en la Figura 51 (SEQ ID NO: 41) (GeneArt Gene Synthesis Service/Thermo Fisher Scientific Inc.). El fragmento de ADN sintetizado se insertó en un vector derivado de pcDNA-3.3TOPO (Thermo Fisher Scientific Inc.) usando kit de clonación de PCR In-Fusion HD (Clontech Laboratories, Inc.) para construir un vector de expresión scFv anti-TROP2 humanizado pHT1-11scFv que contiene la secuencia de nucleótidos que se muestra en la Figura 52 (SEQ ID NO: 40) en ORF.

8)-2 Expresión y purificación de scFv HT1-11 (scFv HT1-11)

Se expresó scFv HT1-11 y se purificó de la misma manera que en el Ejemplo 4)-1-2.

(Ejemplo 9) Evaluación de la actividad de unión de scFv anti-TROP2 humanizado (scFv HT1-11) contra TROP2 humano mediante citometría de flujo

Se ajustó una línea celular FaDu de cáncer de células escamosas faríngeas (ATCC) o una línea celular de cáncer de páncreas HPAF-II (ATCC) a una concentración adecuada con PBS que contenía FBS al 5%. Se añadió el kit de tinción de células muertas LIVE/DEAD Fixable Near-IR Dead Cell Stain Kit a las células, que luego se dejaron en reposo a 4 °C durante 30 minutos. Las células se lavaron dos veces con

PBS que contenía FBS al 5%, luego se ajustaron a una concentración de 1×10^6 células/mL con PBS que contenía FBS al 5%, se agregaron a una concentración de 100 μ L/pocillo a una microplaca con fondo en U de 96 pocillos y se centrifugaron para retirar un sobrenadante. El scFv anti-TROP2 humanizado (scFv HT1-11) diluido con PBS que contenía FBS al 5% se añadió a una concentración de 100 μ L/pocillo, y la placa se dejó en reposo a 4 °C durante 60 minutos. Las células se lavaron dos veces con PBS que contenía FBS al 5%. Luego, se añadió Penta-His Alexa Fluor 488 diluido con PBS que contenía FBS al 5% a una concentración de 30 μ L/pocillo, y la placa se dejó en reposo a 4 °C durante 30 minutos. Las células se lavaron dos veces con PBS que contenía FBS al 5% y luego se volvieron a suspender en PBS que contenía FBS al 5%, seguido de detección usando un citómetro de flujo (FACSCanto(TM) II). Los datos se analizaron utilizando Flowjo. Se calculó la intensidad media de fluorescencia (MFI) de Alexa Fluor 488 en una fracción libre de células muertas. El valor de MFI de la muestra no enriquecida con anticuerpo se resta del valor de MFI de la muestra suplementada con scFv para calcular un valor relativo de MFI (rMFI). Como se muestra en la Figura 53, se encontró que el scFv anti-TROP2 humanizado se une a TROP2 humano.

(Ejemplo 10) Preparación de moléculas biespecíficas anti-TROP2-CD3

10)-1 Diseño de un vector de expresión de molécula biespecífica anti-TROP2-CD3

10)-1-1 Diseño del vector de expresión de molécula biespecífica HT1-11 scFv/C3E-7034 (T2C-0001)

Se obtuvo un fragmento de ADN insertado mediante PCR utilizando el scFv pHT1-11 preparado en el Ejemplo 8)-1 como plantilla y utilizando cebadores diseñados para agregar las secuencias de nucleótidos de scFv HT1-11 y una parte de una secuencia señal de cadena pesada de anticuerpo humano al lado 5' y para agregar la secuencia de nucleótidos de un ligador para conectar scFv al lado 3'. Además, se obtuvo un fragmento de ADN del vector que contiene toda la región del vector que incluye ADN scFv anti-CD3 mediante PCR utilizando el vector de expresión pC3E-7034 preparado en el Ejemplo 4)-3-1 como plantilla y utilizando cebadores que codifican una secuencia señal y la secuencia de extremo amino del scFv anti-CD3. Estos fragmentos de ADN se ligaron usando el kit de clonación In-Fusion HD (Clontech Laboratories, Inc.) para preparar un vector de expresión de molécula biespecífica anti-TROP2-anti-CD3 pT2C-0001 que contiene la secuencia de nucleótidos de la Figura 54 (SEQ ID NO: 42) en ORF.

10)-1-2 Diseño de un vector de expresión de molécula biespecífica HT1-11 scFv/C3E-3007 (T2C-0003)

Un vector de expresión de molécula biespecífica anti-TROP2-CD3 que contiene la secuencia de nucleótidos de la Figura 55 (SEQ ID NO: 44) en ORF se construyó de la misma manera que en el Ejemplo 10)-1-1, excepto que se utilizó pC3E-3007 como plantilla para preparar el fragmento del vector. El vector de expresión resultante se designó como "pT2C-0003".

10)-1-3 Diseño de un vector de expresión de molécula biespecífica HT1-11 scFv/C3E-7035 (T2C-0005)

Un vector de expresión de molécula biespecífica anti-TROP2-CD3 que contiene la secuencia de nucleótidos de la Figura 56 (SEQ ID NO: 46) en ORF se construyó de la misma manera que en el Ejemplo 10)-1-1, excepto que se utilizó pC3E-7035 como plantilla para preparar el fragmento del vector. El vector de expresión resultante se designó como "pT2C-0005".

5

10)-1-4 Diseño de un vector de expresión de molécula biespecífica HT1-11 scFv/C3E-7036 (T2C-0006)

Un vector de expresión de molécula biespecífica anti-TROP2-CD3 que contiene la secuencia de nucleótidos de la Figura 57 (SEQ ID NO: 48) en ORF se construyó de la misma manera que en el Ejemplo 10)-1-1, excepto que se utilizó pC3E-7036 como plantilla para preparar el fragmento del vector. El vector de expresión resultante se designó como "pT2C-0006".

10

10)-2 Expresión y purificación de moléculas biespecíficas anti-TROP2-CD3

15

T2C-0001, T2C-0003, T2C-0005 y T2C-0006 se expresaron y purificaron de la misma manera que en el Ejemplo 4)-1-2. La secuencia de aminoácidos de T2C-0001 se describe en la Figura 58 (SEQ ID NO: 43). La secuencia de aminoácidos de T2C-0003 se describe en la Figura 59 (SEQ ID NO: 45). La secuencia de aminoácidos de T2C-0005 se describe en la Figura 60 (SEQ ID NO: 47). La secuencia de aminoácidos de T2C-0006 se describe en la Figura 61 (SEQ ID NO: 49).

20

(Ejemplo 11) Evaluación de la actividad *in vitro* de moléculas biespecíficas anti-TROP2-CD3

11)-1 Evaluación de la actividad de unión por SPR

11)-1-1 Actividad de unión de una molécula biespecífica anti-TROP2-CD3 a TROP2

25

La molécula biespecífica se analizó para determinar su unión a TROP2 usando BIAcore 3000 (GE Healthcare Bio-Sciences Corp.) mediante el método de captura, que implica capturar el antígeno mediante un anticuerpo anti-IgG humana y analizar la molécula biespecífica como un analito. El antígeno utilizado fue la forma fusionada TROP-2/Fc de IgG humana recombinante (R&D Systems, Inc.). Aproximadamente 2000 RU del anticuerpo anti-IgG humana (Fc) (Human Antibody Capture Kit, GE Healthcare Bio-Sciences Corp.) se unió covalentemente a un chip sensor CM5 (GE Healthcare Bio-Sciences Corp.) mediante el método de acoplamiento de amina. De manera similar, este anticuerpo se inmovilizó en una célula de referencia. El amortiguador de funcionamiento utilizado fue HBS-P (HEPES 10 mM (pH 7.4), NaCl 0.15 M y agente tensoactivo P20 0.005%). La molécula biespecífica se preparó a una proporción de dilución de 2 veces de 200 nM a 1 nM. Se añadió una solución de 1 µg/mL del antígeno al chip inmovilizado con anticuerpo anti-IgG humano (Fc) durante aproximadamente 30 segundos. Luego, se añadió cada concentración de la molécula biespecífica a una velocidad de flujo de 30 µL/min durante 300 segundos. Posteriormente, se monitoreó la fase de disociación durante 600 segundos. Se añadió una solución de cloruro de magnesio 3 M como una solución regeneradora durante 30 segundos. Los datos se analizaron utilizando el modelo de unión 1:1 de software analítico (software de evaluación BIA, versión 4.1.1) para calcular una constante de velocidad de asociación (k_a), una constante de velocidad de disociación (k_d) y

30

35

una constante de disociación (KD; $KD = kd/ka$).

11)-1-2 Actividad de unión de una molécula biespecífica anti-TROP2-CD3 a un antígeno monocatenario CD3εγ humano

La molécula biespecífica se analizó para determinar su unión al antígeno CD3εγ usando BIAcore 3000 (GE Healthcare Bio-Sciences Corp.) mediante un método que implica inmovilizar el antígeno y analizar el anticuerpo como un analito. El antígeno utilizado fue el antígeno monocatenario CD3εγ humano preparado en el Ejemplo 2) -2-1. Aproximadamente 100 RU del antígeno se unió covalentemente a un chip sensor CM5 (GE Healthcare Bio-Sciences Corp.) mediante el método de acoplamiento de amina. El tratamiento de inmovilización se realizó sin la adición de una proteína antigénica como célula de referencia. El amortiguador de funcionamiento utilizado fue HBS-P (HEPES 10 mM (pH 7.4), NaCl 0.15 M y agente tensoactivo P20 0.005%). La molécula biespecífica se preparó a una proporción de dilución de 2 veces de 1 μM (concentración más alta) a 4 nM o a una proporción de dilución de 2 veces de 200 nM a 1 nM. Cada concentración de la molécula biespecífica se añadió al chip inmunizado con antígeno a una velocidad de flujo de 10 μL/min durante 25 minutos, y se monitoreó la cantidad de la molécula biespecífica unida a esta. Se añadió una solución de ácido clorhídrico-glicina 10 mM (pH 1.5) como una solución regeneradora durante 30 segundos. Los datos se analizaron utilizando software analítico (software de evaluación BIA, versión 4.1.1) para calcular una constante de disociación KD a partir de la cantidad de molécula biespecífica unida a cada concentración. Los resultados se muestran en las Tablas 2 y 3.

Tabla 2

	Nombre	CD3εγ KD (nM)
1	T2C-0001	13.9
2	T2C-0003	171
3	T2C-0005	126
4	T2C-0006	171

Tabla 3

	Nombre	TROP2 KD (nM)
1	T2C-0001	12.8
2	T2C-0003	6.7
3	T2C-0005	11.9
4	T2C-0006	9.3

11)-2 Evaluación de la actividad de unión por citometría de flujo

11)-2-1 Actividad de unión de una molécula biespecífica anti-TROP2-CD3 a TROP2

Se utilizaron las mismas líneas de células cancerígenas que las del Ejemplo 9, y se tiñeron y analizaron de la misma manera que el Ejemplo 9. Tal como se muestra en la Figura 62, se descubrió que

las moléculas biespecíficas anti-TROP2-CD3 se unen a TROP2.

11)-2-2 Actividad de unión de una molécula biespecífica anti-TROP2-CD3 a un antígeno monocatenario CD3ε humano

5 Las células se tiñeron y analizaron de la misma manera que en el Ejemplo 7)-1-1. Tal como se muestra en la Figura 63, se descubrió que las moléculas biespecíficas anti-TROP2-CD3 se unen al antígeno monocatenario CD3ε humano.

10 11)-2-3 Actividad de unión de una molécula biespecífica anti-TROP2-CD3 a un antígeno CD3 de mono cinomolgo

Las PBMC de mono cinomolgo obtenidas en el Ejemplo 7) -2-1 se ajustaron a una concentración adecuada con PBS que contenía FBS al 5% y se tiñeron y analizaron de la misma manera que en el Ejemplo 7) -1-1. Tal como se muestra en la Figura 64, se encontró que las moléculas biespecíficas anti-TROP2-CD3 (T2C-0001, T2C-0005 y T2C-0006) se unen al antígeno CD3 de mono cinomolgo.

15

11)-3 Evaluación de la actividad citotóxica de moléculas biespecíficas anti-TROP2-CD3

11)-3-1 Análisis de expresión de TROP2 en células blanco

Se ajustaron las células FaDu (ATCC) de la línea celular de cáncer de células escamosas faríngeas, HPAF-II (ATCC) de la línea celular de cáncer de páncreas o Calu-6 de la línea celular de cáncer de pulmón humano a una concentración adecuada con PBS que contenía FBS al 5%. Se añadió el kit de tinción LIVE/DEAD Fixable Dead Cell Stain Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.) a las células, que luego se dejaron en reposo a 4 °C durante 30 minutos. Las células se lavaron dos veces con PBS que contiene FBS al 5%, luego se ajustaron a una concentración de 2×10^6 células/mL con PBS que contenía FBS al 5%, se inocularon a una concentración de 100 µL/pocillo a una microplaca con fondo en U de 96 pocillos y se

20 centrifugaron para retirar un sobrenadante. Se agregaron anticuerpos anti-TROP2 Alexa Fluor 488 (Affymetrix eBioscience) y anticuerpo de Isotype Control (Affymetrix eBioscience) diluidos con PBS que contenía FBS al 5% a una concentración de 25 µL/pocillo, y la placa se dejó en reposo a 4 °C durante 30 minutos. Las células se lavaron dos veces con PBS que contenía FBS al 5% y luego se volvieron a suspender en PBS que contenía FBS al 5%, seguido de detección usando un citómetro de flujo (Cytomics FC500; Beckman Coulter Inc.). Los datos se analizaron utilizando Flowjo (Tree Star Inc.). Se calculó la intensidad de fluorescencia media geométrica (MFI geométrica) de Alexa Fluor 488 en una fracción libre de células muertas. Como se muestra en las Figuras 65A, 65B y 65C, la expresión de TROP2 se observó en las células FaDu y HPAF-II, pero no se observó en las células Calu-6.

35 11)-3-2 Preparación de células blanco

Las células FaDu, HPAF-II o Calu-6 se ajustaron a una concentración de 2×10^6 células/mL con un medio RPMI1640 (Thermo Fisher Scientific Inc.) que contenía FBS al 10%. A cada línea celular, se añadieron 100 µL del radionucleido cromo-51 (PerkinElmer, Inc.) por mL de la suspensión celular y las

células se cultivaron a 37 °C durante 2 horas en condiciones de CO₂ al 5%. Las células se lavaron dos veces con un medio RPMI1640 que contenía FBS al 10%, luego se volvieron a suspender a 2 x 10⁵ células/mL en un medio RPMI1640 que contenía FBS al 10% y se utilizaron como células blanco.

5 11)-3-3 Preparación de células efectoras

Se descongelaron PBMC congeladas comercialmente disponibles (Cellular Technology Limited) a 37 °C, se transfirieron a una solución de un medio RPMI1640 que contenía FBS al 10% complementado con reactivo de lavado de antiagregado (Cellular Technology Limited), se lavaron dos veces, luego se ajustaron a 1 x 10⁶ células /mL con un medio RPMI1640 que contenía FBS al 10% y se utilizaron como células efectoras.

11)-3-4 Ensayo de citotoxicidad

Las células FaDu, las células HPAF-II o las células Calu-6 obtenidas en el Ejemplo 11)-3-2 se agregaron a una concentración de 50 µL/pocillo a una microplaca de fondo en U de 96 pocillos. Cada molécula biespecífica anti-TROP2-CD3 ajustada a concentraciones variables se añadió a una concentración de 50 µL/pocillo. Las células efectoras preparadas en el Ejemplo 11)-3-1-3 se añadieron a una concentración de 100 µL/pocillo. Después de la centrifugación a temperatura ambiente a 1000 rpm durante 1 minuto, las células se cultivaron a 37 °C durante 20 a 24 horas en condiciones de CO₂ al 5%. Se recuperó una alícuota de 50 µL del sobrenadante en una microplaca LumaPlate (PerkinElmer, Inc.) y se secó a 50 °C durante aproximadamente 2 horas, seguido de la cuantificación usando un lector de placas (TopCount; PerkinElmer, Inc.). El porcentaje de células lisadas se calculó de acuerdo con la siguiente expresión:

$$\text{Porcentaje de células lisadas (\%)} = (A - B) / (C - B) \times 100$$

A: Recuento del pocillo de muestras

B: Recuento basal medio (pocillos de anticuerpos sin suplementación) (n = 3). Se añadieron 50 µL de un medio para el ensayo en lugar de añadir el anticuerpo. Los otros procedimientos fueron los mismos que en el caso del pocillo de muestras.

C: Promedio del recuento máximo de liberación (pocillos que contienen células blanco lisadas en un agente tensoactivo) (n = 3). Se añadieron 50 µL de un medio para el ensayo en lugar de añadir el anticuerpo. Se añadieron 100 µL del agente tensoactivo y la alícuota de 50 µL se transfirió a una microplaca LumaPlate, como con el pocillo de muestras, y se analizó.

Tal como se muestra en las Figuras 66A, 66B y 66C, estas moléculas biespecíficas anti-TROP2-CD3 mostraron actividad citotóxica contra las células FaDu y las células HPAF-II). Por otro lado, estas moléculas biespecíficas no mostraron actividad citotóxica en las células Calu-6. [0282]

(Ejemplo 12) Preparación de moléculas biespecíficas anti-Axl-CD3

12)-1 Diseño del vector de expresión de molécula biespecífica anti-Axl-CD3

12)-1-1 Diseño del vector de expresión de molécula biespecífica 11D5-T3 scFv/C3E-7034 (AXC-

0001)

La secuencia de aminoácidos de un anticuerpo monocatenario anti-Axl 11D5-T3 scFv se diseñó mediante la conexión de la secuencia añadida con glicina en el extremo N de h#11D5-T3H (descrita en la Figura 12 en la memoria descriptiva de la Solicitud de Patente Europea núm. 2270053) y h#11D5-T3L (descrita en la Figura 6 en la memoria descriptiva de la publicación de la Solicitud de Patente Europea núm. 2270053) mediante un ligador polipeptídico que consiste en una secuencia que tiene 3 repeticiones de (GGGGS). Se sintetizó una secuencia de nucleótidos que codifica esta secuencia de aminoácidos (GENEART, Thermo Fisher Scientific). Se obtuvo un fragmento de ADN insertado mediante PCR utilizando esta secuencia de nucleótidos como plantilla y utilizando cebadores diseñados para agregar la secuencia de nucleótidos de una parte de una secuencia señal de cadena pesada de anticuerpo humano al extremo 5' y para agregar la secuencia de nucleótidos de un ligador para conectar scFv al extremo 3'. Además, se obtuvo un fragmento de ADN del vector mediante amplificación por PCR de toda la región del vector que incluye ADN scFv de CD3 usando el vector de expresión pC3E-7034 preparado en el Ejemplo 4) -3-1 como plantilla y utilizando cebadores que consisten en una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia señal de cadena pesada de anticuerpo humano y el scFv de CD3. Los fragmentos de ADN ligados usando el kit de clonación In-Fusion HD (Clontech Laboratories, Inc.) produjeron el vector de expresión de molécula biespecífica anti-AXL-anti-CD3 pAXC-0001 que contiene la secuencia de nucleótidos que se muestra en la Figura 97 (SEQ ID NO: 89) en ORF.[0283]

12)-1-2 Diseño del vector de expresión de molécula biespecífica 11D5-T3 scFv/C3E-7036 (AXC-0002)

Un vector de expresión de molécula biespecífica anti-Axl-CD3 que contiene la secuencia de nucleótidos que se muestra en la Figura 99 (SEQ ID NO: 91) en ORF se construyó de la misma manera que en el Ejemplo 10)-1-1, excepto que se utilizó pC3E-7036 como plantilla para preparar el fragmento del vector. El vector de expresión resultante se designó como "pAXC-0002".

12)-2 Expresión y purificación de moléculas biespecíficas anti-AxL-CD3

AXC-0001 y AXC-0002 se expresaron y purificaron de la misma manera que en el Ejemplo 4)-1-2. La secuencia de aminoácidos de AXC-0001 se describe en la Figura 98 (SEQ ID NO: 90). La secuencia de aminoácidos de AXC-0002 se describe en la Figura 100 (SEQ ID NO: 92).

(Ejemplo 13) Evaluación de la actividad *in vitro* de moléculas biespecíficas anti-Axl-CD3

13)-1 Análisis de expresión de Axl en células blanco

La línea de células A549 humanas de cáncer pulmonar (ATCC), línea celular de cáncer pancreático humano PANC-1 (ATCC) o MIA PaCa-2 (ATCC), línea celular de mieloma humano U266B1(ATCC) o línea celular de linfoma de células del manto Jeko-1 (ATCC) se ajustó a una concentración adecuada con PBS que contenía FBS al 5%. Se agregó el kit de tinción de células muertas LIVE/DEAD Fixable Dead Cell Stain Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.) a las células, que luego se dejaron en reposo a 4 °C durante 30 minutos. Las células se lavaron dos veces con PBS que contiene FBS al 5%, luego se ajustaron a una concentración

de 2×10^6 células/mL con PBS que contenía FBS al 5%, se inocularon a una concentración de 100 μ L/pocillo en una microplaca con fondo en forma de "U" de 96 pocillos y se centrifugaron para retirar el sobrenadante. Se añadieron anticuerpo Anti-Axl (RD Systems, Inc.) y anticuerpo Isotype Control (RD Systems, Inc.) diluidos con PBS que contenía FBS al 5% a una concentración de 25 μ L/pocillo, y la placa se dejó en reposo a 4 °C durante 30 minutos. Las células se lavaron dos veces con PBS que contenía FBS al 5%. Luego, se añadió el anticuerpo anti-IgG de ratón Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific Inc.) diluido con PBS que contenía FBS al 5% a una concentración de 25 μ L/pocillo, y la placa se dejó en reposo a 4 °C durante 30 minutos. Las células se lavaron dos veces con PBS que contenía FBS al 5% y luego se volvieron a suspender en PBS que contenía FBS al 5%, seguido de detección usando un citómetro de flujo (Cytomics FC500; Beckman Coulter Inc.). Los datos se analizaron utilizando Flowjo (Tree Star Inc.). Se calculó la intensidad de fluorescencia media geométrica (MFI geométrica) de Alexa Fluor 488 en una fracción libre de células muertas. Como se muestra en las Figuras 107A, 107B, 107C, 107D y 107E, la expresión de Axl se observó en A549, PANC-1 y MIA PaCa-2, pero no se observó en U266B1 y Jeko-1.

13)-2 Preparación de células blanco

A549, PANC-1, MIA PaCa-2, U266B1 y Jeko-1 se ajustaron cada uno a una concentración de 2×10^6 células/mL con un medio RPMI1640 (Thermo Fisher Scientific Inc.) que contenía FBS al 10%. A cada línea celular, se añadieron 100 μ L del radionucleido cromo-51 (PerkinElmer, Inc.) por mL de la suspensión celular y las células se cultivaron a 37 °C durante 2 horas en condiciones de CO₂ al 5%. Las células se lavaron dos veces con un medio RPMI1640 que contenía FBS al 10%, luego se volvieron a suspender a 2×10^5 células/mL en un medio RPMI1640 que contenía FBS al 10% y se utilizaron como células blanco.

13)-3 Preparación de células efectoras

Se descongelaron PBMC congeladas comercialmente disponibles (Cellular Technology Limited) a 37 °C, se transfirieron a una solución de un medio RPMI1640 que contenía FBS al 10% complementado con reactivo de lavado de antiagregado (Cellular Technology Limited), se lavaron dos veces, luego se ajustaron a 1×10^6 células /mL con un medio RPMI1640 que contenía FBS al 10% y se utilizaron como células efectoras.

13)-4 Ensayo de citotoxicidad

Las células FaDu, las células HPAF-II o las células Calu-1 obtenidas en el Ejemplo 13)-3-2 se agregaron a una concentración de 50 μ L/pocillo a una microplaca de fondo en U de 96 pocillos. Cada molécula biespecífica anti-Axl CD3 ajustada a concentraciones variables se añadió a una concentración de 50 μ L/pocillo. Las células efectoras preparadas en el Ejemplo 13)-3 se añadieron a una concentración de 100 μ L/pocillo. Después de la centrifugación a temperatura ambiente a 1000 rpm durante 1 minuto, las células se cultivaron a 37 °C durante 20 a 24 horas en condiciones de CO₂ al 5%. Se transfirió una alícuota de 50 μ L del sobrenadante en una microplaca LumaPlate (PerkinElmer, Inc.) y se secó a 50 °C durante aproximadamente 2 horas, seguido de la cuantificación usando un lector de placas (TopCount;

PerkinElmer, Inc.). El porcentaje de células lisadas se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de células lisadas (\%)} = (A - B) / (C - B) \times 100$$

A: Recuento del pocillo de muestras

B: Recuento basal medio (pocillos de anticuerpos sin suplementación) (n = 3). Se añadieron 50 µL de un medio para el ensayo en lugar de añadir el anticuerpo. Los otros procedimientos fueron los mismos que en el caso del pocillo de muestras.

C: Promedio del recuento máximo de liberación (pocillos que contienen células blanco lisadas en un agente tensoactivo) (n = 3). Se añadieron 50 µL de un medio para el ensayo en lugar de añadir el anticuerpo. Se añadieron 100 µL del agente tensoactivo y la alícuota de 50 µL se transfirió a una microplaca LumaPlate, como con el pocillo de muestras, y se analizó.

Tal como se muestra en las Figuras 108A, 108B, 108C, 108D y 108E, estas moléculas biespecíficas anti-Axl CD3 exhibieron actividad citotóxica contra A549, PANC-1 y MIA PaCa-2. Sin embargo, estas moléculas biespecíficas no mostraron actividad citotóxica contra U266B1 o Jeko-1.

(Ejemplo 14) Preparación del vector de expresión de la molécula biespecífica anti-HLA-A2/MAGEC1-CD3

14)-1 Diseño de vector de expresión de molécula biespecífica anti-HLA-A2/MAGEC1 -CD3

14)-1-1 Diseño del vector de expresión de molécula biespecífica MAG-032 scFv/C3E-7034 (MGC-0001)

Se obtuvo scFv de MAG-032 que se une específicamente a HLA-A2/MAGEC1 de una genoteca de fagos de anticuerpos humanos. Se obtuvo un fragmento de ADN insertado que contenía una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de MAG-032 scFv mediante PCR utilizando la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de MAG-032 scFv como plantilla y utilizando cebadores diseñados para agregar una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia señal de cadena pesada de anticuerpo humano al extremo 5' y para agregar una secuencia de nucleótidos que codifica un ligador para conectar scFv y una parte de C3E-7034 al extremo 3'. Además, se obtuvo un fragmento de ADN del vector mediante amplificación por PCR de toda la región del vector que incluye ADN scFv anti-CD3 usando el vector de expresión pC3E-7034 preparado en el Ejemplo 4) -3-1 como plantilla y utilizando cebadores que consisten en una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia señal de cadena pesada de anticuerpo humano y la secuencia de extremo amino del scFv anti-CD3. Estos fragmentos de ADN se ligaron usando un kit de clonación In-Fusion HD (Clontech Laboratories, Inc.) para preparar un vector de expresión de molécula biespecífica anti-HLA-A2/MAGEC1-anti-CD3 pMGC-0001 que contiene la secuencia de nucleótidos que se muestra en la Figura 101 (SEQ ID NO: 93) en ORF.

14)-1-2 Diseño del vector de expresión de molécula biespecífica MAG-032 scFv/C3E-7036 (MGC-0002)

Un vector de expresión de molécula biespecífica anti-HLA-A2/MAGEC1 -CD3 que contiene la secuencia de nucleótidos que se muestra en la Figura 103 (SEQ ID NO: 95) en ORF se construyó de la

misma manera que en el Ejemplo 14)-1-1, excepto que se utilizó pC3E-7036 como plantilla para preparar el fragmento del vector. El vector de expresión resultante se designó como "pMGC-0002".

14)-2 Expresión y purificación de moléculas biespecíficas anti-HLA-A2/MAGEC1-CD3

MGC-0001 y MGC-0002 se expresaron y purificaron de la misma manera que en el Ejemplo 4)-1-2. La secuencia de aminoácidos de MGC-0001 se enumera en la Figura 102 (SEQ ID NO: 94). La secuencia de aminoácidos de MGC-0002 se enumera en la Figura 104 (SEQ ID NO: 96).

(Ejemplo 15) Evaluación de la actividad *in vitro* de moléculas biespecíficas anti-HLA-A2/MAGEC1-CD3

15)-1 Análisis de expresión de HLA-A2/MAGEC1 en células blanco

Las células de la línea celular de fusión de linfoblastos humanos T2 (ATCC) se ajustaron a una concentración adecuada con un medio AIM-V (Thermo Fisher Scientific Inc.) que contenía FBS al 20%. Péptido MAGEC1 de la Figura 106 (SEQ ID NO: 97) (Sigma Genosys) o DMSO se añadió a las células, que luego se incubaron a 37 °C durante 4 horas. Las células se lavaron dos veces con un medio AIM-V que contenía FBS al 20% y luego se ajustaron a una concentración adecuada con PBS que contenía FBS al 5%. Se añadió el kit de tinción LIVE/DEAD Fixable Dead Cell Stain Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.) a las células, que luego se dejaron en reposo a 4 °C durante 30 minutos. Las células se lavaron dos veces con PBS que contiene FBS al 5%, luego se ajustaron a una concentración de 2×10^6 células/mL con PBS que contenía FBS al 5%, se inocularon a una concentración de 100 µL/pocillo a una microplaca con fondo en U de 96 pocillos y se centrifugaron para retirar un sobrenadante. El anticuerpo anti-HLA-A2/MAGEC1 (scFv MAG032) diluido con PBS que contenía FBS al 5% se añadió a una concentración de 25 µL/pocillo y la placa se dejó en reposo a 4 °C durante 30 minutos. Las células se lavaron dos veces con PBS que contenía FBS al 5%. Luego, se añadió Penta-His Alexa Fluor 488 (Qiagen N.V.) diluido con PBS que contenía FBS al 5% a una concentración de 25 µL/pocillo, y la placa se dejó en reposo a 4 °C durante 30 minutos. Las células se lavaron dos veces con PBS que contenía FBS al 5% y luego se volvieron a suspender en PBS que contenía FBS al 5%, seguido de detección usando un citómetro de flujo (Cytomics FC500; Beckman Coulter Inc.). Los datos se analizaron utilizando Flowjo (Tree Star Inc.). Se calculó la intensidad de fluorescencia media geométrica (MFI geométrica) de Alexa Fluor 488 en una fracción libre de células muertas. Tal como se muestra en las Figuras 109A y 109B, se observó la expresión de HLA-A2/MAGEC1 en las células T2 complementadas con el péptido MAGEC1, pero no se observó en las células T2 complementadas con DMSO.

15)-2 Preparación de células blanco

Las células T2 se ajustaron a una concentración adecuada con un medio AIM-V (Thermo Fisher Scientific Inc.) que contenía FBS al 20%. Se añadió péptido MAGEC1 o DMSO a las células, que luego se incubaron a 37 °C durante 4 horas. Las células se ajustaron a una concentración de 2×10^6 células/mL con un medio RPMI1640 (Thermo Fisher Scientific Inc.) que contenía FBS al 10%. A esta línea celular, se

añadieron 100 µL del radionucleido cromo-51 (PerkinElmer, Inc.) por mL de la suspensión celular y las células se cultivaron a 37 °C durante 2 horas en condiciones de CO₂ al 5%. Las células se lavaron dos veces con un medio RPMI1640 que contenía FBS al 10%, luego se volvieron a suspender a 2 x 10⁵ células/mL en un medio RPMI1640 que contenía FBS al 10% y se utilizaron como células blanco.

5

15)-3 Preparación de células efectoras

Se descongelaron PBMC congeladas comercialmente disponibles (Cellular Technology Limited) a 37 °C, se transfirieron a una solución de un medio RPMI1640 que contenía FBS al 10% complementado con reactivo de lavado de antiagregado (Cellular Technology Limited), se lavaron dos veces, luego se ajustaron a 1 x 10⁶ células /mL con un medio RPMI1640 que contenía FBS al 10% y se utilizaron como células efectoras.

10

15)-4 Ensayo de citotoxicidad

Las células T2 obtenidas en el Ejemplo 15)-2 se añadieron a una concentración de 50 µL/pocillo a una microplaca con fondo en U de 96 pocillos. Cada molécula biespecífica anti-HLA-A2/MAGEC1-CD3 ajustada a concentraciones variables se añadió a una concentración de 50 µL/pocillo. Las células efectoras preparadas en el Ejemplo 15)-3 se añadieron a una concentración de 100 µL/pocillo. Después de la centrifugación a temperatura ambiente a 1000 rpm durante 1 minuto, las células se cultivaron a 37 °C durante 20 a 24 horas en condiciones de CO₂ al 5%. Se recuperó una alícuota de 50 µL del sobrenadante en una microplaca LumaPlate (PerkinElmer, Inc.) y se secó a 50 °C durante aproximadamente 2 horas, seguido de la cuantificación usando un lector de placas (TopCount; PerkinElmer, Inc.). El porcentaje de células lisadas se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

15

20

$$\text{Porcentaje de células lisadas (\%)} = (A - B) / (C - B) \times 100$$

A: Recuento del pocillo de muestras

25

B: Recuento basal medio (pocillos de anticuerpos sin suplementación) (n = 3). Se añadieron 50 µL de un medio para el ensayo en lugar de añadir el anticuerpo. Los otros procedimientos fueron los mismos que en el caso del pocillo de muestras.

C: Promedio del recuento máximo de liberación (pocillos que contienen células blanco lisadas en un agente tensoactivo) (n = 3). Se añadieron 50 µL de un medio para el ensayo en lugar de añadir el anticuerpo. Se añadieron 100 µL del agente tensoactivo y la alícuota de 50 µL se transfirió a LumaPlate, como con el pocillo de muestras, y se analizó.

30

Tal como se muestra en las Figuras 110A y 110B, estas moléculas biespecíficas anti-HLA-A2/MAGEC1-CD3 exhibieron actividad citotóxica contra las células T2 complementadas con el péptido MAGEC1. Por otro lado, estas moléculas biespecíficas no exhibieron actividad citotóxica en las células T2 complementadas con DMSO.

35

Aplicabilidad industrial

El anticuerpo anti-CD3 humanizado de la presente invención se une a CD3 humana y también se

une a CD3 de mono cinomolgo. Por lo tanto, el anticuerpo anti-CD3 humanizado de la presente invención se puede utilizar ventajosamente en ensayos no clínicos para el desarrollo de fármacos.

Texto libre del listado de secuencias

- 5 SEQ ID NO: 1: Secuencia de aminoácidos de CD3ε humano
 SEQ ID NO: 2: Secuencia de aminoácidos de CD3δ humano
 SEQ ID NO: 3: Secuencia de aminoácidos de CD3γ humano
 SEQ ID NO: 4: Secuencia de nucleótidos que codifica para el antígeno monocatenario CD3εγ humano
- 10 SEQ ID NO: 5: Secuencia de aminoácidos del antígeno His-scCD3
 SEQ ID NO: 6: Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de cadena pesada de C3-147
 SEQ ID NO: 7: (C3-147_VH AA): Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de C3-147
- 15 SEQ ID NO: 8: (C3-147_VL DNA): Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de cadena ligera de C3-147
 SEQ ID NO: 9: (C3-147_VL AA): Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de C3-147
 SEQ ID NO: 10: (ligador homosen sentido G4S):
- 20 SEQ ID NO: 11: (ligador antisense G4S):
 SEQ ID NO: 12: (C3E-7000_VH AA): Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada en C3E-7000
 SEQ ID NO: 13: (C3E-7000_VL AA): Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera en C3E-7000
- 25 SEQ ID NO: 14: (C3E-7000 ORF): Secuencia de nucleótidos que codifica para C3E-7000
 SEQ ID NO: 15: (C3E-7000 AA): Secuencia de aminoácidos en C3E-7000
 SEQ ID NO: 16: (C3E-7034_VH AA): Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de C3E-7034
 SEQ ID NO: 17: Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de C3E-7034
- 30 SEQ ID NO: 18: (C3E-7034 ORF): Secuencia de nucleótidos que codifica para C3E-7034
 SEQ ID NO: 19: (C3E_7034 AA): Secuencia de aminoácidos de C3E-7034
 SEQ ID NO: 20: (C3E-7035_VL AA): Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de C3E-7035
 SEQ ID NO: 21: (C3E-7035 ORF): Secuencia de nucleótidos que codifica para C3E-7035
- 35 SEQ ID NO: 22: (C3E_7035 AA): Secuencia de aminoácidos de C3E-7035
 SEQ ID NO: 23: (C3E-7036_VL_AA): Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de C3E-7036
 SEQ ID NO: 24: (C3E-7036 ORF): Secuencia de nucleótidos que codifica para C3E-7036

- SEQ ID NO: 25: (C3E_7036 AA): Secuencia de aminoácidos de C3E-7036
- SEQ ID NO: 26: (7000_CDR-H1): Secuencia de aminoácidos de CDR-H1 en la serie C3E-7000
- SEQ ID NO: 27: (7000_CDR-H2): Secuencia de aminoácidos de CDR-H2 en la serie C3E-7000
- SEQ ID NO: 28: (7000_CDR-H3): Secuencia de aminoácidos de CDR-H3 en la serie C3E-7000
- 5 SEQ ID NO: 29: (7000_CDR-L1): Secuencia de aminoácidos de CDR-L1 en la serie C3E-7000
- SEQ ID NO: 30: (7000_CDR-L2): Secuencia de aminoácidos de CDR-L2 en la serie C3E-7000
- SEQ ID NO: 31: (7000_CDR-L3): Secuencia de aminoácidos de CDR-L3 en la serie C3E-7000
- SEQ ID NO: 32: (C3E-3000 ORF): Secuencia de nucleótidos que codifica para OKT3 scFv
- SEQ ID NO: 33: (C3E-3000 AA): Secuencia de aminoácidos de OKT3 scFv
- 10 SEQ ID NO: 34: (C3E-3007 ORF): Secuencia de nucleótidos que codifica para C3E-3007 scFv
- SEQ ID NO: 35: (C3E-3007 AA): Secuencia de aminoácidos de C3E-3007 scFv
- SEQ ID NO: 36: (C3E-3000_VH AA): Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de OKT3
- SEQ ID NO: 37: (C3E-3000_VL AA): Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena
- 15 ligera de OKT3
- SEQ ID NO: 38: (C3E-3007_VH AA): Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de C3E-3007
- SEQ ID NO: 39: (C3E-3007_VL AA): Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de C3E-3007
- 20 SEQ ID NO: 40: (HT1-11 ORF): Secuencia de nucleótidos que codifica para HT1-11 scFv
- SEQ ID NO: 41: (HT1-11 AA): Secuencia de aminoácidos de HT1-11 scFv
- SEQ ID NO: 42: (T2C-0001 ORF): Secuencia de nucleótidos de ORF que codifica para T2C-0001
- SEQ ID NO: 43: (T2C-0001 AA): Secuencia de aminoácidos de T2C-0001
- SEQ ID NO: 44: (T2C-0003 ORF): Secuencia de nucleótidos de ORF que codifica para T2C-0003
- 25 SEQ ID NO: 45: (T2C-0003 AA): Secuencia de aminoácidos de T2C-0003
- SEQ ID NO: 46: (T2C-0005 ORF): Secuencia de nucleótidos de ORF que codifica para T2C-0005
- SEQ ID NO: 47: (T2C-0005 AA): Secuencia de aminoácidos de T2C-0005
- SEQ ID NO: 48: (T2C-0006 ORF): Secuencia de nucleótidos de ORF que codifica para T2C-0006
- SEQ ID NO: 49: (T2C-0006 AA): Secuencia de aminoácidos de T2C-0006
- 30 SEQ ID NO: 50: Secuencia de aminoácidos de un cebador homosentido para amplificación génica de cadena pesada
- SEQ ID NO: 51: Secuencia de nucleótidos de un cebador antisentido de primera ejecución para amplificación génica de cadena pesada
- SEQ ID NO: 52: Secuencia de nucleótidos de cebador antisentido de segunda corrida para
- 35 amplificación génica de cadena pesada
- SEQ ID NO: 53: Secuencia de nucleótidos de un cebador homosentido para amplificación génica de cadena ligera
- SEQ ID NO: 54: Secuencia de nucleótidos de un cebador antisentido de primera ejecución para

amplificación génica de cadena ligera

SEQ ID NO: 55: Secuencia de nucleótidos de un cebador antisentido de segunda ejecución para amplificación génica de cadena ligera

SEQ ID NO: 56: Secuencia de nucleótidos de un cebador de detección para secuenciación de
5 cadena pesada

SEQ ID NO: 57: Secuencia de nucleótidos de cebador antisentido 1 para secuenciación de cadena
ligera

SEQ ID NO: 58: Secuencia de nucleótidos de cebador antisentido 2 para secuenciación de cadena
ligera

10 SEQ ID NO: 59: Secuencia de nucleótidos de ORF que codifica para C3E-7078

SEQ ID NO: 60: Secuencia de aminoácidos de C3E-7078

SEQ ID NO: 61: Secuencia de nucleótidos de ORF que codifica para C3E-7079

SEQ ID NO: 62: Secuencia de aminoácidos de C3E-7079

SEQ ID NO: 63: Secuencia de nucleótidos de ORF que codifica para C3E-7085

15 SEQ ID NO: 64: Secuencia de aminoácidos de C3E-7085

SEQ ID NO: 65: Secuencia de nucleótidos de ORF que codifica para C3E-7086

SEQ ID NO: 66: Secuencia de aminoácidos de C3E-7086

SEQ ID NO: 67: Secuencia de nucleótidos de ORF que codifica para C3E-7087

SEQ ID NO: 68: Secuencia de aminoácidos de C3E-7087

20 SEQ ID NO: 69: Secuencia de nucleótidos de ORF que codifica para C3E-7088

SEQ ID NO: 70: Secuencia de aminoácidos de C3E-7088

SEQ ID NO: 71: Secuencia de nucleótidos de ORF que codifica para C3E-7089

SEQ ID NO: 72: Secuencia de aminoácidos de C3E-7089

SEQ ID NO: 73: Secuencia de nucleótidos de ORF que codifica para C3E-7090

25 SEQ ID NO: 74: Secuencia de aminoácidos de C3E-7090

SEQ ID NO: 75: Secuencia de nucleótidos de ORF que codifica para C3E-7091

SEQ ID NO: 76: Secuencia de aminoácidos de C3E-7091

SEQ ID NO: 77: Secuencia de nucleótidos de ORF que codifica para C3E-7092

SEQ ID NO: 78: Secuencia de aminoácidos de C3E-7092

30 SEQ ID NO: 79: Secuencia de nucleótidos de ORF que codifica para C3E-7093

SEQ ID NO: 80: Secuencia de aminoácidos de C3E-7093

SEQ ID NO: 81: Secuencia de nucleótidos de ORF que codifica para C3E-7094

SEQ ID NO: 82: Secuencia de aminoácidos de C3E-7094

SEQ ID NO: 83: Secuencia de nucleótidos de ORF que codifica para C3E-7095

35 SEQ ID NO: 84: Secuencia de aminoácidos de C3E-7095

SEQ ID NO: 85: Secuencia de nucleótidos de un cebador homosentido para C3E-7078

SEQ ID NO: 86: Secuencia de nucleótidos de un cebador antisentido para C3E-7078

SEQ ID NO: 87: Secuencia de nucleótidos de un cebador homosentido para C3E-7079

- SEQ ID NO: 88: Secuencia de nucleótidos de un cebador antisentido para C3E-7079
- SEQ ID NO: 89: (AXC-0001 ORF): Secuencia de nucleótidos de ORF que codifica para AXC-0001
- SEQ ID NO: 90: (AXC-0001 AA): Secuencia de aminoácidos de AXC-0001
- SEQ ID NO: 91: (AXC-0002 ORF): Secuencia de nucleótidos de ORF que codifica para AXC-0002
- 5 SEQ ID NO: 92: (AXC-0002 AA): Secuencia de aminoácidos de AXC-0002
- SEQ ID NO: 93: (MGC-0001 ORF): Secuencia de nucleótidos de ORF que codifica para MGC-0001
- SEQ ID NO: 94: (MGC-0001 AA): Secuencia de aminoácidos de MGC-0001
- SEQ ID NO: 95: (MGC-0002 ORF): Secuencia de nucleótidos de ORF que codifica para MGC-0002
- SEQ ID NO: 96: (MGC-0002 AA): Secuencia de aminoácidos de MGC-0002
- 10 SEQ ID NO: 97: (péptido MAGEC1): Secuencia de aminoácidos del péptido MAGEC1
- SEQ ID NO: 98: (CDRH2 de variantes): Secuencia de aminoácidos de CDRH2 de una variante de CDR
- SEQ ID NO: 99: (CDRL2 de variantes): Secuencia de aminoácidos de CDRL2 de una variante de CDR
- 15 SEQ ID NO: 100: (VH de variantes de C3E-7034): Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de la variante CDR de C3E-7034
- SEQ ID NO: 101: (VL de variantes C3E-7034): Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de la variante CDR de C3E-7034
- SEQ ID NO: 102: (VL de variantes C3E-7035): Secuencia de aminoácidos de la región variable de
- 20 cadena ligera de la variante CDR de C3E-7035
- SEQ ID NO: 103: (VL de variantes C3E-7036): Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de la variante CDR de C3E-7036

25

30

35