ANTICUERPOS ANTI-CD3 Y MÉTODOS DE USO

ÁREA DE LA INVENCIÓN

La presente invención se relaciona con los anticuerpos 3 (CD3) de los anti-cúmulos de diferenciación y los métodos para utilizarlos.

ANTECEDENTES

Los trastornos de proliferación celular, como el cáncer, se caracterizan por el crecimiento incontrolado de las subpoblaciones celulares. Son la causa principal de muerte en los países desarrollados y la segunda causa principal de muerte en los países en desarrollo, con más de 12 millones de nuevos casos de cáncer diagnosticados y con 7 millones de muertes por cáncer cada año. El Instituto Nacional del Cáncer estima que más de 500.000 estadounidenses morirán de cáncer en 2013, que representará casi una de cada cuatro muertes en el país. Debido a que la población de la tercera edad ha crecido, la incidencia de cáncer ha aumentado al mismo tiempo, pues la probabilidad de padecer de cáncer es más de dos veces superior luego de los setenta años. Por lo tanto, el cuidado del cáncer representa una carga social significativa y cada vez mayor.

Los enfoques de larga data para tratar el cáncer incluyen la quimioterapia, la radioterapia y la cirugía para extirpar los tumores sólidos. Recientemente, se han desarrollado inmunoterapias basadas en anticuerpos biespecíficos. Esos anticuerpos biespecíficos son capaces de unir simultáneamente los antígenos de la superficie celular con las células citotóxicas y las células cancerosas, con la intención de que la célula citotóxica unida destruya la célula cancerosa unida. Los anticuerpos biespecíficos existentes que se encuentran actualmente bajo ensayo clínico para el tratamiento contra el cáncer se ven limitados por sus vidas medias reducidas o su eficacia variable. Por lo tanto, existe una necesidad insatisfecha en el campo para el desarrollo de anticuerpos biespecíficos efectivos para utilizarlos en el tratamiento contra el cáncer.

RESUMEN

La presente invención se relaciona con los anticuerpos 3 (CD3) de los anti-cúmulos de diferenciación y los métodos para utilizarlos.

En un caso, la invención presenta un anticuerpo anti-CD3, donde el anticuerpo anti-CD3 comprende un dominio de unión que consta de las siguientes seis regiones hipervariables (RHV): (a) una RHV-H1 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 1; (b) una RHV-H2 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 2; (c) una RHV-H3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 3; (d) una RHV-L1 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 4; (e) una RHV-L2 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 5; y (f) una RHV-L3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 6. En algunas representaciones, el dominio de unión comprende (a) un dominio de cadena pesada

variable (VH) que consta de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una identidad de secuencia del 95% con la secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 184; (b) un dominio de cadena liviana variable (VL) que consta de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una identidad de secuencia del 95% con la secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 185; o (c) un dominio de VH como en (a) y un dominio de VL como en (b). En algunas representaciones, el dominio de VH comprende la secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 184. En algunas representaciones, el dominio de VL comprende la secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 185. En algunas representaciones, el dominio de unión comprende (a) un dominio de cadena pesada variable (VH) que consta de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una identidad de secuencia del 95% con la secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 186; (b) un dominio de cadena liviana variable (VL) que consta de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una identidad de secuencia del 95% con la secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 187; o (c) un dominio de VH como en (a) y un dominio de VL como en (b). En algunas representaciones, el dominio de VH comprende la secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 186. En algunas representaciones, el dominio de VL comprende la secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 187.

En otro caso, la invención presenta un anticuerpo anti-CD3, donde el anticuerpo anti-CD3 se une con un epítopo del CD3 que consta de residuos de aminoácidos Glu6 de CD3. En algunos casos, la invención presenta un anticuerpo anti-CD3, donde el epítopo además consta de uno o más residuos de aminoácidos seleccionados del grupo formado por Gln1, Asp2 y Met7 de CD3. En otro caso, la invención presenta un anticuerpo anti-CD3, donde el epítopo consta de residuos de aminoácidos Gln1, Asp2 y Glu6 de CD3. En algunos casos, la invención presenta un anticuerpo anti-CD3, donde el epítopo consta de residuos de aminoácidos Gln1, Asp2, Glu6 y Met7 de CD3. En otro caso, la invención presenta un anticuerpo anti-CD3, donde el epítopo no consta de residuos de aminoácidos Glu5 de CD3. En otro caso más, la invención presenta un anticuerpo anti-CD3, donde el epítopo no consta de residuos de aminoácidos Gly3 y Glu5 de CD3. En algunos casos, la invención presenta un anticuerpo anti-CD3, donde el epítopo consta de residuos de aminoácidos Gln1, Asp2, Glu6 y Met7 de CD3.

En casos relacionados, la invención presenta un anticuerpo anti-CD3 que une dicho epítopo y que es un anticuerpo multiespecífico. En algunas representaciones, el anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo biespecífico. En algunas representaciones, el anticuerpo biespecífico comprende un segundo dominio de unión que se une con una segunda biomolécula, donde la segunda biomolécula es un antígeno de la superficie celular. En algunas representaciones, el antígeno de la superficie celular es un antígeno tumoral. En algunas representaciones, el antígeno tumoral se selecciona de un grupo que consta de CD20; FcRH5 (5 similar al receptor de Fc); HER2; LYPD1; Ly6G6D (antígeno de linfocito 6 complejo, locus G61); Ly6-D, MEGT1); PMEL17 (homólogo de plata; SILV;

D12S53E; PMEL17; (SI); (SIL); ME20; gp100); Ly6E (antígeno de linfocito 6 complejo, locus E; Ly67, RIG-E, SCA-2, TSA-1); CD19; CD33; CD22 (isoforma CD22-B del receptor de la célula B isoform); CD79a (CD79A, CD79a, alfa asociada a la inmunoglobulina; BMPR1B (receptor de proteína morfogenética ósea de tipo IB); CD79b (CD79B, CD79β, 1 Gb (beta asociada a la inmunoglobulina), B29); EDAR (Receptor de la Ectodisplasina A); GFRA1 (GDNF-Ra1); MRP4 (Proteína 4 de Resistencia a Multidrogas); RET; STEAP1 (antígeno epitelial de seis dominios transmembrana de la próstata); TENB2 (proteoglicano transmembranal putativo); E16 (LAT1, SLC7A5); 0772P (CA125, MUC16); MPF (MPF, MSLN, SMR, factor potenciador de megacariocitos, mesotelina); Napi2b (NAPI-2B, NPTIIb, SLC34A2, transportador de soluto familia 34 (fosfato de sodio), miembro 2, transportador 3b de fosfato dependiente del sodio de tipo II); Sema 5b; PSCA hlg (2700050C12Rik, C530008O16Rik, RIKEN cDNA 2700050C12, gen RIKEN cDNA 2700050C12); ETBR (Receptor de la endotelina tipo B); MSG783 (RNF124, proteína hipotética FLJ20315); STEAP2; TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, receptor de potencial transitorio, subfamilia M, miembro 4); CRIPTO (CR, CR1, CRGF, CRIPTO, TDGF1, teratocarcinoma-derivado del factor de crecimiento); CD21 (CR2 (Receptor del complemento 2) o C3DR (C3d/Receptor del virus de Epstein-Barr) o Hs.73792); FcRH2 (IFGP4, IRTA4, SPAP1A (proteína 1a con anclaje de fosfatasa que contiene dominio SH2), SPAP1B, SPAP1C); NCA; MDP; IL20Rα; Brevican; EphB2R; ASLG659; PSCA; GEDA; BAFF-R (receptor del factor activador de la célula B, receptor BLyS 3, BR3); CXCR5 (Receptor 1 del linfoma de Burkitt; HLA-DOB (Subunidad Beta de molécula II de clase MHC); P2X5 (Receptor purinérgico P2X, canal iónico regulado por ligando 5; CD72 (Antígeno de diferenciación de célula B CD72, Lyb-2); LY64 (Antígeno de linfocito 64 (RP105), proteína de membrana de tipo 2 de la familia rica en leucina (LRR)); FcRH1 (Proteína 1 similar al receptor Fc); IRTA2 (Receptor de la superfamilia de inmunoglobulina, translocación asociada 2); TMEFF1; TMEM46 (compuesto homólogo de shisa 2 (Xenopus laevis); SHISA2); LGR5 (rica en leucina-receptor 5 acoplado a proteínas G; GPR49, GPR67); LY6K (antígeno de linfocito 6 complejo, locus K; LY6K; HSJ001348; FLJ35226); GPR19 (receptor acoplado a proteínas G 19; Mm 4787); GPR54 (receptor KISS1; KISS1R; GPR54; HOT7T175; AXOR12); ASPHD1 (dominio aspartato beta-hidroxilasa que contiene 1; LOC253982); Tirosinasa (TYR; OCAIA; OCA1A; tirosinasa; SHEP3); TMEM118 (proteína del dedo anular, transmembrana 2; RNFT2; FLJ14627); GPR172A (receptor acoplado a proteínas G 172A; GPCR41; FLJ11856; D15Ertd747e); GPC3 (Glipicano 3); CLL1 (molécula 1 tipo lectina de Tipo C); B7-H4 (B7x; B7S1); RNF43 (Proteína del dedo anular 43); CD70; CXORF61 (Cromosoma X con marco abierto de lectura 61); HAVCR1; Epirregulina; Amfirregulina; EGFR ; EGFR-L858R; EGFR-L861Q; EGFR-G719A; EGFR-G719S; EGFR-G719C; EGFR-T790M; EGFR-S768I; adipofilina; AIM-2; ALDH1A1; alfa-actinina-4; alfa-fetoproteína; ARTC1; B-RAF; BAGE-1; BCLX (L); proteína de fusión BCR-ABL (b3a2); 8; CD45; Cdc27; CDK4; CDKN2A; CEA; CLPP; COA-1; CPSF; Cw6; ciclina D1; Ciclina-A1; proteína de fusión dek-can; DKK1; DR1; DR13; EFTUD2; Factor de Elongación 2; ENAH (hMena); EpCAM; EphA3; proteína de fusión ETV6-AML1; EZH2; FLT3-ITD;

FN1; G250; MN; CAIX; GAGE-1;2;8; GAGE-3;4;5;6;7; glipicano-3; GnTVf; gp100 / Pmel17; GPNMB; HERV-K-MEL; hsp70-2; IDO1; IGF2B3; IL13Ralf2; Esterasa carboxilo intestinal; K-ras; Calicreína 4; KIF20A; KK-LC-1; KM-HN-1; LAGE-1; LDLR-fucosiltransferasa AS proteína de fusión; Lengsin; M-CSF; MAGE-A1; MAGE-A10; MAGE-A12; MAGE-A2; MAGE-A3; MAGE-A4; MAGE-A6; MAGE-A9; MAGE-C1; MAGE-C2; mamaglobina-A; MART2; MCSP; mdm-2; ME1; Melan-A / MART-1; Meloe; MMP-2; MMP-7; MUC1; MUC5AC; mucina; MUM-1f; MUM-2; MUM-3; Clase de miosina I; N-ras; NA88-A; neo-PAP; NFYC; NY-BR-1; NY-ESO-1/LAGE-2; OA1; OGT; OS-9; p53; PAP; PAX5; PBF; proteína de fusión pml-RARalfa; PRAME; PRDX5; PSMA; PTPRK; RAB38 / NY-MEL-1; RAGE-1; RBAF600; RGS5; RhoC; RNF43; RU2AS; SAGE; secernin 1; SIRT2; SNRPD1; SOX10; Sp17; SSX-2; SSX-4; STEAP1; survivina; proteína de fusión SYT-SSX1 o -SSX2; TAG-1; TAG-2; Telomerasa; TGF-betaRII; TRAG-3; Triosa fosfato isomerasa; TRP-1 / gp75; TRP-2; TRP2-INT2; tirosinasa; VEGF; WT1; XAGE-1b/GAGED2a; y SLC53SLC35D3. En algunas representaciones, el antígeno tumoral se selecciona de un grupo que consta de CD20, FcRH5, HER2, LYPD1, LY6G6D, PMEL17, LY6E, CD19, CD33, CD22, CD79A, CD79B, EDAR, GFRA1, MRP4, RET, Steap1, y TenB2. En las representaciones preferidas, el antígeno tumoral se selecciona de un grupo que consta de CD20, HER2, FcRH5 y LYPD1.

En algunas representaciones, el dominio de unión de cualquiera de los anticuerpos anti CD3 precedentes se une a un polipéptido CD3 humano o a un polipéptido CD3 de macaco cangrejero. En algunas representaciones, el polipéptido CD3 humano o el polipéptido CD3 de macaco cangrejero es un polipéptido CD3ε humano o polipéptido CD3ε de macaco cangrejero, respectivamente. En algunas representaciones, el polipéptido CD3 humano o el polipéptido CD3 de macaco cangrejero es un polipéptido CD3γ humano o polipéptido CD3γ de macaco cangrejero, respectivamente.

En algunas representaciones, cualquiera de los anticuerpos anti CD3 precedentes une el polipéptido CD3ε humano con un Kd de 250 nM o menos. En algunas representaciones, el anticuerpo anti CD3 une el polipéptido CD3ε humano con un Kd de 100 nM o menos. En algunas representaciones, el anticuerpo anti CD3 une el polipéptido CD3ε humano con un Kd de 15 nM o menos. En algunas representaciones, el anticuerpo anti CD3 une el polipéptido CD3ε humano con un Kd de 10 nM o menos. En algunas representaciones, el anticuerpo anti CD3 une el polipéptido CD3ε humano con un Kd de 5 nM o menos.

En algunas presentaciones, cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 anteriores puede comprender una mutación en el lugar de la glicosilación. En algunas representaciones, la mutación en el lugar de la glicosilación es una mutación de sustitución. En algunas representaciones, la mutación de sustitución se produce en el residuo de los aminoácidos N297, L234, L235, y/o D265 (numeración UE). En algunas representaciones, la mutación de sustitución se selecciona del grupo que consta de N297G, N297A, L234A, L235A y D265A. En algunas representaciones, la mutación de sustitución es una mutación de N297G. En algunas representaciones, la mutación en el lugar de la glicosilación reduce la función efectora del anticuerpo anti-CD3. En algunas representaciones, la mutación en el lugar de la glicosilación reduce la función efectora

del anticuerpo anti-CD3. En algunas representaciones, un anticuerpo anti-CD3 consta de una mutación de sustitución en la región Fc que reduce la función efectora.

En algunas representaciones, cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 precedentes pueden ser monoclonales, humanos, humanizados o quiméricos. En algunas representaciones, cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 precedentes puede ser un fragmento de anticuerpos que une el CD3. En algunas representaciones, el fragmento de anticuerpos se selecciona del grupo que consta de los fragmentos Fab, Fab'-SH, Fv, scFv, y $(Fab')_2$. En otras representaciones, el anticuerpo anti-CD3 es un anticuerpo de cuerpo entero. En algunas representaciones, el anticuerpo anti-CD3 es un anticuerpo IgG (por ej., un anticuerpo IgG1, IgG2 o IgG3). En algunas representaciones, el anticuerpo anti-CD3 es un anticuerpo monoespecífico. En algunas representaciones, el anticuerpo anti-CD3 es un anticuerpo captador biespecífico de células T (BITE®).

En algunas representaciones, el anticuerpo anti-CD3 es un anticuerpo multiespecífico. En algunas representaciones, el anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo biespecífico. En algunas representaciones, el anticuerpo biespecífico comprende un segundo dominio de unión que se une con una segunda biomolécula, donde la segunda biomolécula es un antígeno de la superficie celular. En algunas representaciones, el antígeno de la superficie celular es un antígeno tumoral. En algunas representaciones, el antígeno tumoral se selecciona de un grupo que consta de CD20; FcRH5 (5 similar al receptor de Fc); HER2; LYPD1; Ly6G6D (antígeno de linfocito 6 complejo, locus G61); Ly6-D, MEGT1); PMEL17 (homólogo de plata; SILV; D12S53E; PMEL17; (SI); (SIL); ME20; gp100); Ly6E (antígeno de linfocito 6 complejo, locus E; Ly67, RIG-E, SCA-2, TSA-1); CD19; CD33; CD22 (isoforma CD22-B del receptor de la célula B isoform); CD79a (CD79A, CD79a, alfa asociada a la inmunoglobulina; BMPR1B (receptor de proteína morfogenética ósea de tipo IB); CD79b (CD79B, CD79β, 1 Gb (beta asociada a la inmunoglobulina), B29); EDAR (Receptor de la Ectodisplasina A); GFRA1 (GDNF-Ra1); MRP4 (Proteína 4 de Resistencia a Multidrogas); RET; STEAP1 (antígeno epitelial de seis dominios transmembrana de la próstata); TENB2 (proteoglicano transmembranal putativo); E16 (LAT1, SLC7A5); 0772P (CA125, MUC16); MPF (MPF, MSLN, SMR, factor potenciador de megacariocitos, mesotelina); Napi2b (NAPI-2B, NPTIIb, SLC34A2, transportador de soluto familia 34 (fosfato de sodio), miembro 2, transportador 3b de fosfato dependiente del sodio de tipo II); Sema 5b; PSCA hlg (2700050C12Rik, C530008O16Rik, RIKEN cDNA 2700050C12, gen RIKEN cDNA 2700050C12); ETBR (Receptor de la endotelina tipo B); MSG783 (RNF124, proteína hipotética FLJ20315); STEAP2; TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, receptor de potencial transitorio, subfamilia M, miembro 4); CRIPTO (CR, CR1, CRGF, CRIPTO, TDGF1, teratocarcinoma-derivado del factor de crecimiento); CD21 (CR2 (Receptor del complemento 2) o C3DR (C3d/Receptor del virus de Epstein-Barr) o Hs.73792); FcRH2 (IFGP4, IRTA4, SPAP1A (proteína 1a con anclaje de fosfatasa que contiene dominio SH2), SPAP1B, SPAP1C); NCA; MDP; IL20Rα; Brevican; EphB2R; ASLG659; PSCA; GEDA; BAFF-R (receptor del factor activador de la célula B, receptor BLyS 3, BR3); CXCR5 (Receptor 1

del linfoma de Burkitt; HLA-DOB (Subunidad Beta de molécula II de clase MHC); P2X5 (Receptor purinérgico P2X, canal iónico regulado por ligando 5; CD72 (Antígeno de diferenciación de célula B CD72, Lyb-2); LY64 (Antígeno de linfocito 64 (RP105), proteína de membrana de tipo 2 de la familia rica en leucina (LRR)); FcRH1 (Proteína 1 similar al receptor Fc); IRTA2 (Receptor de la superfamilia de inmunoglobulina, translocación asociada 2); TMEFF1; TMEM46 (compuesto homólogo de shisa 2 (Xenopus laevis); SHISA2); LGR5 (rica en leucina-receptor 5 acoplado a proteínas G; GPR49, GPR67); LY6K (antígeno de linfocito 6 complejo, locus K; LY6K; HSJ001348; FLJ35226); GPR19 (receptor acoplado a proteínas G 19; Mm 4787); GPR54 (receptor KISS1; KISS1R; GPR54; HOT7T175; AXOR12); ASPHD1 (dominio aspartato beta-hidroxilasa que contiene 1; LOC253982); Tirosinasa (TYR; OCAIA; OCA1A; tirosinasa; SHEP3); TMEM118 (proteína del dedo anular, transmembrana 2; RNFT2; FLJ14627); GPR172A (receptor acoplado a proteínas G 172A; GPCR41; FLJ11856; D15Ertd747e); GPC3 (Glipicano 3); CLL1 (molécula 1 tipo lectina de Tipo C); B7-H4 (B7x; B7S1); RNF43 (Proteína del dedo anular 43); CD70; CXORF61 (Cromosoma X con marco abierto de lectura 61); HAVCR1; Epirregulina; Amfirregulina; EGFR ; EGFR-L858R; EGFR-L861Q; EGFR-G719A; EGFR-G719S; EGFR-G719C; EGFR-T790M; EGFR-S768I; adipofilina; AIM-2; ALDH1A1; alfa-actinina-4; alfa-fetoproteína; ARTC1; B-RAF; BAGE-1; BCLX (L); proteína de fusión BCR-ABL (b3a2); 8; CD45; Cdc27; CDK4; CDKN2A; CEA; CLPP; COA-1; CPSF; Cw6; ciclina D1; Ciclina-A1; proteína de fusión dek-can; DKK1; DR1; DR13; EFTUD2; Factor de Elongación 2; ENAH (hMena); EpCAM; EphA3; proteína de fusión ETV6-AML1; EZH2; FLT3-ITD; FN1; G250; MN; CAIX; GAGE-1;2;8; GAGE-3;4;5;6;7; glipicano-3; GnTVf; gp100 / Pmel17; GPNMB; HERV-K-MEL; hsp70-2; IDO1; IGF2B3; IL13Ralf2; Esterasa carboxilo intestinal; K-ras; Calicreína 4; KIF20A; KK-LC-1; KM-HN-1; LAGE-1; LDLR-fucosiltransferasa AS proteína de fusión; Lengsin; M-CSF; MAGE-A1; MAGE-A10; MAGE-A12; MAGE-A2; MAGE-A3; MAGE-A4; MAGE-A6; MAGE-A9; MAGE-C1; MAGE-C2; mamaglobina-A; MART2; MCSP; mdm-2; ME1; Melan-A / MART-1; Meloe; MMP-2; MMP-7; MUC1; MUC5AC; mucina; MUM-1f; MUM-2; MUM-3; Clase de miosina I; N-ras; NA88-A; neo-PAP; NFYC; NY-BR-1; NY-ESO-1/LAGE-2; OA1; OGT; OS-9; p53; PAP; PAX5; PBF; proteína de fusión pml-RARalfa; PRAME; PRDX5; PSMA; PTPRK; RAB38 / NY-MEL-1; RAGE-1; RBAF600; RGS5; RhoC; RNF43; RU2AS; SAGE; secernin 1; SIRT2; SNRPD1; SOX10; Sp17; SSX-2; SSX-4; STEAP1; survivina; proteína de fusión SYT-SSX1 o -SSX2; TAG-1; TAG-2; Telomerasa; TGF-betaRII; TRAG-3; Triosa fosfato isomerasa; TRP-1 / gp75; TRP-2; TRP2-INT2; tirosinasa; VEGF; WT1; XAGE-1b/GAGED2a; y SLC35D3. En algunas representaciones, el antígeno tumoral se selecciona de un grupo que consta de CD20, FcRH5, HER2, LYPD1, LY6G6D, PMEL17, LY6E, CD19, CD33, CD22, CD79A, CD79B, EDAR, GFRA1, MRP4, RET, Steap1, y TenB2.

En algunas representaciones, el antígeno tumoral es HER2 y el segundo dominio de unión comprende las siguientes seis RHV: (a) una RHV-H1 que consiste en la secuencia de aminoácidos con N.° de ID de SEC: 169; (b) una RHV-H2 que consiste en una secuencia

de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 170; (c) una RHV-H3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 171; (d) una RHV-L1 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 172; (e) una RHV-L2 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 173; y (f) una RHV-L3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.° de ID de SEC.: 174. En algunas representaciones, el segundo dominio de unión comprende (a) un dominio de VH que consta de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una identidad de secuencia del 95% con la secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 270; (b) un dominio de VL que consta de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una identidad de secuencia del 95% con la secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 271; o (c) un dominio de VH como en (a) y un dominio de VL como en (b). En algunas representaciones, el dominio de VH comprende la secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 270. En algunas representaciones, el dominio de VL comprende la secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 271.

En algunos casos, la invención presenta un anticuerpo anti-CD3, donde el anticuerpo anti-CD3 comprende un segundo dominio de unión que consta de: (a) un dominio de VH que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 270 y (b) un dominio de VL que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 271.

En otro caso, la invención presenta un anticuerpo anti-CD3, donde el anticuerpo anti-CD3 comprende un brazo anti-CD3 que contiene un primer dominio de unión, el cual consta de: (a) un dominio de VH que consiste de una secuencia de aminoácidos con N.° de ID de SEC.: 184 y (b) un dominio de VL que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 185, y un brazo anti-CD20 que comprende un segundo dominio de unión, el cual consta de: (a) un dominio de VH que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 266 y (b) un dominio de VL que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 267.

En otro caso, la invención presenta un anticuerpo anti-CD3, donde el anticuerpo anti-CD3 comprende un brazo anti-CD3 que contiene un primer dominio de unión, el cual consta de: (a) un dominio de VH que consiste de una secuencia de aminoácidos con N.° de ID de SEC.: 184 y (b) un dominio de VL que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 185, y un brazo anti-CD20 que comprende un segundo dominio de unión, el cual consta de: (a) un dominio de VH que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 266 y (b) un dominio de VL que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 267, en el cual el anticuerpo anti-CD3 contiene una mutación por sustitución de N297G.

En otro caso, la invención presenta un anticuerpo anti-CD3, donde el anticuerpo anti-CD3 comprende un brazo anti-CD3 que contiene un primer dominio de unión, el cual consta de: (a) un dominio de VH que consiste de una secuencia de aminoácidos con N.° de ID de SEC.: 184 y (b) un dominio de VL que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 185, y un brazo anti-CD20 que comprende un segundo dominio de unión,

el cual consta de: (a) un dominio de VH que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 266 y (b) un dominio de VL que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 267, donde (a) el brazo anti-CD3 comprende mutaciones por sustitución de T366S, L368A, Y407V y N297G y (b) el brazo anti-CD20 comprende mutaciones por sustitución de T366W y N297G.

En algunas versiones, cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 antes mencionados puede comprender uno o más dominios constantes de cadenas pesadas, donde el o los dominios constantes de cadenas pesadas son seleccionados de un primer dominio CH1 ($CH1_1$), un primer dominio CH2 ($CH2_1$), un primer dominio CH3 ($CH3_1$), un segundo dominio CH1 ($CH1_2$), un segundo dominio CH2 ($_2$) y un segundo dominio CH3 ($CH3_2$). En algunas versiones, al menos uno de los dominios constantes de cadenas pesadas está emparejado con otro dominio constante de cadenas pesadas. En algunas versiones, los dominios $CH3_1$ y $CH3_2$ comprenden una protuberancia o una cavidad, donde la protuberancia o cavidad en el dominio $CH3_1$ puede posicionarse en la cavidad o la protuberancia respectiva del dominio $CH3_2$. En algunas versiones, los dominios $CH3_1$ y $CH3_2$ se encuentran en una interfaz entre las mencionadas protuberancia y cavidad. En algunas versiones, los dominios $CH2_1$ y $CH2_2$ comprenden una protuberancia o una cavidad, donde la protuberancia o cavidad en el dominio $CH2_1$ puede posicionarse en la cavidad o la protuberancia respectiva del dominio $CH2_2$. En algunas versiones, los dominios $CH2_1$ y $CH2_2$ se encuentran en una interfaz entre las mencionadas protuberancia y cavidad.

En algunas versiones, la vida media de cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 antes mencionados puede ser de aproximadamente 7 días.

En algunas versiones, la invención presenta un inmunoconjugado que comprende cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 antes mencionados conjugado a un agente citotóxico. También se proporciona una composición que comprende cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 antes mencionados. En algunas versiones, la composición también comprende un portador, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptado. En algunas versiones, la composición es de carácter farmacéutico. En algunas versiones, la composición también comprende un antagonista de unión al eje PD-1 o un agente clínico adicional. En otro caso, la invención presenta un ácido nucleico aislado que codifica cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 que se revelan en el presente, y que comprende un vector (p. ej. un vector de expresión) para expresar el anticuerpo.

En otro caso, la invención presenta células anfitrionas que comprenden los ácidos nucleicos o vectores antes mencionados. En algunas versiones, la célula anfitriona es una célula mamífera (p. ej. una célula (CHO) del ovario de un hámster chino). En otras versiones, la célula anfitriona es una célula procariota (p. ej. una célula de *E. coli*). También se proporciona un método para producir cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 antes mencionados, cual método implica cultivar las células anfitrionas que producen el anticuerpo anti-CD3 y recuperar el anticuerpo anti-CD3 de la célula anfitriona o el medio de cultivo.

En algunos casos, cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 antes mencionados puede

utilizarse como medicamento. En algunas versiones, cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 puede utilizarse para tratar o dilatar la progresión de un trastorno proliferativo de células o de un trastorno autoinmunológico en un sujeto que requiera tal tratamiento. En algunas versiones, cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 puede utilizarse para mejorar la función inmunitaria de un sujeto que padezca un trastorno proliferativo de células o un trastorno autoinmunológico.

En algunos casos, la invención presenta el uso de cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 antes mencionados para fabricar un medicamento para tratar o dilatar la progresión de un trastorno proliferativo de células o un trastorno autoinmunológico. En algunos casos, la invención presenta el uso de cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 antes mencionados para fabricar un medicamento para mejorar la función inmunitaria de un sujeto que padece un trastorno proliferativo de células o un trastorno autoinmunológico.

Otro aspecto de la invención es un método para tratar o dilatar la progresión de un trastorno proliferativo de células o de un trastorno autoinmunológico en un paciente que requiera tal tratamiento. El método consiste en administrar al sujeto una cantidad efectiva de cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 antes mencionados. En otro caso, la invención presenta un método para mejorar la función inmunológica de un sujeto que padece un trastorno proliferativo de células o un trastorno autoinmunológico. El método consiste en administrar al sujeto cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 antes mencionados. En algunas versiones, el anticuerpo anti-CD3 se une a (a) una molécula CD3 ubicada en una célula efectora inmune Y (b) una segunda molécula biológica ubicada en una célula diana distinta de la célula efectora inmune. En algunas versiones, el anticuerpo anti-CD3 activa la célula efectora inmune luego de unirse a (a) y (b). En algunas versiones, la célula efectora inmune activada puede provocar un efecto citotóxico o un efecto apoptótico en la célula diana. En algunas versiones, el anticuerpo anti-CD3 se administra al sujeto en una dosis de entre 0,01 MG/KG y 10 mg/kg, aproximadamente. En algunas versiones, el anticuerpo anti-CD3 se administra al sujeto en una dosis de entre 0,1 mg/kg y 10 mg/kg, aproximadamente. En algunas versiones, el anticuerpo anti-CD3 se administra al sujeto en una dosis de alrededor de 1 mg/kg. En algunas versiones, el anticuerpo anti-CD3 es administrado por vía subcutánea, intravenosa, intramuscular, tópica, oral, transdérmica o intraperitoneal; por órbita, por implantación, por inhalación o por vía intratecal, intraventricular o intranasal. En algunas versiones, el anticuerpo anti-CD3 se administra por vía subcutánea. En algunas versiones, el anticuerpo anti-CD3 se administra por vía intravenosa.

En algunas versiones, el anticuerpo anti-CD3 comprende un brazo anti-HER2 que contiene una mutación por sustitución de N297G. En algunas versiones, el anticuerpo anti-CD3 comprende un brazo anti-CD3 que contiene una o varias mutaciones por sustitución de T366S, L368A, Y407V o N297G y un brazo anti-HER2 que contiene una o varias mutaciones por sustitución de N297G, N297A, L234A, L235A o D265A. En algunas representaciones, el anticuerpo comprende un brazo anti-CD3 que contiene una

mutación por sustitución de N297G. En algunas representaciones, el anticuerpo anti-CD3 comprende un brazo anti-HER2 que contiene mutacion(es) por sustitución de T366S, L368A, Y407V y/o N297G y un brazo anti-CD3 que contiene mutacion(es) por sustitución de N297G, N297A, L234A, L235A y/o D265A.

En algunas versiones, el método también implica administrar al paciente un glucocorticoide. En algunas versiones, el glucocorticoide es seleccionado de un grupo compuesto por dexametasona, hidrocortisona, cortisona, prednisolona, prednisona, metilprednisolona, triamcinolona, parametasona, betametasona, fludrocortisona y ésteres, sales y complejos de esos compuestos. En algunas versiones, el glucocorticoide es dexametasona. En algunas versiones, el glucocorticoide es un éster, una sal o un complejo de dexametasona farmacéuticamente aceptado.

En algunas versiones, el método también implica administrar rituximab al paciente.

En algunas versiones, el método también implica administrar obinutuzumab al paciente.

En algunas versiones, el método también implica administrar al paciente un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC por sus siglas en inglés).

En cualquiera de los usos o métodos mencionados anteriormente, el trastorno proliferativo de células puede ser cáncer. En algunas versiones, el cáncer es seleccionado del grupo que comprende cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón no microcítico, linfoma no Hodgkin (NHL por sus siglas en inglés), linfoma de células B, leucemia de células B, mieloma múltiple, cáncer renal, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer de cabeza y cuello, melanoma, cáncer de ovario, mesotelioma, gliobastoma, linfoma difuso de células B grandes, linfoma de células semejantes a la célula B activada, linfoma folicular, linfoma de células de manto, leucemia mieloide aguda, leucemia linfoide crónica, linfoma de zona marginal, leucemia linfocítica de célula pequeña, linfoma linfoplasmacítico, macroglobulinemia de Waldenstrom, linfoma del sistema nervioso central, linfoma de Burkitt, linfoma prolinfocítico de células B, linfoma esplénico de zona marginal, leucemia de células vellosas, linfoma o leucemia esplénico, linfoma esplénico difuso de linfocitos pequeños de pulpa roja, variante de leucemia de células vellosas, macroglobulinemia de waldenstrom, enfermedades de cadenas pesadas, enfermedad de cadenas alfa, enfermedad de cadenas gamma, enfermedad de cadenas mu, mieloma de células plasmáticas, plasmocitoma óseo solitario, plasmocitoma extraóseo, linfoma de tejido linfoide asociado a mucosa, linfoma de zona marginal nodal, linfoma de zona marginal nodal pediátrico, linfoma folicular pediátrico, linfoma primario cutáneo de células del centro folicular, linfoma de células grandes B rico en células T/ histiocitos, linfoma primario del sistema nervioso central, linfoma cutáneo primario, linfoma difuso de células B grandes positivo al virus de Epstein-Barr del anciano, linfoma difuso de células grandes asociado con inflamación crónica, granulomatosis linfomatoide, linfoma primario mediastinal de células B grandes, linfoma intravascular de células B grandes, linfoma anaplásico ALK positivo, linfoma plasmablástico, linfoma de células grandes B originado en enfermedad de Castleman asociado a HHV-8, linfoma de efusion primaria: linfoma de células B, inclasificable, con características intermedias entre

linfoma difuso de células B grandes y linfoma de Burkitt, y linfoma de células B, inclasificable, con características intermedias entre linfoma difuso de células B grandes y linfoma clásico de Hodgkin. En algunas versiones, el cáncer preferente es el linfoma de células B semejantes a las del centro germinal (GCB), linfoma de células semejantes a la célula B activada (ABC), linfoma folicular (FL), linfoma de células de manto (MCL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfoide crónica (CLL), linfoma de zona marginal (MZL), leucemia linfocítica de célula pequeña (SLL), linfoma linfoplasmacítico (LL), macroglobulinemia de Waldenstrom (WM), linfoma del sistema nervioso central (CNSL) o linfoma de Burkitt (BL).

En cualquiera de los usos o métodos mencionados anteriormente, el trastorno autoinmunológico puede ser seleccionado de un grupo compuesto por artritis reumatoide, artritis juvenil reumatoide, lupus sistémico eritomatoso (SLE), granulomatosis de Wegener, enfermedad inflamatoria intestinal, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), púrpura trombocitopénica trombótica (TTP), trombocitopenia autoinmune, esclerosis múltiple, psoriasis, nefropatía por IgA, polineuropatía asociada a IgM, miastenia gravis, vasculitis, diabetes mellitus, síndrome de Raynaud, síndrome de Sjögren, glomerulonefritis, neuromielitis óptica (NMO) y neuropatía igG.

En otro caso, la invención presenta un kit que contiene: (a) una composición que consta de cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 antes mencionados y (b) un paquete inserto que contiene instrucciones para administrar la composición a un paciente para tratar o dilatar la progresión de un trastorno proliferativo de células.

En cualquiera de los usos o métodos antes mencionados, el paciente puede ser un humano.

Descripción breve de los dibujos

La FIGURA 1 muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena simple de CD3EG humano con una secuencia enlace 26mero utilizado en experimentos de mapeo de epítopos de CD3 (N.° de ID de Sec.: 282).

La FIGURA 2A es una tabla que resume la caracterización de clones hibridoma selectos. La tabla resume los resultados del método ELISA de unión CD3 utilizando CD3ε^{1-27}-Fc de humano y de macaco; ensayos de unión de FACS utilizando células T jurkat humanas, PBMCs humanas y de macacos; experimentos de activación de células T utilizando análisis FACS, y experimentos de determinación de isotipos.

La FIGURA 2B es una tabla que resume las afinidades de unión (valores Kd) de clones hibridoma seleccionados para antígenos humanos CD3εγ comerciales.

La FIGURA 3A es una tabla que resume la caracterización de hibridomas selectos. La tabla resume los resultados del método ELISA de unión CD3 utilizando CD3ε^{1-27}-Fc de humano y de macaco; ensayos de unión de FACS utilizando células T jurkat humanas, PBMCs humanas y de macacos; experimentos de activación de células T utilizando

análisis FACS, y experimentos de determinación de isoptipos.

Las FIGURAS 3B y 3C son tablas que reducen las afinidades de unión (valores Kd) de clones hibridoma seleccionados.

La FIGURA 4A muestra las secuencias de aminoácidos de dominios variables de cadena ligera de los anticuerpos anti-CD3. Las secuencias HVR están delimitadas para las casillas designadas para cada anticuerpo.

La FIGURA 4B muestra las secuencias de aminoácidos de dominios variables de cadena ligera de los anticuerpos anti-CD3.

La FIGURA 4C muestra las secuencias de aminoácidos de dominios variables de cadena pesada de los anticuerpos anti-CD3.

La FIGURA 5A muestra las secuencias de aminoácidos de dominios variables de cadena ligera de los anticuerpos anti-CD3.

La FIGURA 5B muestra las secuencias de aminoácidos de dominios variables de cadena pesada de los anticuerpos anti-CD3.

La FIGURA 6A muestra las secuencias de aminoácidos de dominios variables de cadena ligera de los anticuerpos anti-CD3 21A9 y Rab17.

La FIGURA 6B muestra las secuencias de aminoácidos de dominios variables de cadena pesada de los anticuerpos anti-CD3 21A9 y Rab17.

La FIGURA 7 es una alineación de secuencias de dominios variables de cadena ligera (parte superior) y dominios variables de cadena pesada (parte inferior) de secuencias de aminoácidos de anticuerpos anti-CD3 que muestran la secuencia de consenso, 40G5c, derivada de los anticuerpos clónicos relacionados.

La FIGURA 8A es una alineación de secuencias de dominios variables de cadena ligera (parte superior) y dominios variables de cadena pesada (parte inferior) de secuencias de aminoácidos de anticuerpos anti-CD3 13A3 y una variante humanizada (hu13A3).

La FIGURA 8B es una alineación de secuencias de dominios variables de cadena ligera (parte superior) y dominios variables de cadena pesada (parte inferior) de secuencias de aminoácidos de anticuerpos anti-CD3 30A1 y una variante humanizada (hu30A1).

La FIGURA 8C es una alineación de secuencias de dominios variables de cadena ligera (parte superior) y dominios variables de cadena pesada (parte inferior) de secuencias de aminoácidos de anticuerpos anti-CD3 41D9a y una variante humanizada (hu41D9a).

La FIGURA 8D es una alineación de secuencias de dominios variables de cadena ligera (parte superior) y dominios variables de cadena pesada (parte inferior) de secuencias de aminoácidos de anticuerpos anti-CD3 SP34 y una variante humanizada (huSP34).

La FIGURA 8E es una alineación de secuencias de dominios variables de cadena ligera (parte superior) y dominios variables de cadena pesada (parte inferior) de secuencias de aminoácidos de anticuerpos anti-CD3 38E4 y una variante humanizada (hu38E4).

La FIGURA 8F es una alineación de secuencias de dominios variables de cadena ligera (parte superior) y dominios variables de cadena pesada (parte inferior) de secuencias de aminoácidos de anticuerpos anti-CD3 40G5 y una variante humanizada (hu40G5).

La FIGURA 9A es una tabla que resume las variantes humanizadas seleccionadas del

anticuerpo anti-CD3 13A3 y sus afinidades de unión, determinadas mediante el uso de CD3ε comercial (Creative Biomart, Shirley, NY; N.° de catálogo CD3E-2194H).

La FIGURA 9B es una tabla que resume las variantes humanizadas seleccionadas del anticuerpo anti-CD3 30A1 y sus afinidades de unión, determinadas mediante el uso de CD3ε comercial (Creative Biomart, Shirley, NY; N.° de catálogo CD3E-2194H).

La FIGURA 9C es una tabla que resume las variantes humanizadas seleccionadas del anticuerpo anti-CD3 41D9a y sus afinidades de unión, determinadas mediante el uso de CD3ε comercial (Creative Biomart, Shirley, NY; N.° de catálogo CD3E-2194H).

La FIGURA 9D es una tabla que resume las variantes humanizadas del anticuerpo anti-CD3 SP34 y sus afinidades de unión, determinadas mediante el uso de CD3ε comercial (Creative Biomart, Shirley, NY; N.° de catálogo CD3E-2194H).

La FIGURA 9E es una tabla que resume las variantes humanizadas seleccionadas del anticuerpo anti-CD3 38E4 y sus afinidades de unión, determinadas mediante el uso de CD3ε comercial (Creative Biomart, Shirley, NY; N.° de catálogo CD3E-2194H).

La FIGURA 9F es una tabla que resume las variantes humanizadas seleccionadas del anticuerpo anti-CD3 40G5c y sus afinidades de unión, determinadas mediante el uso de CD3ε comercial (Creative Biomart, Shirley, NY; N.° de catálogo CD3E-2194H).

La FIGURA 10 es una tabla que resume la afinidad de unión de los anticuerpos anti-CD3 humanizados para varios antígenos CD3ε.

La FIGURA 11 es una tabla que resume la afinidad de los anticuerpos anti-CD3 humanizados 38E4v1 a 38E4v9 y 40G5C, según mediciones Biacore con CD3εγ humano en chip y anticuerpos anti-CD3 en flujo continuo.

La FIGURA 12A es una tabla que resume las afinidades de unión relativas para mutaciones de alanina, serina, treonina o glutamato de los anticuerpos anti-CD3 38E4v1humanizados con una sola mutación en HVR-L3 o en HV3-H3, en comparación con 38E4v1 utilizando análisis kinético Biacore de siglo único o el convencional de ciclo múltiple.

La FIGURA 12B muestra las secuencias de aminoácidos HVR-L3 (parte superior) y HVR-H3 (parte inferior) del anticuerpo anti-CD3 humanizado 38E4v1.

La FIGURA 13A consiste en una serie de gráficos que muestran la unión relativa del anticuerpo anti-CD3 señalado con las variantes de alanina de $CD3\varepsilon^{1-27}$-Fc.

La FIGURA 13B es un gráfico que muestra la fracción relativa de mutantes fagémidos por barrido de alanina unidos a anticuerpos anti-CD3 38E4.v1, 40G5c y SP34.v52, en comparación con la unión de fago CD3εγ de tipo salvaje.

La FIGURA 13C consiste en una serie de gráficos que muestran la relativa afinidad de los anticuerpos anti-CD3 38E4.v1, 40G5c y SP34.v52 con mutantes fagémidos por barrido de alanina CD3εγ seleccionados como función de la concentración de fago.

La FIGURA 13D consiste en una serie de tablas que muestran las afinidades de unión relativas de los anticuerpos anti-CD3 SP34.v52 y 38E4v1 con mutantes CD3εγ por barrido de alanina, según las mediciones Biacore. NB = Unión no detectable.

La FIGURA 14A muestra la secuencia del polipéptido CD3ε 16mero utilizado en pruebas

de cocristalización con 38E4.v1 Fab.

Las FIGURAS 14B A 14F consisten en una serie de representaciones de la estructura cristalina que muestran diferentes panoramas respecto del complejo péptido hu38E4.v1 Fab/CD3ε.

La FIGURA 14G es una alineación de secuencias de dominios variables de cadena ligera (parte superior) y dominios variables de cadena pesada (parte inferior) de secuencias de aminoácidos de anticuerpos anti-CD3 hu40G5c y hu38E4.v1, con residuos de cada anticuerpo que son importantes para unir CD3 (residuos de contacto) en la alineación. Dichos residuos se encuentran dentro de 5 Å del péptido CD3, conforme se determinó por medio de análisis cristalográficos. Δ denota posiciones de vernier (como referencia consultar, p. ej. Foote and Winter. *JMB.* 224: 487, 1992); * denota intracciones FW-HVR (como referencia consultar, p. ej., Padlan et al. *Mol. Immunol*. 31: 169, 1994); * denota intracciones VH-VL (como referencia consultar, p. ej., Padlan et al. *Mol. Immunol*. 31: 169, 1994).

La FIGURA 14H es una representación de la estructura de cristal del polipéptido CD3ε unido por hu38E4.v1 Fab. Todos los residuos de contacto antígenos se muestran en amarillo. Todos los residuos de contacto son iguales entre hu38E4.v1 y hu40G5, excepto que G96 (marcado en naranja) es S96 en hu40G5.

Las FIGURAS 14I y 14J son representaciones de diagramas de Richardson de la estructura de cristal de hu38E4.v1 Fab y SP34v52 Fab, respectivamente, en la misma orientación, superpuestas con la región VL con un RMS = 2,24.

La FIGURA 14K es un modelo de relleno que representa el hu38E4.v1 Fab complejado con el péptido CD3ε N-terminal unido en la grieta entre las cadenas pesadas (cian) y ligeras (violeta).

La FIGURA 14L es un modelo de relleno que representa el SP34v52 con el péptido CD3ε N-terminal, superpuesto en la misma orientación que en el complejo CD3ε/hu38E4.v1 Fab descripto en la Figura 14K. Los residuos R50 Y R52 (en naranja) de HVR-H2 de SP34v52 Fab son importantes para la unión de CD3. Los choques claros del péptido CD3 con SP34v52 Fab se indican mediante flechas.

La FIGURA 14M es una representación de la estructura de cristal de hu38E4.v1 complejado con el péptido N-terminal de CD3εγ e ilustra las principales interacciones intermoleculares que intervienen en el primer residuo piroglutamina y el sexto residuo (E6) en CD3εγ. Las potenciales uniones de hidrógeno se muestran como líneas discontinuas.

La FIGURA 14N es un modelo de relleno que representa el hu38E4.v1 Fab complejado con el péptido CD3εγ N-terminal unido en la grieta entre las cadenas pesadas (cian) y ligeras (violeta). El quinto residuo (E5), como se ilustra, apunta al lado contrario del sitio interactivo que contiene el secto residuo (E6) del complejo péptido CD3εγ N-terminal y Fab.

La FIGURA 15 describe una generalización esquemática de la formación del anticuerpo TDB. El TDB particular que se describe se muestra como un TDB en toda su extensión en

formato botón en ojal, que puede tener una mutación por glicosilación si es producido por una célula eucariota (p. ej. una célula CHO). En un formato alternativo, es posible que el botón esté presente en el brazo anti-CD3, y es posible que el ojal esté presente en el brazo del antígeno anti-tumoral. También es posible que este formato posea una mutación por glicosilación, si se produjera por una célula eucariota (p. ej. una célula CHO).

La FIGURA 16 consta de gráficos que muestran los resultados FACS de ensayos de unión *in vitro* de distintos TDBs CD3/CD20 con diferentes combinaciones de brazos anti-CD3 de series UCHT1 y brazos anti-CD20 de series 2H7. A la izquierda, unión de línea celular Bjab (unión CD20). A la derecha, unión con células Jurkat (unión CD3).

La FIGURA 17 consta de un conjunto de tablas que resumen las afinidades de unión monovalentes (parte superior) y bivalentes como valores Kd para varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones brazos anti-CD3 de series UCHT1 y brazos anti-CD20 de series 2H7.

La FIGURA 18 consta de un gráfico que muestra los resultados de los ensayos de FACS de unión de células Jurkat *in vitro* (unión CD3) de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16.

La FIGURA 19 consta de un gráfico que muestra los resultados de los ensayos de FACS de unión de células Jurkat *in vitro* (unión CD3) de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16.

La FIGURA 20 consta de un gráfico que muestra los resultados de los ensayos de FACS de unión de células Bjab *in vitro* (unión CD20) de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16.

Las FIGURAS 21A y 21B constan de gráficos que muestran los resultados de los ensayos de FACS de unión de células Jurkat *in vitro* (unión CD3) de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16.

La FIGURA 21C es una tabla que resume la CE50 (µg/ml) para cada TDB CD3/CD20 probado en las Figuras 21A y 21B.

Las FIGURAS 22A y 22B constan de gráficos que muestran los resultados de los ensayos de FACS de unión de células Bjab *in vitro* (unión CD20) de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16.

La FIGURA 23 consta de un gráfico que muestra los resultados de los ensayos de FACS de unión de células Jurkat *in vitro* (unión CD3) de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16.

La FIGURA 24 es una tabla que resume las afinidades de unión de varios TDBs y Fabs CD3/CD20, según las mediciones realizadas mediante análisis Biacore con CD3εγ humano en chip y TDB o Fab CD3/CD20 en flujo constante.

La FIGURA 25A es un gráfico que muestra el porcentaje de activación de células T, según las mediciones de expresión de superficie de CD69 y CD25, luego de 24 de incubación de TDBs CD3/CD20 específicos (serie 2H7) con 20.000 células Bjab y células hu CD8+ T purificadas 5 veces.

La FIGURA 25B es un gráfico que muestra el porcentaje de destrucción de Bjab relativo al control sin tratamiento TDB, luego de 24 horas de incubación de TDBs CD3/CD20 específicos (serie 2H7) con 20.000 células Bjab y células hu CD8+ T purificadas 5 veces, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 26A es un gráfico que muestra el porcentaje de activación de células T, según las mediciones de expresión de superficie de CD69 y CD25, luego de 24 horas de incubación de TDBs CD3/CD20 específicos (serie 2H7) con 200.000 células PBMC humanas por pozo.

La FIGURA 26B es un gráfico que muestra el porcentaje de eliminación de células B endógenas relativo al control sin tratamiento TDB, luego de 24 horas de incubación de TDBs CD3/CD20 específicos (serie 2H7) con 200.000 células PBMC humanas por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 27A es un gráfico que muestra el porcentaje de activación de células T, según las mediciones de expresión de superficie de CD69 y CD25, luego de 24 horas de incubación de TDBs CD3/CD20 específicos (serie UCHT1) con 20.000 células Bjab y células hu CD8+ T purificadas 5 veces.

La FIGURA 27B es un gráfico que muestra el porcentaje de destrucción de Bjab relativo al control sin tratamiento TDB, luego de 24 horas de incubación de TDBs CD3/CD20 específicos (serie UCHT1) con 20.000 células Bjab y células hu CD8+ T purificadas 5 veces, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 28A es un gráfico que muestra el porcentaje de activación de células T, según las mediciones de expresión de superficie de CD69 y CD25, luego de 24 horas de incubación de TDBs CD3/CD20 específicos (serie UCHT1) con 200.000 células PBMC humanas por pozo.

La FIGURA 28B es un gráfico que muestra el porcentaje de eliminación de células B endógenas relativo al control sin tratamiento TDB, luego de 24 horas de incubación de TDBs CD3/CD20 específicos (serie UCHT1) con 200.000 células PBMC humanas por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 29A es un gráfico que muestra el porcentaje de eliminación de células B endógenas relativo al control sin tratamiento TDB, luego de 24 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #3) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 29B es un gráfico que muestra el porcentaje de eliminación de células B endógenas, según las mediciones de expresión de superficie de CD69 y CD25, luego de 24 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2h7V16, con 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #3) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 30A es un gráfico que muestra el porcentaje de eliminación de células B endógenas relativo al control sin tratamiento TDB, luego de 24 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo

anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #4) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 30B es un gráfico que muestra el porcentaje de eliminación de células B endógenas, según las mediciones de expresión de superficie de CD69 y CD25, luego de 24 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #4) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 31A es un gráfico que muestra el porcentaje de eliminación de células B endógenas relativo al control sin tratamiento TDB, luego de 24 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #2) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 31B es un gráfico que muestra el porcentaje de activación de células T, según las mediciones de expresión de superficie de CD69 y CD25, luego de 24 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC de macaco (aisladas del Donante #2) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 32A es un gráfico que muestra el porcentaje de eliminación de células B endógenas relativo al control sin tratamiento TDB, luego de 24 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC de macaco (aisladas del Donante #3) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 32B es un gráfico que muestra el porcentaje de activación de células T, según las mediciones de expresión de superficie de CD69 y CD25, luego de 24 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC de macaco (aisladas del Donante #3) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 33A es un gráfico que muestra el porcentaje de destrucción de Bjab relativo al control sin tratamiento TDB, luego de 24 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC de macaco por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 33B es un gráfico que muestra el porcentaje de activación de células T, según las mediciones de expresión de superficie de CD69 y CD25, luego de 24 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC de macaco por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 34A es un gráfico que muestra el porcentaje de eliminación de células B endógenas relativo al control sin tratamiento TDB, luego de 24 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #2) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 34B es un gráfico que muestra el porcentaje de activación de células T, según las mediciones de expresión de superficie de CD69 y CD25, luego de 24 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #2) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 35A es un gráfico que muestra el porcentaje de eliminación de células B endógenas relativo al control sin tratamiento TDB, luego de 24 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #3) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 35B es un gráfico que muestra el porcentaje de activación de células T, según las mediciones de expresión de superficie de CD69 y CD25, luego de 24 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #3) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 36A es un gráfico que muestra el porcentaje de eliminación de células B endógenas relativo al control sin tratamiento TDB, luego de 24 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #4) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 36B es un gráfico que muestra el porcentaje de activación de células T, según las mediciones de expresión de superficie de CD69 y CD25, luego de 24 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #4) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

Las FIGURAS 37A y 37B son gráficos que muestran el porcentaje de activación de células T, según las mediciones de expresión de superficie de CD69 y CD25, luego de 24 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #1) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 37C es una tabla que resume la activación CE50 (ng/ml) de células CD8+ T para cada TDB CD3/CD20 probado en las Figuras 37A y 37B.

Las FIGURAS 38A y 38B son gráficos que muestran el porcentaje de eliminación de células B endógenas relativo al control sin tratamiento TDB, luego de 24 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #1) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 38C es una tabla que resume la eliminación CE50 (ng/ml) de células B endógenas para cada TDB CD3/CD20 probado en las Figuras 38A y 38B.

Las FIGURAS 39A y 39B son gráficos que muestran el porcentaje de activación de células T, según las mediciones de expresión de superficie de CD69 y CD25, luego de 48 horas de

incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #1) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 39C es una tabla que resume la activación CE50 (ng/ml) de células CD8+ T para cada TDB CD3/CD20 probado en las Figuras 39A y 39B.

Las FIGURAS 40A y 40B son gráficos que muestran el porcentaje de eliminación de células B endógenas relativo al control sin tratamiento TDB, luego de 48 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #1) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 40C es una tabla que resume la eliminación CE50 (ng/ml) de células B endógenas para cada TDB CD3/CD20 probado en las Figuras 40A y 40B.

Las FIGURAS 41A y 41B son gráficos que muestran el porcentaje de activación de células T, según las mediciones de expresión de superficie de CD69 y CD25, luego de 24 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #2) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 41C es una tabla que resume la activación CE50 (ng/ml) de células CD8+ T para cada TDB CD3/CD20 probado en las Figuras 41A y 41B.

Las FIGURAS 42A y 42B son gráficos que muestran el porcentaje de eliminación de células B endógenas relativo al control sin tratamiento TDB, luego de 24 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #2) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 42C es una tabla que resume la eliminación CE50 (ng/ml) de células B endógenas para cada TDB CD3/CD20 probado en las Figuras 42A y 42B.

Las FIGURAS 43A y 43B son gráficos que muestran el porcentaje de activación de células T, según las mediciones de expresión de superficie de CD69 y CD25, luego de 48 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #2) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 43C es una tabla que resume la activación CE50 (ng/ml) de células CD8+ T para cada TDB CD3/CD20 probado en las Figuras 43A y 43B.

Las FIGURAS 44A y 44B son gráficos que muestran el porcentaje de eliminación de células B endógenas relativo al control sin tratamiento TDB, luego de 48 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #2) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 44C es una tabla que resume la eliminación CE50 (ng/ml) de células B endógenas para cada TDB CD3/CD20 probado en las Figuras 44A y 44B.

La FIGURA 45A es un gráfico que muestra que ciertos TDB CD3/CD20, como por ejemplo

uno que tiene un brazo anti-CD20 de 2H7v16 y un brazo anti-CD3 de 72H6, no presentan potencia *in vitro*, conforme a los ensayos de destrucción de Bjab.

Las FIGURA 45B y 45C son gráficos que muestran que ciertos TDB CD3/CD20, como por ejemplo uno que tiene un brazo anti-CD20 de 2H7v16 y un brazo anti-CD3 de 72H6, no presentan potencia *in vitro*, conforme a los ensayos de eliminación de células B endógenas (B) y a los ensayos de activación de células T (C).

La FIGURA 46A es un gráfico que muestra que ciertos TDB CD3/CD20, como por ejemplo uno que tiene un brazo anti-CD20 de 2H7v16 y un brazo anti-CD3 de 13A3, no presentan baja potencia *in vitro*, conforme a los ensayos de destrucción de Bjab.

La FIGURA 46B es un gráfico que muestra que ciertos TDB CD3/CD20, como por ejemplo uno que tiene un brazo anti-CD20 de 2H7v16 y un brazo anti-CD3 de 30A1, presentan baja potencia *in vitro*, conforme a los ensayos de destrucción de Bjab.

La FIGURA 46C es un gráfico que muestra que ciertos TDB CD3/CD20, como por ejemplo uno que tiene un brazo anti-CD20 de 2H7v16 y un brazo anti-CD3 de 41D9a, presentan baja potencia *in vitro*, conforme a los ensayos de destrucción de Bjab. Se muestran los valores de destrucción CE50 (ng/ml) de Bjab para cada TDB CD3/CD20 probado.

La FIGURA 46D es un gráfico que muestra que ciertos TDB CD3/CD20, como por ejemplo uno que tiene un brazo anti-CD20 de 2H7v16 y un brazo anti-CD3 de 41D9a, presentan baja potencia *in vitro*, conforme a los ensayos de eliminación de células B endógenas. Se muestran los valores de eliminación CE50 (ng/ml) de células B endógenas para cada TDB CD3/CD20 probado.

La FIGURA 46E es un gráfico que muestra que ciertos TDB CD3/CD20, como por ejemplo uno que tiene un brazo anti-CD20 de 2H7v16 y un brazo anti-CD3 de 41D9a, presentan baja potencia *in vitro*, conforme a los ensayos de activación de células T.

La FIGURA 47A es un gráfico que muestra que ciertos TDB CD3/CD20, como por ejemplo aquellos que tienen un brazo anti-CD20 de 2H7v16 y un brazo anti-CD3 de UCHT1v9, 21A9 y 40G5c, presentan gran potencia *in vitro*, conforme a los ensayos de eliminación de células B endógenas que utilizan 200.000 células PBMC (aisladas del Donante #1) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 47B es un gráfico que muestra que ciertos TDB CD3/CD20, como por ejemplo aquellos que tienen un brazo anti-CD20 de 2H7v16 y un brazo anti-CD3 de UCHT1v9, 21A9 y 40G5c, presentan gran potencia *in vitro*, conforme a los ensayos de activación de células T que utilizan 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #1) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 48A es un gráfico que muestra que ciertos TDB CD3/CD20, como por ejemplo aquellos que tienen un brazo anti-CD20 de 2H7v16 y un brazo anti-CD3 de UCHT1v9, 21A9 y 40G5c, presentan gran potencia *in vitro*, conforme a los ensayos de eliminación de células B endógenas que utilizan 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #2) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 48B es un gráfico que muestra que ciertos TDB CD3/CD20, como por ejemplo aquellos que tienen un brazo anti-CD20 de 2H7v16 y un brazo anti-CD3 de UCHT1v9,

21A9 y 40G5c, presentan gran potencia *in vitro*, conforme a los ensayos de activación de células T que utilizan 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #2) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 49 es una tabla que resume las potencias *in vitro* para distintos TDB CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16.

La FIGURA 50 muestra los dominios variables de cadena ligera (parte superior) y dominios variables de cadena pesada (parte inferior) de secuencias de aminoácidos de anticuerpos anti-CD20 2H7.v16.

La FIGURA 51 muestra los dominios variables de cadena ligera (parte superior) y dominios variables de cadena pesada (parte inferior) de secuencias de aminoácidos de anticuerpos anti-CD3 hu40G5c.

Las IMÁGENES 52A y 52B muestran que los TDB CD3/CD20 (40G5c/2H7v16) purificados no tienen una formación perceptible de agregados según lo determinado por la cromatografía de exclusión de tamaños (SEC) (A) y ninguna formación de homodímeros perceptibles (es decir, formación de anticuerpos CD3/CD3 o CD20/CD20) según lo evaluado por la espectometría de masas.

La FIGURA 53A es un gráfico que muestra la farmacocinética de las concentraciones séricas de los TDB CD3/CD20 en dosis variables en ratas Sprague Dawley (SD) a través del tiempo (en días), según la evaluación de farmacocinética genérica de inmunoglobulina (GRIP) o un ensayo específico.

LA FIGURA 53B es una tabla que resume los valores del margen cuantificado (ml/día/kg) de los anticuerpos TDB CD3/CD20 probados en cada dosis probada en la Figura 53A.

La FIGURA 54A es un gráfico que muestra que la sección F $(ab')_2$ de TDB CD20 retuvo la misma potencia que el TDB CD20 IgG de longitud completa en la destrucción de células B (muerte Bjab) *in vitro*. 20.000 células Bjab y 200.000 PBMC aislados de donantes sanos fueron incubados con varias concentraciones de TDB CD20 de longitud completa o TDB CD20 F (ab')2 durante 24 horas.

La FIGURA 54B es un gráfico que muestra que la actividad de la destrucción celular B de TDB CD20 es dependiente de células T, dado que no se detectó una matanza de células B con PBMC agotados de células T CD3+. 20.000 células Bjab y 200.000 PBMC aislados de donantes sanos o 200.000 PBMC agotados de células T CD3+ fueron incubadas con varias concentraciones de TDB CD20 durante 24 horas.

LA FIGURA 54C es un gráfico que muestra que la destrucción de células B comparable se puede lograr ya sea con células T CD4+ o CD8+ como efectores. 20.000 células Bjab y 100.000 células T CD8+ purificadas o células T CD4+ se incubaron con diversas concentraciones de TDB CD20 durante 24 horas. La destrucción celular y la activación de células marcadas como T CD69+CD25+ se midieron y calcularon como se describe a continuación.

La FIGURA 54D es un gráfico que muestra que TDB CD20 es capaz de activar células T CD4+ y CD8+. 20.000 células Bjab y 100.000 células T CD8+ purificadas o células T CD4+

se incubaron con diversas concentraciones de TDB CD20 durante 24 horas. La destrucción celular y la activación de células marcadas como T CD69+CD25+ se midieron y calcularon como se describe a continuación.

La FIGURA 54E es un gráfico que muestra que la sobrerregulación de granzima es más frecuente dentro de las células T CD8+ tras la adición de TDB CD20. 20.000 células Bjab y 100.000 células T CD8+ purificadas o células T CD4+ se incubaron con diversas concentraciones de TDB CD20 durante 24 horas. La inducción de la granzima B también se detectó por medio de FACS.

La FIGURA 54F es un gráfico que muestra que un mayor nivel de liberación de perforina está asociado con las células T CD8+ tras la adición de TDB CD20. 20.000 células Bjab y 100.000 células T CD8+ purificadas o células T CD4+ se incubaron con diversas concentraciones de TDB CD20 durante 24 horas. La concentración de perforina en los medios se midió con ELISA.

La FIGURA 55 es una serie de gráficos de citometría de flujo que muestran que las células T activadas son capaces de proliferar en la presencia de células TDB CD20 y Bjab.

La FIGURA 56A es una serie de gráficos que muestran las curvas de destrucción de células B con respuesta a dosis de líneas celulares de tumores/linfomas 8 B (izquierda) y los niveles de expresión de CD20 para líneas de células B dadas con un control de isotipo en gris, medido por FACS. Las células B se cultivaron en medios RPMI 1640 suplementados con FBS al 10 %. Para el ensayo de destrucción, 20.000 células B se incubaron con 200.000 PBMC aisladas de donantes saludables con varias concentraciones de TDB CD20 durante 24 horas.

La FIGURA 56B es un gráfico que muestra una amplia gama en la expresión media de CD20 en las líneas celulares 8 B probadas en la Figura 56A. Las células T CD4+ o T CD8+ purificadas a partir de sangre entera de donantes sanos y etiquetadas con CFSE se incubaron solas y únicamente con Bjab, con TDB CD20 solamente o con Bjab y TDB CD20 durante 24 horas primero y, a continuación, se lavaron las células y se pusieron en medios frescos durante otras 48 horas. La intensidad CFSE de las células T se detectó por FACS, al mostrar la proliferación de las células T sólo en presencia de Bjab y TDB CD20.

La FIGURA 56C es un conjunto de gráficos que muestran que TDB CD20 es potente en destruir todas las 8 líneas de una manera que depende de la dosis, con valores de EC50 de la destrucción de células B (ng/ml) (superior) y el porcentaje de destrucción de células B (parte inferior) representada como una función de la expresión de CD20 sobre la célula diana B.

La FIGURA 56D es un gráfico que muestra que TDB dirigidas a 5 antígenos de células B diferentes son comparables en la mediación de la destrucción de células T de las células Bjab. Las células B se cultivaron en medios RPMI 1640 suplementados con FBS al 10 %. Para el ensayo de destrucción, se incubaron 20.000 células con 100.000 células T CD8+ purificadas a partir de un donante sano con TDB CD20 (TDB A: 2H7v16/UCHT1v9) o una TDB orientada a un antígeno diferente de células B (es decir, TDB B-E, cada una dirigida a un antígeno de células B diferente) en una concentración de 1000 ng/ml durante 24

horas.

La FIGURA 56E es un gráfico que muestra la extensión de destrucción de células B para líneas de células tumorales de leucemia/linfomas 10 B. Las células B se cultivaron en medios RPMI 1640 suplementados con FBS al 10 %. Para el ensayo de destrucción, se incubaron 20.000 células B con 100.000 células T CD8+ purificadas de un donante sano con TDB CD20 de 1000 ng/ml (2H7v16/UCHT1v9) durante 24 horas.

La FIGURA 56F es un gráfico que muestra las curvas de destrucción de respuesta a la dosis para 8 donantes aleatorios.

La FIGURA 56G es un gráfico del resumen del trazado para EC50 (izquierda) y el alcance de la destrucción de células B (derecha) con anticuerpos de 1000 ng/ml en un ensayo de 24 horas para 30 donantes.

La FIGURA 56H es un conjunto de gráficos que muestran que el grado de destrucción de células B en 24 horas por TDB CD20 es muy comparable o mayor que la destrucción de células B por scFv CD19. Para la eliminación de células B autólogas, 200.000 PBMC aisladas de donantes sanos fueron incubadas durante 24 horas con TDB CD20 en la concentración indicada. La muerte celular notificada se calculó como se describe a continuación.

La FIGURA 56I es un conjunto de gráficos que muestran que el grado de destrucción de células B en 24 horas por TDB CD20 es muy comparable o mayor que la destrucción de células B por CD19-TDB o CD22-TDB (panel superior) o CD79a o CD79b (panel inferior). Para la destrucción de células B autólogas, 200.000 PBMC aisladas de donantes sanos fueron incubadas con 40.000 células BJAB durante 24 horas con TDB CD20, CD19, CD22, CD79a o CD 79b en la concentración indicada. La muerte celular notificada se calculó como se describe a continuación.

La FIGURA 57A es una serie de gráficos que muestran los valores relativos de expresión para $CD3_{\varepsilon}$ humano detectado en células T CD4+ (panel izquierdo) y células T CD8+ (panel central); y CD20 humano en células B CD19+ (panel derecho) detectado en un ratón (mu) o PBMC humanos (hu) medido por FACS. Los PBMC de ratones se obtuvieron de la sangre de ratones transgénicos dobles huCD3/huCD20; se obtuvieron PBMC humanos a partir de sangre de donantes sanos.

La FIGURA 57B es un gráfico que muestra que TDB CD20 no puede captar células T murinas para disminuir las células B sin expresión de CD3 humano en ratones transgénicos con CD20 humano. Los ratones transgénicos huCD20 o ratones transgénicos dobles huCD20/CD3 se trataron una vez por vía intravenosa con anticuerpos como se indica (10 mg/kg para rituximab, 0,5 mg/kg para TDB CD20 y TDB HER2). Se recogieron bazos de ratón en D7 (7 días después del tratamiento con anticuerpos). El anticuerpo rituximab CD20 antihumano se utilizó como un control positivo. TDB CD3/HER2 se utiliza como un control de isotipo negativo.

La FIGURA 57C es un gráfico que muestra que TDB CD20 no puede captar células T murinas que expresan huCD3 en ratones transgénicos doble con CD3/CD20 humanos para disminuir potencialmente las células B con expresión de huCD20. Los ratones

transgénicos CD20 o ratones transgénicos dobles huCD20/huCD20 se trataron una vez por vía intravenosa con anticuerpos como se indica (10 mg/kg para rituximab, 0,5 mg/kg para TDB CD3 y TDB HER2). Se recogieron bazos de ratón en D7 (7 días después del tratamiento con anticuerpos). TDB CD3/HER2 se utiliza como un control de isotipo negativo.

La FIGURA 58A es una serie de gráficos de un estudio de curso temporal que muestran que el tratamiento con TDB CD20 resultó en la disminución sostenida de células B hasta D15 (15 días después de la dosificación). Se trataron una vez ratones transgénicos dobles huCD20/huCD3 por vía intravenosa con varias dosis de TDB CD20. Se recolectó sangre de ratón (D1, D8 y D15).

La FIGURA 58B es un gráfico que muestra que la disminución de células B en el bazo de ratón casi completa sólo se logró en D7 después de una sola dosis de 0,5 mg/kg, mientras que una dosis más baja de 0,05 mg/kg sólo dio lugar a la disminución parcial de células B del bazo. Los ratones doble transgénicos huCD20/CD3 fueron tratados una vez por vía intravenosa con diversas dosis de TDB CD20. Se recolectaron bazos (D7).

La FIGURA 58C es un gráfico que muestra que la disminución de células B robusta en D7 se observa en la circulación de los ratones transgénicos dobles huCD3/huCD20 tratados con TDB CD20. Los ratones doble transgénicos huCD20/huCD3 se trataron una vez por vía intravenosa con 0,5 mg/kg de TDB CD20. Se recolectó sangre en D0-5 min. (5 minutos después del tratamiento), D0-2h, D0-8h, D1, D2, D3, y D7. Las células B que expresan huCD20 se midieron con FACS.

La FIGURA 58D es una serie de gráficos que muestran la activación de células T en los ratones doble transgénicos huCD3/huCD20 tratados con un TDB CD20. Los ratones doble transgénicos huCD3/huCD20 tratados exhibieron hasta un aumento del 80 % en $CD3_{\varepsilon}$ humano que expresa el recuento de células T CD8+ a las 2 horas de posteriores al tratamiento con TDB CD20, lo que regresó a nivel básico de D2 y D7 (panel superior). Del mismo modo, $CD3_{\varepsilon}$ humano que expresa las células T CD4+ se incrementó en un 80 % 2 horas después del tratamiento con TDB CD20 y posteriormente regresó al nivel base de D2. Los ratones doble transgénicos huCD3/huCD20 se trataron una vez por vía intravenosa con 0,5 mg/kg de TDB CD20. Se recolectó sangre en D0-5 min. (5 minutos después del tratamiento), D0-2h, D0-8h, D1, D2, D3, y D7. Las células T CD4+ y CD8+ que expresan $CD3_{\varepsilon}$ se midieron con FACS.

La FIGURA 59A es una serie de gráficos de citometría de flujo que muestran que TDB CD20 reduce las células B de la zona marginal (MZB) tan eficientemente como las células B foliculares (FOB) después de la administración de TDB a los ratones doble transgénicos huCD3/huCD20. Dos animales doble transgénicos (paneles de la izquierda y derecha, respectivamente) se trataron con vehículos (paneles superiores) o una dosis intravenosa única de TDB de 0,5 mg/kg (paneles inferiores). Se recolectaron vasos de ratones en D7 y se analizaron con FACS.

La FIGURA 59B-59E es una serie de gráficos que muestran que TDB CD20 reduce células B de la zona marginal (MZB) (B) de forma tan eficiente como las células B foliculares

(FOB) (C) después de una dosis intravenosa única de TDB de 0,5 mg/kg, junto con la activación de las células T CD8+ (D) y la proliferación de las células T CD8+ (E) en el bazo en los momentos indicados. Se recolectaron bazos de ratones en D1, D2, D3, D5, D7 y D14.

La FIGURA 60A es un gráfico que muestra que los ratones humanizados NSG tratados con 3 dosis semanales de TDB CD20 en 0,5 m/kg (ajuste de dosis repetidas) exhibieron niveles escasos de células B en la sangre en D7, con células B casi no detectadas en D21. Los ratones humanizados NSG se trataron con 3 dosis semanales de TDB CD20 de 0,5 mg/kg por vía intravenosa. Se recolectó sangre en D-5 (5 días antes del tratamiento), D7, D14 y D21. Los recuentos de células B murinas en sangre se midieron con FACS.

La FIGURA 60B es un gráfico que muestra que la disminución robusta de células B en D21 se observó en el bazo de ratones humanizados NSG tratados con TDB CD20. Los ratones humanizados NSG se trataron con 3 dosis semanales de 0,5 mg/kg de TDB CD20 por vía intravenosa. Se recolectaron bazos en D21. Los recuentos de células B murinas en el bazo se midieron con FACS.

La FIGURA 60C es una serie de gráficos de citometría de flujo que muestran que las células T huCD8 + proliferan y que las células B huCD19+ disminuyen 7 días después del tratamiento (D7) de ratones humanizados NSG con TDB CD20. Los ratones humanizados NSG se trataron con vehículos o TDB CD20 de 0,5mg/kg (2H7v16/UCHT1v9). Los bazos de control y los ratones humanizados NSG tratados con TDB CD20 se recogieron en D7. Las células B que expresan huCD19 y células T que expresan huCD19 y huCD8 se midieron con FACS.

La FIGURA 60D es un gráfico que muestra que los ratones humanizados NSG tratados con 3 dosis semanales de TDB CD20 en 0,5 mg/kg (ajuste de dosis repetida) mostraron un aumento de hasta 10 veces el recuento de células T CD8+ en D7, que regresó al nivel básico o inferior en D14 y D21. Los ratones humanizados NSG se trataron con 3 dosis semanales de 0,5 mg/kg de TDB CD20 por vía intravenosa. Se recolectó sangre en D-5 (5 días antes del tratamiento), D7, D14 y D21. Los recuentos de células T murinas CD8+ en sangre y la activación de células T se midieron con FACS.

La FIGURA 60E es una serie de gráficos de citometría de flujo que muestra los niveles basales de células B huCD20+ (paneles centrales) y células T huCD8+ y huCD4+ (paneles de la derecha) de 2 ratones humanizados NSG, según se mide con FACS.

La FIGURA 60F es una serie de gráficos que muestran los niveles de expresión en la superficie celular de huCD3$_{\varepsilon}$ y la expresión de CD20 en las células B CD19+ (izquierda), las células T CD8+ (centro) y las células T CD4+ (derecha) detectadas por FACS. La FIGURA 61A es un gráfico que muestra que TDB CD20 es potente en la eliminación de las células B de la CLL con células T autólogas. Se incubaron 200.000 PBMC con diversas concentraciones de TDB CD20 durante 48 horas en medios RPMI suplementados con FBS al 10 %.

Figura 61B es un gráfico que muestra que TDB CD20 es potente en la inducción de la activación de células T autólogas en presencia de las células B de CLL. Se incubaron

200.000 PBMC con diversas concentraciones de TDB CD20 durante 48 horas en medios RPMI suplementados con FBS al 10 %.

La FIGURA 61C es un conjunto de gráficos que muestran que el recuento de células T es altamente correlativo con la destrucción de células B de CLL *ex vivo*. Se incubaron 200.000 PBMC con TDB CD20 de 1000 ng/ml durante 48 horas, ya sea solos o con células T CD8+ agregadas purificadas de donantes sanos. El porcentaje de células B CD19+CD5+ y células T CD8+ en los PBMC de LLC son de 90/0,55 para la muestra A1645, 76/3,5 para A1957, 87/0,63 para A1978, 69/1,3 para A1980. La destrucción celular, la inducción de granzima B y la activación de células T se midieron con FACS como se describe a continuación.

La FIGURA 62A es un conjunto de gráficos que muestran que la activación de células T (izquierda) después de posologías de TDB CD20 de 0,1 mg/kg o 0,5 mg/kg a los ratones NSG con células de leucemia de CLL injertadas correlacionadas con la disminución notable de células B de CLL injertadas (derecha).

La FIGURA 62B es un conjunto de imágenes de inmunohistoquímica de secciones del bazo de ratones NSG con células de leucemia de CLL injertadas que muestra que pueden detectarse pocas células B después del tratamiento con TDB CD20. Se injertaron células B y células T en ratones NSG como se describe a continuación. Los ratones se trataron una vez por vía intravenosa con TDB HER2 y rituximab en 0,5 mg/kg, TDB CD20 en 0,1 y 0,5 mg/kg y los bazos se recogieron para el análisis con FACS 14 días después del tratamiento.

La FIGURA 63 es un gráfico que muestra el volumen del tumor adaptado con el paso del tiempo de tumores injertados de Bjab de ratones SCID para el Grupo 1 (vehículo: 20 mM de histidina/acetato a pH 5,5, 240 mM de sacarosa, Tween 20 al 0,02 %); Grupo 2 (TDB CD20: 2H7v114/UCHT1.v9; 0,5 mg/kg); Grupo 3 (vehículo: 20 mM de histidina/acetato a pH 5,5, 240 mM de sacarosa, Tween 20 al 0,02 %, PBMC); y Grupo 4 (TDB CD20: CD20 2H7v114/CD3 UCHT1.v9; 0,5 mg/kg, PBMC). Las células efectoras derivaban del PBMC de un donante humano sano. Los ratones se trataron una vez por semana durante dos semanas.

La FIGURA 64A es un gráfico que muestra el nivel relativo de expresión de CD20 en células BJAB, NALM-6, SC-1 y OCI-LY 19. Se injertaron células B y células T en ratones NSG como se describe a continuación. Los ratones se trataron una vez por vía intravenosa con TDB HER2 y rituximab en 0,5 mg/kg, TDB CD20 en 0,1 y 0,5 mg/kg y los bazos se recogieron para el análisis con IHC 14 días después del tratamiento.

La FIGURA 64B es un gráfico que muestra que rituximab y TDB CD20 son comparables en su eficacia para destruir células BJAB *in vitro*, que expresan un alto nivel de CD20 en su superficie celular. Se agotaron las células B en los PBMC aislados de donantes sanos y se utilizaron como células efectoras en el ensayo de destrucción celular in vitro. 20.000 células B y 200.000 células efectoras se incubaron con diversas concentraciones de TDB CD20 durante 24 horas. La expresión TDB CD20 se detectó con FACS.

La FIGURA 64C es un gráfico que muestra que TDB CD20, pero no rituximab, es capaz de

destruir las células NALM-6, SC-1 y OCI-LY 19 que tienen niveles relativamente bajos de CD20 en su superficie celular. Se agotaron las células B en los PBMC aislados de donantes sanos y se utilizaron como células efectoras en el ensayo de destrucción celular in vitro. 20.000 células B y 200.000 células efectoras se incubaron con diversas concentraciones de TDB CD20 durante 24 horas. La expresión TDB CD20 se detectó con FACS.

La FIGURA 64D es un gráfico que muestra los niveles de expresión de la superficie de las células B del antígeno CD20 desbloqueado como una función de la concentración de Rituximab-DANA, según se mide con FACS. Los ratones CD20/CD3 doble transgénicos se trataron con una dosis única de vehículo o Rituximab-DANA (10mg/kg). Los bazos se cultivaron 5 días después del tratamiento.

Las FIGURAS 65A y 65B son gráficos que muestran que TDB CD20 está activo en la eliminación de células B *in vitro* en presencia de altos niveles de rituximab (A) o dexametasona (B). Los 200.000 PBMC aislados de donantes sanos se incubaron primero con rituximab-DANA en la concentración indicada durante 1 hora y luego se añadió TDB CD20 y se incubó durante 24 horas. Para el ensayo con dexametasona, las células se trataron previamente con 1μM de dexametasona durante la noche antes de añadir TDB CD20. La destrucción celular notificada se calculó como se describe a continuación.

La FIGURA 66 es un conjunto de gráficos que muestran que TDB CD20 está activo en células B en agotamiento en la sangre (izquierda) y el bazo (derecha) en ratones pretratados con rituximab-DANA. Para el tratamiento con un agente único, los ratones doble transgénicos huCD20/CD3 se trataron una vez por vía intravenosa con la dosis indicada; para el tratamiento de combinación, los ratones se trataron primero por vía intravenosa con rituximab-DANA y se inyectó TDB CD20 por vía intravenosa 30 minutos más tarde. Se recolectó sangre en D-7, D0-2h (2 horas después del tratamiento con TDB) y D7; se recogieron los bazos en D7. Los recuentos de células B se midieron con FACS como se describe a continuación.

La FIGURA 67A es un conjunto de gráficos que muestran el recuento de células B (izquierda), células T CD4+ (medio) y células T CD8+ (derecha) en muestras de sangre de 3 monos cynomolgus antes y 7 días después del tratamiento con una sola dosis intravenosa de TDB CD20 de 1 mg/kg. Se trataron tres monos cynomolgus una vez por vía intravenosa con TDB CD20 de 1mg/kg. La sangre se recogió en D-7 (7 días antes de la dosis), D0-4hr (4 horas después de la dosis) y D7.

La FIGURA 67B es un conjunto de gráficos que muestran las células B, células T CD4+ y los niveles de células T CD8+ en el bazo (izquierda), los ganglios linfáticos mandibulares (medio) y los ganglios linfáticos mesentéricos (derecha) de 3 monos cynomolgus 7 días después del tratamiento con una sola dosis intravenosa de TDB CD20 de 1 mg/kg. Se trataron tres monos cynomolgus una vez por vía intravenosa con TDB CD20 de 1mg/kg. La sangre se recogió en D-7 (7 días antes de la dosis), D0-4hr (4 horas después de la dosis) y D7.

La FIGURA 67C es un conjunto de gráficos que muestran las células B, células T CD4+ y los niveles de células T CD8+ en el bazo (izquierda), los ganglios linfáticos mandibulares

(medio) y los ganglios linfáticos mesentéricos (derecha) de 3 monos cynomolgus antes del tratamiento con una sola dosis intravenosa de TDB CD20 de 1 mg/kg. Se trataron tres monos cynomolgus una vez por vía intravenosa con TDB CD20 de 1mg/kg. La sangre se recogió en D-7 (7 días antes de la dosis), D0-4hr (4 horas después de la dosis) y D7.

La FIGURA 67D es un conjunto de gráficos que muestran los niveles basales de las células B y las células T CD4+ y CD8+ como un porcentaje de linfocitos totales detectados en el bazo (izquierda) y los ganglios linfáticos mandibulares (derecha) en animales tratados con control de vehículo.

La FIGURA 68A es un conjunto de gráficos que muestran la concentración sérica de TDB CD20 a partir de muestras de sangre y de suero recogidas de cuatro monos cynomolgus que se trataron 4 veces por semana con TDB CD20 de 1mg/kg por vía intravenosa.

La FIGURA 68B es un conjunto de gráficos que muestran la concentración de TDB CD20 a partir de muestras de suero tomadas de animales descritos en las Figuras 65 y 66A. Se graficó el s.d. ± medio.

La FIGURA 69A es un histograma que muestra la expresión de la expresión de PD-L1 en células A20-huCD20 de ratones singénicos A20-huCD20 Balb/C, según lo evaluado por una citometría de flujo.

La FIGURA 69B es un gráfico que muestra el volumen del tumor en relación con el tiempo para el Grupo 1 (vehículo); Grupo 2 (TDB CD20 a 0,5 mg/kg); Grupo 3 (anticuerpo anti-PD-L1 en 10 mg/kg); y el Grupo 4 (TDB CD20 en 0,5 mg/kg + anticuerpo anti-PD-L1).

La FIGURA 70 es un gráfico que muestra las curvas de unión para cada una de las tres TBD FcRH5 evaluadas para la unión *in vitro* a células T que CD8+ con expresión CD3.

La FIGURA 71A es un gráfico que muestra el porcentaje de la destrucción de células diana MOLP-2 como una función de la concentración de TDB FcRH5 con células T CD8+ purificadas a partir de PBMC humanos desde el Donante N. ° 1.

La FIGURA 71B es un gráfico que muestra el porcentaje de la destrucción de células diana MOLP-2 como una función de la concentración de TDB FcRH5 con células T CD8+ purificadas a partir de PBMC humanos desde el Donante N. ° 2.

La FIGURA 72A es un gráfico que muestra el porcentaje de células CD8+CD69+T como función de concentración TDB de FcRH5, como se evalúa con un análisis FACS. Las células eran MOLP-2, y las células CD8+T se purificaron del Donante N. ° 1.

La FIGURA 72B es un gráfico que muestra el porcentaje de células CD8+CD107a+T como función de concentración TDB de FcRH5, como se evalúa con un análisis FACS. Las células eran MOLP-2, y las células CD8+T se purificaron del Donante N. ° 1.

La FIGURA 72C es un gráfico que muestra el porcentaje de células CD8+CD69+T como función de concentración TDB de FcRH5, como se evalúa con un análisis FACS. Las células eran MOLP-2, y las células CD8+T se purificaron del Donante N. ° 2.

La FIGURA 72D es un gráfico que muestra el porcentaje de células CD8+CD107a+T como una función de concentración TDB de FcRH5, como se evalúa con una análisis FACS. Las

células diana eran MOLP-2, y las células CD8+T se purificaron del Donante n.° 2.

La FIGURA 73 es un grupo de gráficos que muestran las curvas de unión para cada uno de los tres TDB de HER2 que se analizaron para la unión *in vitro* con células SKBR3 que expresan Her2 (superior) y las células T que expresan CD8+ CD3 (inferior).

La FIGURA 74A es un gráfico que indica las curvas de unión para trastuzumab (bivalente), trastuzumab (Fab) y TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5) (biespecífico) para unión *in vitro* con células SKBR3 que expresan HER2.

La FIGURA 74B es un gráfico que indica el porcentaje de células SKBR3 viables como una función para la concentración de trastuzumab (bivalente), trastuzumab (Fab) y TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5) (biespecífico), como se evalúa con el Ensayo de viabilidad celular luminiscente CELLTITERGLO®.

La FIGURA 74C es un gráfico que indica el porcentaje de muertes de células diana SKBR mediado por citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC) en presencia de trastuzumab (T-mab), trastuzumab producido en *E. coli* (T-mab *E. coli*), y TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5), como se evalúa con la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) de las células lisadas.

La FIGURA 75 es un gráfico que indica el porcentaje de muertes de células diana SKBR3 como una función de la concentración de TDB de HER2 (hu4D5-TDB, hu4D5.91A-TDB y hu4D5.Y100A-TDB).

La FIGURA 76A es una serie de paneles. El panel superior es un modelo de la estructura de cristal de la unión de dominio extracelular de HER2 (ECD, por su sigla en inglés) por hu4D5 Fab (Trastuzumab), 2C4 Fab (Pertuzumab) y 7C2. El panel inferior es una estructura de lazo de la unión de $CD3_{\varepsilon}$ por 2C11, 38E4v1 y 40G5c.

La FIGURA 76B es una tabla que indica las afinidades de unión y se representan con la constante de disociación K_D (nM), de TDB de HER2 para tres grupos HER2 diferentes: hu4D5, 2C4 y 7C2. El panel inferior derecho es una tabla que indica las afinidades de unión y se representan con la constante de disociación K_D (nM), de TDB de HER2 para tres grupos $CD3_{\varepsilon}$ diferentes: 38E4v1, 40G5c, y 2C11.

La FIGURA 76C es un gráfico que indica el porcentaje de muertes de células diana MCF7 que expresan HER2 como una función de la concentración TDB de HER2 (hu4D5-TDB, 2C4-TDB y 7C2-TDB). Se midió la citotoxicidad con la liberación del lactato deshidrogenasa (LDH).

La FIGURA 77 es un gráfico que indica que los grupos HER2 hu4D5 y 2C4 son fuertes mediadores de la muerte celular como expone el porcentaje máximo de muerte de células diana SKBR3 logrado con el tratamiento con las siguientes variedades TDB de HER2: hu4D5-38E4v1, hu4D5-40G5c, 2C4-38E4v1, 2C4-40G5c, 7C2-38E4v1, y 7C2-40G5c.

La FIGURA 78 es una serie de gráficos que indican la potencia de las variantes TDB de HER2 para matar líneas celulares SKBR3 que expresan HER2 (izquierda) y MCF7 que expresan HER2 (derecha) de forma dosis dependiente, con valores CE50 de muerte de células diana (pM). La FIGURA 79 es una serie de gráficos que indican el porcentaje de

muerte de células diana SKBR3 que expresan HER2 para varios TDB con grupos HER2 (hu4D5, 2C4 y 7C2) emparejados con grupos CD3 con afinidad alta (38E4v1) o baja (40G5c) como una función de la concentración TDB (ng/ml).

La FIGURA 80 es una serie de paneles. El panel de la izquierda indica la potencia de las variantes TDB de HER2 (hu4D5-38E4v1, 2C4-38E4v1, 7C2-38E4v1; hu4D5-40G5c, 2C4-40G5c, 7C2-40G5c) para matar líneas celulares SKBR3 que expresan HER2 y MCF7 que expresan HER2 de forma dosis dependiente, con valores CE50 de muerte de células diana (pM). El panel de la derecha es una tabla con la proporción de CE50 de las variantes TDB de HER2 dadas en células diana MCF7 en comparación con SKBR3 para tres experimentos.

La FIGURA 81 es una serie de paneles. El panel superior muestra una tabla que enumera las variantes del grupo HER2 hu4D5 (hu4D5v7, hu4D5v5, hu4D5v10, hu4D5v31, hu4D5.Y100A) para TDB de HER2 (grupo CD3 40G5c) y el correspondiente CE50 (ng/ml) para la muerte de células diana SKBR3, afinidad de unión HER2 (K_D, nM) además de la proporción de la afinidad de unión K_D de HER2 y el CE50 de muerte de células diana SKBR3 para las variantes hu4D5 relativas a hu4D5. El panel inferior es un gráfico que indica la correlación entre la proporción CE50 SKBR3 para las variantes TDB de hu4D5 HER2 (hu4D5, hu4D5v7, hu4D5v5, hu4D5v10 y hu4D5v31) y la proporción K_D relativa para las variantes TDB de HER2 hu4D5.

La FIGURA 82 es una serie de gráficos que indican el porcentaje de muerte de células diana SKBR3 y MCF7 como una función de la concentración de las siguientes variantes TDB de HER2: hu4D5-40G5c (superior izquierda), hu4D5v7-40G5c (superior centro), hu4D5v5-40G5c (superior derecha), hu4D5v10-40G5c (inferior izquierda), hu4D5v31-40G5c (inferior centro), hu4D5.Y100A-40G5c (inferior derecha).

La FIGURA 83 es una serie de gráficos. El gráfico a la izquierda indica el porcentaje de muerte de células diana como una función de la concentración (µg/ml) de los anticuerpos monoespecíficos bivalentes bloqueantes de HER2 específicos para el grupo designado HER2 del TDB de HER2. (Anticuerpos bloqueantes de HER2: anticuerpos monoespecíficos bivalentes para hu4D5, 2C4 y 7C2. TDB de HER2: hu4D5-40G5c, 2C4-40G5c y 7C2-38E4v1 con concentraciones fijas: 10 ng/ml). El gráfico de la derecha muestra el porcentaje de células viables como una función de la concentración de anticuerpo HER2 (hu4D5) trastuzumab en presencia y ausencia de TDB de HER2 hu4D5-40G5c.

La FIGURA 84 es una serie de paneles. El panel superior es una tabla que muestra la reactividad de las variantes del grupo HER2 con HER2 como se midió con varios ensayos de unión junto con la reactividad de los clones HER2 con el anticuerpo hu4D5 trastuzumab. El panel inferior es un gráfico que muestra el porcentaje de muerte de células diana como una función de la concentración (pM) de Fab biespecífico HER2 para ciertos clones (hu4D5, 3H4 y 2H11). Se incluyen los valores CE50 para cada clon en pM.

La FIGURA 85 es una tabla que indica la información de afinidad y reactividad para las variantes del grupo CD3 TDB de HER2 (38E4v1, 38E4, SP34, 40G5c y 2C11).

La FIGURA 86 es un gráfico que indica la muerte de células diana CT26 que expresan HER2 como una función de concentración (ng/ml) de variantes TDB de HER2 (hu4D5-2C11, hu4D5-SP34, 7C2-2C11 y 2C4-2C11). Células efectoras: Células T derivadas de TG CD3

La FIGURA 87A es un gráfico que indica el volumen del tumor (mm^3) medido con el paso del tiempo (0 a 5 días) en animales administrados con vehículo o TDB de HER2 (0,5 mg/kg).

La FIGURA 87B es una serie de gráficos. El gráfico superior izquierdo muestra el porcentaje de las células CD45+ periféricas por 5 células detectadas el día 6 después del tratamiento con vehículo o TDB de HER2 (0,5 mg/kg). El gráfico superior derecho muestra el porcentaje de las células CD45+ periféricas que son células CD8+ detectadas el día 6 después del tratamiento con vehículo o TDB de HER2 (0,5 mg/kg). El gráfico inferior izquierdo muestra el porcentaje de las células CD45+ periféricas que son células CD4+ detectadas el día 6 después del tratamiento con vehículo o TDB de HER2 (0,5 mg/kg). El gráfico inferior derecho muestra el porcentaje de las células CD8+ periféricas que son células IFN+ detectadas el día 6 después del tratamiento con vehículo o TDB de HER2 (0,5 mg/kg).

La FIGURA 88A es una serie de gráficos. El gráfico superior muestra un gráfico de cascada del cambio porcentual en el volumen del tumor en animales administrados con variante del vehículo o TDB de HER2 (hu4D5-SP34 o hu4D5-2C11; 0,5 mg/kg; IV, semanal, 5 semanas). El gráfico inferior muestra un gráfico de cascada del cambio porcentual en el volumen del tumor en animales administrados con variante de TDB de HER2 (2C4-38E4; 0,5 mg/kg; IV, semanal, 5 semanas).

La FIGURA 88B es una serie de gráficos. El gráfico superior muestra el volumen del tumor como un porcentaje del volumen basal en función del tiempo (días) para animales administrados con vehículo o TDB de HER2 (hu4D5-SP34). El gráfico inferior muestra el volumen del tumor como un porcentaje del volumen basal en función del tiempo (días) para animales administrados con vehículo o TDB de HER2 (hu4D5-2C11). (TDB de HER2: 0,5 mg/kg; IV, semanal, 5 semanas).

La FIGURA 89 es un gráfico que indica el porcentaje de células CD8+CD107a+ T como una función de la concentración TDB de HER2 (hu4D5-TDB, hu4D5.91A-TDB y hu4D5.Y100A-TDB) hu4D5, como se evalúa en el análisis FACS. Las células diana eran células SKBR3; las células efectoras eran células CD8+ T; proporción de células efectoras: células diana = 3:1.

La FIGURA 90A es un gráfico que indica el porcentaje de muertes de células diana SKBR3 como una función de la concentración TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5 y SP34/hu4D5).

La FIGURA 90B es un gráfico que indica el porcentaje de muertes de células diana SKBR3 como una función de la concentración TDB de HER2 (SP34/hu4D5, 38E4c/hu4D5 y 40G5c/hu4D5).

La FIGURA 90C es un gráfico que indica el porcentaje de muertes de células diana SKBR3 como una función de la concentración TDB de HER2 (SP34/hu4D5, 38E4c/hu4D5 y

40G5c/hu4D5).

La FIGURA 91A es un gráfico que indica la curva de unión para cada una de las tres TDB de HER2 (SP34/hu4D5, 38E4c/hu4D5 y 40G5c/hu4D5) que se analizaron para unión *in vitro* con células T que expresan CD8+ CD3, como se evaluó con el análisis FACS.

La FIGURA 91B es un gráfico que indica el porcentaje de células CD8+CD69+ T como una función de la concentración TDB de HER2 (SP34/hu4D5, 38E4c/hu4D5 y 40G5c/hu4D5).

La FIGURA 92A es un gráfico que indica la curva de unión para las dos TDB de HER2 (38E4c/hu4D5 y 38E4/hu4D5) que se analizaron para unión *in vitro* con células T que expresan CD8+ CD3, como se evaluó con el análisis FACS.

La FIGURA 92B es un gráfico que indica la curva de unión para las dos TDB de HER2 (38E4c/hu4D5 y 38E4/hu4D5) que se analizaron para unión *in vitro* con células SKBR3 que expresan HER2, como se evaluó con el análisis FACS.

La FIGURA 92C es un gráfico que indica el porcentaje de muertes de células diana SKBR3 como una función de la concentración TDB de HER2 (38E4c/hu4D5 y 38E4/hu4D5), como se evaluó con el análisis FACS. Las células efectoras eran células CD8+ T humanas; proporción de células efectoras: células diana = 3:1.

La FIGURA 92D es un gráfico que indica el porcentaje de células CD8+CD69+ T como una función de la concentración TDB de HER2 (38E4c/hu4D5 y 38E4/hu4D5).

La FIGURA 93A es un gráfico que muestra el porcentaje de células CD8+CD69+Granzima B+ T como una función de concentración TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5), como se evalúa con una análisis FACS. Las células diana eran células SKBR3; las células efectoras eran células CD8+ T; proporción de células efectoras: células diana = 3:1.

La FIGURA 93B es una serie de gráficos que indican la exocitosis de los gránulos de células diana mediada por células T TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5) que se detecta con ELISA para perforina y granzimas A y B, y el porcentaje de muerte de células diana como se evalúa por la liberación de LDH. Las células diana eran células SKBR3; las células efectoras eran células PBMC; proporción de células efectoras: células diana = 30:1.

La FIGURA 93C es una serie de gráficos que indican la apoptosis de las células diana medida por células T TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5) como se mide con las actividades caspasa 3 y 7 en el Ensayo CASPASE-GLO® 3/7, apoptosis en un Ensayo de detección de muerte celular con ELISA^{plus} y liberación de LDH. Las células diana eran células SKBR3; las células efectoras eran células PBMC; proporción células efectoras: células diana = 10:1.

La FIGURA 93D es una imagen de Western blot (superior) que indica la expresión de HER2 en células 3T3 transfectadas y un gráfico (inferior) que indica el porcentaje de muerte de células diana por células T activadas como una función de concentración TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5), como se mide por la liberación de LDH. Las células diana eran Vector 3T3 y HER2 3T3; las células efectoras eran células PBMC; proporción de células efectoras: células diana = 10:1.

La FIGURA 93E es una gráfico que indica el porcentaje de muerte de células diana BT474 como una función de concentración TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5) en presencia de

trastuzumab Fab (T-Fab) o dominio extracelular HER2 soluble (ECD), como se evalúa por la liberación de LDH. Las células efectoras eran células CD8+ T; proporción de células efectoras: células diana = 5:1.

La FIGURA 93F es un gráfico que indica el porcentaje de muerte de células diana SKBR3 como una función de concentración TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5) después del agotamiento de las células CD3+ de la población celular efectora PBMC. Proporción de células efectoras: células diana = 20:1.

La FIGURA 94A es una serie de gráficos que indican el porcentaje de células CD8+CD69+ T (izquierda) y células CD8+CD107a+ T (centro) como una función de concentración TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5), como se evalúa con un análisis FACS, y el porcentaje de muerte de células diana SKBR3 como una función de concentración TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5) (derecha). Las células diana eran células SKBR3; las células efectoras eran células CD8+ T; proporción de células efectoras: células diana = 3:1.

La FIGURA 94B es una serie de gráficos que indican el porcentaje de muerte de células diana BT474 como una función de concentración TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5) (izquierda) y el porcentaje de células CD8+CD69+granzimasB+ T como una función de concentración TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5) (derecha), como se evalúa con un análisis FACS. Las células diana eran células BT474; las células efectoras eran células CD8+ T; proporción de células efectoras: células diana como se indica.

La FIGURA 95A es una serie de histogramas que muestra la expresión de CFSE en células CD8+ T en presencia de células diana SKBR3 o TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5).

La FIGURA 95B es un gráfico que muestra el cambio en veces del número de células CD8+ como una función sobre el tiempo posterior a la incubación con células diana SKBR3 y TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5), como se evalúa en un análisis FACS.

La FIGURA 95C es una serie de gráficos que muestra el cambio en veces del número de células CD8+ como una función sobre el tiempo posterior a la incubación con células diana SKBR3, TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5), y 20 ng/ml de IL-2, como se evalúa en un análisis FACS.

La FIGURA 96A es una imagen de Western blot que indica el nivel de expresión de HER2 en un panel de líneas celulares tumorales humanas.

La FIGURA 96B es un gráfico que muestra el porcentaje de muerte de células diana como una función de concentración TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5), como se evalúa por la liberación de LDH. Las células diana eran células BJAB, MDA435, MDA231, MCF7, MDA453, SKBR3 y BT474; las células efectoras eran células PBMC; proporción de células efectoras: células diana = 25:1.

La FIGURA 96C es un gráfico que muestra el porcentaje de muerte de células diana como una función de concentración TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5), como se evalúa con un análisis FACS. Las células diana eran células MCF7 y SKBR3; las células efectoras eran células PBMC; proporción de células efectoras: células diana = 20:1.

La FIGURA 96D es un gráfico que muestra el porcentaje de muerte de células diana como una función de concentración TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5), como se evalúa con un

análisis FACS. Las células diana eran células BJAB y SKBR3; las células efectoras eran células PBMC; proporción de células efectoras: células diana = 20:1.

La FIGURA 96E es un tabla que presenta el número de copia de HER2 para un panel de células diana y para cada una, el CE50 TDB de HER2 y porcentaje de ocupación de HER2 en esa concentración. Las células diana son MDA435, MDA231, MCF7, MDA453, BT474, y SKBR3.

La FIGURA 97A es un gráfico que muestra el porcentaje de muerte de células diana como una función de concentración TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5), como se evalúa por la liberación de LDH. Las células diana eran células SKBR3, HCC1569, KPL4, HCC202, JIMT1 y CALU3; las células efectoras eran células PBMC; proporción de células efectoras: células diana = 10:1.

La FIGURA 97B es un gráfico que indica el porcentaje de células diana viables como una función para la concentración de trastuzumab emtansina (T-DM1), como se evalúa con el Ensayo de viabilidad celular luminiscente CELLTITERGLO®. Las células diana eran BT474-M1 parenterales y BT474-M1 T-DM1 resistentes; las células efectoras eran células CD8+ T; proporción de células efectoras: células diana = 3:1.

La FIGURA 97C es un gráfico que muestra el porcentaje de células diana viables como concentración TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5), como se evalúa con una análisis FACS. Las células diana eran BT474-M1 parenterales y BT474-M1 T-DM1 resistentes; las células efectoras eran células CD8+ T; proporción de células efectoras: células diana = 3:1.

La FIGURA 98 es un gráfico y una tabla que muestran la farmacocinética (PK) TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5) en ratas Sprague-Dawley, como se evalúa con ELISA.

La FIGURA 99A es un gráfico que indica el volumen relativo del tumor con el paso del tiempo para el Grupo 1 (Vehículo a 0,5 mg/kg); Grupo 2 (PBMC(1) + vehículo a 0,5 mg/kg); Grupo 3 (PBMC(1) + TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5) a 0;5 mg/kg); Grupo 4 (PBMC(2) + vehículo a 0,5 mg/kg); y Grupo 5 (PBMC(2) + TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5) a 0,5 mg/kg).

La FIGURA 99B es un gráfico que indica el porcentaje de cambio en el volumen del tumor con el paso del tiempo para el Grupo 1 (Vehículo a 0,5 mg/kg); y Grupo 2 (TDB de HER2 (hu4D5/2C11) a 0,5 mg/kg).

La FIGURA 99C es un gráfico que indica el porcentaje de cambio relativo en el volumen del tumor con el paso del tiempo para el Grupo 1 (Vehículo a 0,5 mg/kg); y Grupo 2 (TDB de HER2 (hu4D5/2C11) a 0,5 mg/kg).

La FIGURA 99D es un gráfico que indica el volumen relativo del tumor con el paso del tiempo para el Grupo 1 (Vehículo a 0,5 mg/kg); y Grupo 2 (TDB de HER2 (hu4D5/2C11) a 0,5 mg/kg). Los participantes incluían tumores que eran >1000 mm^3 al comienzo del tratamiento.

La FIGURA 99E es un gráfico que indica el porcentaje de cambio en el volumen del tumor con el paso del tiempo para el Grupo 1 (TDB de HER2 controlado por el grupo CD3 (hu4D5/SP34) a 0,5 mg/kg); y el Grupo 2 (TDB de control (2C11) a 0,5 mg/kg).

La FIGURA 99F es un gráfico que indica el volumen relativo del tumor con el paso del tiempo para el Grupo 1 (Vehículo a 0,5 mg/kg); y Grupo 2 (TDB de HER2 (hu4D5/SP34) a 0,5 mg/kg).

La FIGURA 99G es un gráfico que indica el volumen relativo del tumor con el paso del tiempo para el Grupo 1 (Vehículo a 0,5 mg/kg); Grupo 2 (TDB de HER2 (hu4D5/2C11) a 0,5 mg/kg); Grupo 3 (TDB de control (2C11) a 0,5 mg/kg); y Grupo 4 (T-DM1 a 15 mg/kg).

La FIGURA 100A es un gráfico que indica el volumen relativo del tumor con el paso del tiempo para el Grupo 1 (Sin tratamiento); Grupo 2 (TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5) a 0,5 mg/kg).

La FIGURA 100B es un gráfico que indica el volumen relativo del tumor con el paso del tiempo para el Grupo 1 (Vehículo a 0,5 mg/kg); Grupo 2 (PBMC(3) + Vehículo a 0,5 mg/kg); y Grupo 3 (PBMC(3) + TDB de control (2C11) a 0,5 mg/kg).

La FIGURA 101A es un gráfico que indica la afinidad de unión para el anticuerpo CD3-UCHT1 evaluado para unión *in vitro* al CD3 humano en células T humanas, células T TG CD3 y células T BALB/c, como se evalúa en el análisis FACS.

La FIGURA 101B es un gráfico que indica la afinidad de unión para el anticuerpo CD3-2C11 evaluado para unión *in vitro* al CD3 de ratones en células T TG CD3 y células T BALB/c, como se evalúa en el análisis FACS.

La FIGURA 102A es un gráfico que muestra el porcentaje de muerte de células diana CT26-HER2 como una función de concentración TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5), como se evalúa con una análisis FACS. Las células efectoras eran células T aisladas de sangre humana periférica, células esplénicas transgénicas huCD3 y células T esplénicas BALB/c.

La FIGURA 102B es un gráfico que muestra el porcentaje de muerte de células diana CT26-HER2 como una función de concentración TDB de HER2 (hu4D5/2C11), como se evalúa con una análisis FACS. Las células efectoras eran células T aisladas de sangre humana periférica, células esplénicas transgénicas huCD3 y células T esplénicas BALB/c.

La FIGURA 103 es un gráfico que indica el volumen relativo del tumor con el paso del tiempo para el Grupo 1 (Vehículo a 0,5 mg/kg); y Grupo 2 (TDB de HER2 (hu4D5/SP34) a 0,5 mg/kg).

La FIGURA 104 es un gráfico que muestra las curvas de unión para cada una de las tres TBD de LYPD1 evaluadas para unión *in vitro* a células T que expresan CD8+ CD3.

La FIGURA 105 es un gráfico que indica el porcentaje de muerte de células diana OVCAR3.Luc como una función de la concentración TDB de LYPD1.

La FIGURA 106 es un gráfico que muestra el porcentaje de células CD8+CD69+ (izquierda) y CD8+CD25+ (derecha) T como una función de concentración TDB de LYPD1, como se evalúa con un análisis FACS. Las células diana eran células OVCAR3.Luc; proporción de células efectoras: células diana = 3:1.

La FIGURA 107 muestra las secuencias de aminoácidos del dominio variable (superior) de la cadena liviana y el dominio variable (inferior) de la cadena pesada del anticuerpo anti RET 41205.v6.

La FIGURA 108A es un gráfico que muestra el volumen del tumor (mm^3) como una función del tiempo (días) para el Grupo 1 (vehículo, qwx3, IV; n=9); el Grupo 2 (CD20 TDB (2H7-mu2C11), 0,5 mg/kg, qwx3, IV; n=9); el Grupo 3 (anti-PD1 (mu8F11 DANA), 10 mg/kg, tiwx3, IP; n=9) y el Grupo 4 (anti-PD1 (mu8F11 DANA), 10 mg/kg, tiwx3, IP; CD20 TDB (2H7-mu2C11), 0,5 mg/kg, qwx3, IV; n=9).

La FIGURA 108B es un gráfico que muestra el volumen del tumor (mm^3) como una función del tiempo (días) para el Grupo 1 (vehículo, qwx3, IV; n=9); el Grupo 2 (CD20 TDB (2H7-mu2C11), 0,5 mg/kg, qwx3, IV; n=9); el Grupo 3 (anti-PD1 (mu8F11 DANA), 10 mg/kg, tiwx3, IP; n=9) y el Grupo 4 (anti-PD1 (mu8F11 DANA), 10 mg/kg, tiwx3, IP+ CD20 TDB (2H7-mu2C11), 0,5 mg/kg, qwx3, IV; n=9). La línea sólida en negrita representa el volumen ajustado del tumor para el grupo especificado.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS VERSIONES DE LA INVENCIÓN

I. DEFINICIONES

El término “alrededor de” a partir del presente se refiere al rango de error normal para el valor respectivo de fácil conocimiento para las personas entrenadas en el campo técnico. La referencia a “alrededor de” para un valor o parámetro a partir del presente incluye (y describe) las versiones que se relacionan directamente a ese valor o parámetro en sí.

Para los propósitos del presente, un “marco humano de selector” es un marco que comprende la secuencia de aminoácidos de un marco de dominio variable (VL) de una cadena ligera o un marco de dominio variable (VH) de una cadena pesada que se deriva del marco de inmunoglobulina humana o un marco de consenso humano, como se define a continuación. Un marco humano de selector “que se deriva” de un marco de inmunoglobuna humana o un marco de consenso humano incluye la misma secuencia de aminoácidos que estos, o puede contener cambios en la secuencia de aminoácidos. En algunas versiones, el número de cambios en los aminoácidos es de 10 o menos, 9 o menos, 8 o menos, 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos, o 2 o menos. En algunas versiones, el marco humano de selector VL tiene una secuencia idéntica al marco de inmunoglubina humana VL o al marco de consenso humano VL.

La afinidad se refiere a la concentración de la suma total de las interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de la molécula (p. ej., un anticuerpo) y su par de unión (p. ej., un antígeno). A menos que se indique lo contrario, a partir del presente, “afinidad de unión” hace referencia a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre los miembros de un par de unión (p. ej. anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su par Y puede representarse generalmente con la constante de disociación (Kd). La afinidad puede medirse mediante métodos comunes conocidos en la materia, incluidos aquellos que se describen en el presente. Las representaciones ilustrativas y ejemplares específicas para medir la afinidad de la unión se describen a continuación.

Un anticuerpo “madurado por afinidad” hace referencia a un anticuerpo con una o más alteraciones en una o más regiones hipervariables (HVR), en comparación con un anticuerpo principal que no posee dichas alteraciones, alteraciones que generan una mejora en la afinidad del anticuerpo para el antígeno.

Los términos “anticuerpo contra CD3” y “un anticuerpo que se une a CD3” hacen referencia a un anticuerpo que es capaz de unirse a CD3 con la afinidad suficiente para que el anticuerpo resulte útil como agente de diagnóstico o terapéutico a la hora de dirigirse a CD3. En una representación, el grado de unión de un anticuerpo contra CD3 a una proteína no relacionada distinta de CD3 es menos de aproximadamente el 10% de la unión del anticuerpo a CD3 según la medición, p. ej.: mediante un ensayo de radioinmunología (RIA). En determinadas representaciones, un anticuerpo que se une a CD3 tiene una constante de disociación (Kd) de ≤1μM, ≤100 nM, ≤10 nM, ≤1 nM, ≤0.1 nM, ≤0.01 nM, o ≤0.001 nM (p. ej.: 10^{-8} M o menos, p. ej.: de 10^{-8} M a 10^{-13} M, p. ej.: de 10^{-9} M a 10^{-13} M). En determinadas representaciones, un anticuerpo contra CD3 se une a un epítopo de CD3 que se conserva entre CD3 de distintas especies.

El término “anticuerpo” se utiliza en el presente en el sentido más amplio y abarca varias estructuras de anticuerpos, incluidos entre otros los anticuerpos monoclonales, los anticuerpos policlonales, los anticuerpos multiespecíficos (p. ej.: anticuerpos biespecíficos) y los fragmentos de anticuerpos siempre y cuando exhiban la actividad deseada de unión al antígeno.

Un “fragmento de anticuerpo” hace referencia a una molécula distinta a un anticuerpo intacto que abarca una porción de un anticuerpo intacto que se une al antígeno al cual se une el anticuerpo intacto. Algunos ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen entre otros a los siguientes: Fv, Fab, Fab’, Fab’-SH, $F(ab')_2$; diacuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpos de cadena única (p. ej.: scFv) y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

Por “dominio de unión” se implica una parte de un compuesto o una molécula que se une de manera específica a un epítopo, antígeno, ligando o receptor objetivo. Los dominios de unión incluyen entre otros a anticuerpos (p. ej.: monoclonales, policlonales, recombinantes, humanizados y quiméricos), fragmentos de anticuerpos o porciones de ellos (p. ej.: fragmentos de Fab, Fab’2, anticuerpos scFv, SMIP, anticuerpos de dominio, diacuerpos, minicuerpos, scFv-Fc, aficuerpos, nanocuerpos y dominios de anticuerpos VH o VL), receptores, ligandos, aptámeros y otras moléculas que tengan un colaborador de unión identificado.

Un “agente quimioterapéutico” es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen a los agentes alquilantes como la tiotepa y la ciclosfosfamida (CYTOXAN®); los sulfonatos de alquilo como el busulfán, el improsulfán y el piposulfán; las aziridinas como la benzodopa, la carboquona, la meturedopa y la uredopa; las etileniminas y metilamelaminas incluida la altretamina, la trietilenomelamina, la trietilenofosforamida, la trietilenotiofosforamida y la trimetilomelamina; las acetogeninas (especialmente la bullatacina y la bullatacinona); el

delta-9-tetrahidrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); la beta-lapachona; el lapachol; las colchicinas; el ácido betulínico; una camptotecina (incluido el análogo sintético topotecán (HYCAMTIN®), la CPT-11 (irinotecán, CAMPTOSAR®), la acetilcamptotecina, escopolectina y 9-aminocamptotecina); la brioestatina; la caliestatina; CC-1065 (incluidos sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); la podofilotoxina; el ácido podofilínico; la teniposida; las criptoficinas (especialmente la criptoficina 1 y la criptoficina 8); la dolastatina; la duocarmicina (incluidos los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); la eleuterobina; la pancratiestatina; una sarcodictina; la espongiestatina; las mostazas de nitrógeno como el clorambucil, la clornafazina, la clorofosfamida, la estramustina, la ifosfamida, la mecloretamina, el clorhidrato de óxido de mecloretamina, el melfalán, la novembicina, la fenesterina, la prednimustina, la trofosfamida, la mostaza de uracilo; las nitroso úreas como la carmustina, la clorozotocina, la fotemustina, la lomustina, la nimustina y la ranimnustina; los antibióticos como los antibióticos de enedina (p. ej.: la calicheamicina, especialmente la calicheamicina gamma 1I y la calicheamicina omega Il (consulte, p. ej.: Nicolaou y otros, *Angew. Chem Intl. Ed. Engl.*, 33: 183-186 (1994)); el CDP323, un inhibidor oral de la integrina alfa-4, la dinemicina, incluida la dinemicina A; una espiramicina, como también el cromóforo de neocarzinoestatina y los cromóforos de antibióticos de la cromoproteína enediína relacionados), las aclacinomisinas, la actinomicina, la autramicina, la azaserina, las bleomicinas, la cactinomicina, la carabacina, la caminomicina, la carzinofilina, las cromomicinas, la dactinomicina, la daunorubicina, la detorubicina, la 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, la doxorubicina (incluidas ADRIAMYCIN®, morfolino-doxorubicina, cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina, inyección de liposoma de clorhidrato de doxorubicina (DOXIL®), doxorubicina liposomal TLC D-99 (MYOCET®), doxorubicina liposomal peglilada (CAELYX®) y deoxidoxorubicina), la epirubicina, la esorubicina, la idarubicina, la marcelomicina, las mitomicinas como la mitomicina C, el ácido micofenólico, la nogalamicina, las olivomicinas, la peplomicina, la porfiromicina, la puromicina, la quelamicina, la rodorubicina, la estreptonigrina, la estreptozocina, la turbecidina, el ubenimex, la zinoestatina, la zorubicina; los antimetabolitos como el metotrexato, la gemcitabina (GEMZAR®), el tegafur (UFTORAL®), la capecitabina (XELODA®), una epotilona y el 5-fluorouracilo (5-FU); la combrestatina; los análogos de ácido fólico como la denopterina, el metotrexato, la pteropterina, el trimetrexato; los análogos de purina como la fludarabina, la 6-mercaptopurina, la tiamiprina, la tioguanina; los análogos de pirimidina como la ancitabina, la azacitidina, la 6-azauridina, el carmofuro, la citarabina, la dideoxiuridina, la doxifluridina, la enocitabina, la fluxoridina; los andrógenos como la calusterona, el propionato de dromostanolona, el epitiostanol, el mepitiostano, la testolactona; los antiadrenales como la aminoglutetimida, el mitotano, el trilostano; el reabastecedor de ácido fólico como el ácido frolínico, la aceglatona; el glicósido de aldofosfamida; el ácido aminolevulínico; el eniluracilo; la amsacrina; el bestrabucilo, el bisantreno; el edatraxato; la defofamina; la demecolcina; la diaziquona; el elformitina; el acetato de eliptinio; una epotilona; el

etoglúcido; el nitrato de galio; la hidroxiúrea; el lentinano; la lonidainina; los maitansinoides como la maitansina y las ansamitocinas; la mitoguazona; la mitoxantrona; el mopidanmol; la nitraerina; la pentoestatina; el fenamet, la pirarubicina; la losoxantrona; la 2-etilhidrazida; la procarbazina; el complejo de polisacáridos PSK® (JHS Natural Products, Eugene, Oreg.); el razoxano; la rizoxina; el sizofurano; el espirogermanio; el ácido tenuazónico; la triaziquona; la 2,2",2"-triclorotrietilamina; los tricotecenos (especialmente la toxina T-2, la verracurina A, la roridina A y la anguidina); el uretano; la vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®); la dacarbazina; la manomustina; el mitobronitol; el mitolactol; el pipobromán; la gacitosina; la arabinosida ("Ara-C"); la tiotepa; el taxoide, p. ej: el paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), la fórmula de nanopartículas de paclitaxel diseñadas a partir de la albúmina (ABRAXANE™) y el docetaxel (TAXOTERE®, Rhome-Poulene Rorer, Antony, Francia); el cloranbucilo; la 6-tioguanina; la mercaptopurina; el metotrexato; los agentes del platino como el cisplatino, el oxaliplatino (p. ej.: ELOXATIN®) y el carboplatino; las vincas, que evitan la polimerización de la tubulina de los microtúbulos en formación, incluida la vinblastina (VELBAN®), la vincristina (ONCOVIN®), la vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®) y la vinorelbina (NAVELBINE®); el etopósido (VP-16); la ifosfamida; la mitoxantrona; la leucovorina; la novantrona; el edatrexato; la daunomicina; la aminopterina; el ibandronato; el inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; la difluorometilornitina (DMFO); los retinoides como el ácido retinóico, incluido el bexaroteno (TARGRETIN®); los bisfosfonatos como el clodronato (por ejemplo, BONEFOS® u OSTAC®), el etidronato (DIDROCAL®), el NE-58095, el ácido zoledrónico/zoledronato (ZOMETA®), el alendronato (FOSAMAX®), el pamidronato (AREDIA®), el tiludronato (SKELID®) o el risedronato (ACTONEL®); la troxacitabina (un análogo de la citosina nucleósida 1,3-dioxolano); los oligonucleótidos antisentido, especialmente aquellos que inhiben la expresión de los genes que se encuentran en las rutas de señalización, implicados en la proliferación de células aberrantes, como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R) (p. ej.: el erlotinib (Tarceva™)); y el VEGF-A que reduce la proliferación celular; las vacunas como la vacuna THERATOPE® y las vacunas de terapias genéticas, por ejemplo, la vacuna ALLOVECTIN®, la vacuna LEUVECTIN® y la vacuna VAXID®; el inhibidor de la topoisomerasa 1 (p. ej.: LURTOTECAN®); el rmRH (p. ej.: ABARELIX®); el BAY439006 (sorafenib; Bayer); el SU-11248 (sunitinib, SUTENT®, Pfizer); la perifosina, el inhibidor de COX-2 (p. ej.: celecoxib o etoricoxib), el inhibidor del proteosoma (p. ej.: PS341); el bortezomib (VELCADE®); el CCI-779; el tipifarnib (R11577); el orafenib, el ABT510; el inhibidor de Bcl-2, como el sodio oblimersen (GENASENSE®); la pixantrona; los inhibidores de EGFR; los inhibidores de la tirosina quinasa; los inhibidores de la serina-treonina quinasa como la rapamicina (sirolimus, RAPAMUNE®); los inhibidores de la farnesiltransferasa como el lonafarnib (SCH 6636, SARASAR™) y las sales, los ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores que sean farmacéuticamente aceptables; como también las combinaciones de dos o más de los anteriores como el CHOP, una

abreviatura para un tratamiento combinado de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisolona; y FOLFOX, una abreviatura para un régimen de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATIN™) combinado con 5-FU y leucovorina, y las sales, los ácidos o los derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores, como también las combinaciones de dos o más de los anteriores.

Los agentes quimioterapéuticos como se definen en el presente incluyen a los "agentes antihormonales" o "terapéuticos endocrinos" que actúan para regular, reducir, bloquear o inhibir los efectos de las hormonas que pueden fomentar el crecimiento del cáncer. Puede tratarse de hormonas en sí mismas, incluidas entre otras: antiestrógenos y moduladores selectivos del receptor del estrógeno (SERM), incluidos, por ejemplo, el tamoxifeno (incluido el tamoxifeno NOLVADEX®), el raloxifeno, el droloxifeno, el 4-hidroxitamoxifeno, el trioxifeno, el keoxifeno, el LY117018, la onapristona y el FARESTON.cndot.toremifeno; los inhibidores de la aromatasa que inhiben la enzima aromatasa, que regula la producción de estrógeno en las glándulas de adrenalina, como, por ejemplo, los 4(5)-imidazoles, la aminoglutetimida, el acetato de megestrol MEGASE®, el exemestano AROMASIN®, el formestanio, el fadrozol, el vorozol RIVISOR®, el letrozol FEMARA® y el anastrozol ARIMIDEX®; y los antiandrógenos como la flutamida, la nilutamida, la bicalutamida, la leuprolida y la goserelina; como también la troxacitabina (un análogo de la citosina 1,3-dioxolano nucleósida); los oligonucleósidos antisentido, especialmente aquellos que inhiben la expresión de genes en las rutas de señalización implicadas en la proliferación de células aberrantes, como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf y H-Ras; las ribozimas como un inhibidor de la expresión de VEGF (p. ej.: ribozima ANGIOZYME®) y un inhibidor de la expresión de HER2; las vacunas como las vacunas de terapia genética, por ejemplo, la vacuna ALLOVECTIN®, la vacuna LEUVECTIN® y la vacuna VAXID®; PROLEUKIN® rIL-2; el inhibidor de la topoisomerasa 1 LURTOTECAN®; ABARELIX® rmRH; la vinorelbina y las espiramicinas (consulte la Pat. de los EE. UU. N.° 4,675,187), y las sales, los ácidos y los derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores; como también las combinaciones de dos o más de los anteriores.

El término anticuerpo "quimérico" hace referencia a un anticuerpo en el cual una porción de la cadena pesada o liviana se deriva de una fuente o especie en particular, mientras que el resto de la cadena pesada o liviana se deriva de una fuente o especie diferente.

El término "grupo de diferenciación 3" o "CD3", como se utiliza en el presente, hace referencia a cualquier CD3 nativo de cualquier fuente vertebrada, incluidos los mamíferos como los primates (p. ej.: humanos) y los roedores (p. ej.: ratones y ratas), a menos que se indique lo contrario, incluidas, por ejemplo, las cadenas CD3ε, CD3γ, CD3α y CD3β. El término abarca CD3 no procesados, de "longitud completa" (p. ej.: CD3ε o CD3γ no procesados o no modificados), como también cualquier forma de CD3 que surge como resultado del procesamiento en la célula. El término también abarca las variantes de CD3 de ocurrencia natural, incluidas, por ejemplo, las variantes de unión o las variantes alélicas. El CD3 incluye, por ejemplo, la proteína CD3ε humana (NCBI RefSeq

No. NP_000724), que tiene 207 aminoácidos de longitud y la proteína CD3γ humana (NCBI RefSeq No. NP_000064), que tiene 182 aminoácidos de longitud.

La "clase" de un anticuerpo hace referencia al tipo de dominio constante o región constante que posee su cadena pesada. Existen cinco clases principales de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), p. ej.: IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4, IgA_1 e IgA_2. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan α, δ, ε, γ y μ, respectivamente.

Se comprende que los aspectos y las representaciones de la invención descritos en el presente incluyen el "abarcamiento", "la consistencia", y la "consistencia esencialmente de" aspectos y representaciones.

El término "agente citotóxico" como se utiliza en el presente hace referencia a una sustancia que inhibe o evita la función celular o bien causa la muerte o destrucción celular. Los agentes citotóxicos incluyen, entre otros, a los isotopos radioactivos (p. ej.: At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32}, Pb^{212} y a los isotopos radioactivos de Lu); agentes o medicamentos quimioterapéuticos (p. ej.: metotrexato, adriamicina, alcaloides de vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorubicina, melfalán, mitomicina C, clorambucilo, daunorubicina u otros agentes interalantes); agentes inhibitorios del crecimiento; enzimas y fragmentos de los anteriores como enzimas nucleolíticas; antibióticos; toxinas como toxinas de moléculas pequeñas o toxinas enzimáticamente activas de origen bacterial, fúngico, vegetal o animal, incluidos fragmentos o variantes de las anteriores; y los varios agentes antitumorales o anticancerígenos divulgados a continuación.

Un "trastorno" es cualquier afección que se beneficiaría con el tratamiento, incluidos, entre otros, los trastornos o las enfermedades crónicas y agudas que incluyen a aquellas afecciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión.

Los términos "trastorno proliferativo celular" y "trastorno proliferativo" hacen referencia a trastornos que están relacionados con algún grado de proliferación celular anormal. En una representación, el trastorno proliferativo celular es cáncer. En una representación, el trastorno proliferativo celular es un tumor.

Los términos "cáncer" y "cancerígeno" hacen referencia a, o describen la afección fisiológica de los mamíferos que suele estar caracterizada por un crecimiento celular incontrolado. Algunos ejemplos de cánceres incluyen entre otros, al carcinoma, al linfoma, al blastoma, al sarcoma y a la leucemia o las malignidades linfáticas. Ejemplos más concretos de dichos cánceres incluyen, entre otros, al cáncer de células escamosas (*p. ej.:* cáncer de células escamosas epiteliales), al cáncer de pulmón, incluido el cáncer de pulmón de células pequeñas, al cáncer de pulmon de células no pequeñas, al adenocarcinoma de pulmón y al carcinoma escamoso de pulmón, al cáncer peritoneal, al cáncer hepatocelular, al cáncer gástrico o de estómago, que incluye al cáncer gastrointestinal y al cáncer estromal gastrointestinal, al cáncer pancreático, al glioblastoma, al cáncer cervical, al cáncer de ovarios, al cáncer de hígado, al cáncer de

vejiga, al cáncer de vías urinarias, al hepatoma, al cáncer de mama, al cáncer de colon, al cáncer rectal, al cáncer colorectal, al cáncer endometrial o carcinoma uterino, al carcinoma de glándulas salivares, al cáncer de riñón o renal, al cáncer de próstata, al cáncer de vulva, al cáncer de tiroides, al carcinoma hepático, al carcinoma anal, al carcinoma peneano, al melanoma, al melanoma de esparcimiento superficial, al melanoma de léntigo maligno, a los melanomas lentiginoso acral, a los melanomas nodulares, al mieloma múltiple y al linfoma de células B (incluido el linfoma de bajo grado/no Hodgkin folicular (NHL); NHL linfocítico pequeño (SL); de grado intermedio/NHL folicular; NHL difuso de grado intermedio; NHL inmunoblástico de alto grado; NHL linfoblástico de alto grado; NHL de células no adheridas pequeñas de alto grado; NHL de enfermedad voluminosa; linfoma de células del manto; linfoma relacionado con el SIDA; y Macroglobulinemia de Waldenstrom); leucemia linfocítico crónico (CLL); leucemia linfoblástica aguda (ALL); leucemia de células capilares; leucemia mieloblástica crónica; y trastorno linfoproliferativo posterior a transplantes (PTLD), como también proliferación vascular anormal asociada con facomatosis, edema (como los que están asociados con tumores cerebrales), síndrome de Meigs, cáncer de cerebro, como también cáncer de cabeza y cuello, como también las metástasis asociadas. En determinadas representaciones, los cánceres que son sensibles al tratamiento con los anticuerpos de la invención incluyen al cáncer de mama, al cáncer colorectal, al cáncer rectal, al cáncer de pulmón de células no pequeñas, al glioblastoma, al linfoma no Hodgkins (NHL), al cáncer de células renales, al cáncer de próstata, al cáncer de hígado, al cáncer pancreático, al carcinoma de tejidos blandos, al sarcoma de Kaposi, al carcinoma carcinoide, al cáncer de cabeza y cuello, al cáncer de ovarios, al mesotelioma y al mieloma múltiple. En algunas representaciones, el cáncer se selecciona entre: cáncer de pulmón de células pequeñas, gliblastoma, neuroblastoma, melanoma, carcinoma de mama, cáncer gástrico, cáncer colorectal (CRC) y carcinoma hepatocelular. De todos modos, en algunas representaciones, el cáncer se selecciona entre: cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer colorectal, glioblastoma y carcinoma de mama, incluidas las formas metastásicas de dichos cánceres. En otras representaciones, el cáncer se seleccionó de una clase de cánceres de células B maduras excluido el Linfoma de Hodgkin pero incluido el linfoma de células B semejantes a las del centro germinal (GCB) DLBCL, linfoma de células semejantes a la célula B activada (ABC) DLBCL, linfoma folicular (FL), linfoma de células de manto (MCL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfoide crónica (CLL), linfoma de zona marginal (MZL), leucemia linfocítica de célula pequeña (SLL), linfoma linfoplasmocítico (LL), macroglobulinemia de Waldenstrom (WM), linfoma del sistema nervioso central (CNSL), linfoma de Burkitt (BL), leucemia prolinfocítica de células B, linfoma esplénico de zona marginal, leucemia de células capilares, linfoma o leucemia esplénico, inclasificable, linfoma esplénico difuso de linfocitos pequeños de pulpa roja, variante de leucemia de células capilares, macroglobulinemia de Waldenström, enfermedades de cadenas pesadas, enfermedad de cadenas alfa, enfermedad de cadenas gamma, enfermedad de cadenas μ, mieloma de

células plasmáticas, plasmocitoma óseo solitario, plasmocitoma extraóseo, linfoma de zona marginal extranodal de tejido linfoide asociado a mucosa (linfoma MALT), linfoma de zona marginal nodal, linfoma de zona marginal nodal pediátrico, linfoma folicular pediátrico, linfoma primario cutáneo de células del centro folicular, linfoma de células grandes B rico en células T/ histiocitos, linfoma DLBCL primario del sistema nervioso central, linfoma DLBCL cutáneo primario, linfoma tipo pierna, linfoma DLCBCL difuso de células B grandes positivo al virus de Epstein-Barr del anciano, DLBCL asociado con la inflamación crónica, granulomatosis linfomatoide, linfoma primario mediastinal de células B grandes (tímico), linfoma de células B grandes intravascular, linfoma de células B grandes positivo al ALK, linfoma plasmoblástico, linfoma de células B grandes tras enfermedad de Castleman multicéntrica asociada a infección por virus HHV8, linfoma primario de efusión: linfoma de células B, inclasificable, con características intermedias entre linfoma difuso de células B grandes y linfoma de Burkitt, y linfoma de células B, inclasificable, con características intermedias entre linfoma difuso de células B grandes y linfoma clásico de Hodgkin.

El término “tumor”, como se utiliza en el presente, hace referencia a todo crecimiento y proliferación de células neoplásicas, ya sea maligno o benigno, y a todas las células y los tejidos precancerosos y cancerosos. Los términos “cáncer”, “cancerígeno”, “trastorno proliferativo celular”, “trastorno proliferativo” y “tumor” no se excluyen el uno al otro según la referencia del presente.

El término “antígeno del tumor”, como se utiliza en el presente, puede comprenderse como aquellos antígenos que se presentan en las células tumorales. Estos antígenos pueden presentarse en la superficie celular con una parte extracelular, que con frecuencia se combina con una parte transmembranosa y citoplasmática de la molécula. Estos antígenos en ocasiones pueden presentarse solo mediante células tumorales y nunca mediante las células normales. Los antígenos del tumor pueden expresarse exclusivamente en las células tumorales o pueden representar una mutación específica del tumor en comparación con las células normales. En este caso, se denominan antígenos específicos del tumor. Son más comunes los antígenos del tumor que se presentan mediante células tumorales y células normales, y estos se denominan antígenos asociados con el tumor. Estos antígenos asociados con el tumor pueden sobreexpresarse en comparación con las células normales o son accesibles para unirse a anticuerpos en células tumorales debido a la estructura menos compacta del tejido del tumor en comparación con el tejido normal. En un aspecto, el antígeno del tumor se selecciona entre aquellos expuestos en la Tabla 1 a continuación.

Las “funciones del efector” hacen referencia a las actividades biológicas atribuíbles a la región Fc de un anticuerpo, que varían según el isotipo del anticuerpo. Algunos ejemplos de funciones del efector del anticuerpo incluyen: Unión a C1q y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC); unión al receptor de Fc; citotoxicidad mediada por célula dependiente del anticuerpo (ADCC); fagocitosis; regulación descendente de los receptores de la superficie celular (p. ej.: receptor de células B); y activación de células B.

Una “cantidad efectiva” de un compuesto, por ejemplo, un anticuerpo contra CD3 de la invención o un compuesto (p. ej.: compuesto farmacéutico) de este, es al menos la cantidad mínima necesaria para lograr el resultado terapéutico o profiláctico deseado, como una mejora o prevención medible de un trastorno en particular (p. ej.: un trastorno proliferativo celular, p. ej.: el cáncer). Una cantidad efectiva en el presente puede variar según factores como la etapa de la enfermedad, la edad, el sexo, el peso del paciente y la capacidad del anticuerpo para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad efectiva también es una cantidad en la cual cualquier efecto tóxico o perjudicial del tratamiento sea superado por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Con fines profilácticos, los resultados beneficiosos o deseados incluyen resultados como la eliminación o reducción del riesgo, la disminución de la gravedad o el retraso en la aparición de la enfermedad, incluidos los síntomas bioquímicos, histológicos o conductuales de la enfermedad, sus complicaciones y los fenotipos patológicos intermedios que se presentan durante el desarrollo de la enfermedad. Con fines terapéuticos, los resultados beneficiosos o deseados incluyen los resultados clínicos como la reducción de uno o más síntomas causados por la enfermedad, el aumento de la calidad de vida de quienes sufren la enfermedad, la disminución en la dosis de otros medicamentos necesarios para tratar la enfermedad, la mejora en el efecto de otro medicamento como en la selección de ruta, el retraso en el progreso de la enfermedad o la prolongación de la supervivencia. En el caso del cáncer o el tumor, una cantidad efectiva del medicamento puede tener efecto a la hora de reducir la cantidad de células cancerígenas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (es decir, lentificar en alguna medida o deseablemente detener) la infiltración de células cancerígenas en los órganos periféricos; inhibir (es decir, lentificar en alguna medida y deseablemente detener) la metástasis tumoral; inhibiendo en alguna medida el crecimiento del tumor; o aliviar en alguna medida uno o más de los síntomas relacionados con el trastorno. Una cantidad efectiva puede administrarse en una o más administraciones. Para los fines de esta invención, una cantidad efectiva del medicamento, compuesto o compuesto farmacéutico es una cantidad suficiente para lograr el tratamiento profiláctico o terapéutico ya sea de manera directa o indirecta. Como se comprende en el contexto clínico, una cantidad efectiva de un medicamento, compuesto o compuesto farmacéutico puede o no lograrse en conjunto con otro medicamento, compuesto o compuesto farmacéutico. De esta manera, una “cantidad efectiva” puede considerarse en el contexto de la administración de un agente terapéutico o más, y un agente solo puede considerarse como administrado en una cantidad efectiva si, en conjunto con uno o más agentes, es posible o se logra obtener un resultado deseable.

El término “región Fc” en el presente se utiliza para definir una región del punto terminal C de una cadena pesada de inmunoglobulina que contiene al menos una porción de la región constante. El término incluye las regiones Fc de secuencia nativa y las regiones Fc variantes. En una representación, una región Fc de una cadena pesada de IgG humana se extiende desde Cys226 o bien desde Pro230, hasta el miembro carboxilo

terminal de la cadena pesada. No obstante, la lisina del punto terminal C (Lys447) de la región Fc puede o no estar presente. A menos que se especifique lo contrario en el presente, la numeración de los residuos de aminoácidos en la región Fc o la región constante se realiza según el sistema de numeración de la UE, también denominado índice de la UE, como se describe en Kabat y otros, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (Secuencias de proteínas de interés inmunológico), 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health (5.ta edición, Servicio de Salud Pública, Institutos Nacionales de Salud), Bethesda, MD, 1991.

El "marco" o "FR" hace referencia a los residuos de dominio variable distintos a los residuos de la región hipervariable (HVR). El FR de un dominio variable por lo general consta de cuatro dominios FR: FR1, FR2, FR3 y FR4. Por consiguiente, las secuencias HVR y FR por lo general aparecen en la siguiente secuencia en VH (o VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

Los términos "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto" y "anticuerpo entero" se utilizan en el presente de manera intercambiable para hacer referencia a un anticuerpo que tiene una estructura sustancialmente similar a la estructura de un anticuerpo nativo o que tiene cadenas pesadas que contienen una región Fc como la definida en el presente.

Cuando se utiliza en el presente, un "agente inhibidor del crecimiento" hace referencia a un compuesto o una composición que inhibe el crecimiento de una célula, ya sea *in vitro* o *in vivo*. En una representación, el agente inhibidor del crecimiento es un anticuerpo inhibidor del crecimiento que evita o reduce la proliferación de una célula que expresa un antígeno al cual se une el anticuerpo. En otra representación, el agente inhibidor del crecimento puede ser uno que reduzca significativamente el porcentaje de células que se encuentran en la etapa S. Los ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen a agentes que bloquean el progreso del ciclo celular (en un lugar distinto a la etapa S), como los agentes que inducen la detención de G1 y la detención de la etapa M. Algunos bloqueadores clásicos de la etapa M incluyen a las vincas (vincristina y vinblastina), los taxanos y los inhibidores de la topoisomerasa II como la doxorubicina, la epirubicina, la daunorubicina, el etopósido y la bleomicina. Aquellos agentes que detienen G1 también se derraman hacia la detención de la etapa S, por ejemplo, los agentes alkilantes del ADN como el tamoxifeno, la prednisona, la dacarbazina, la mecloretamina, el cisplatino, el metotrexato, el 5-fluorouracilo y la ara-C. Puede encontrar más información en Mendelsohn e Israel, eds., The Molecular Basis of Cancer (La base molecular del cáncer), Chapter 1, entitled "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" (Capítulo 1, titulado "Regulación del ciclo celular, oncogenes y medicamentos antineoplásicos) de Murakami y otros. (W.B. Saunders, Filadelfia, 1995), p. ej.: pág. 13. Los taxanos (paclitaxel y docetaxel) son medicamentos contra el cáncer que se derivan del árbol de tejo. El docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), derivado del tejo europeo, es un análogo semisintético del paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). El paclitaxel y el docetaxel fomentan la formación de microtúbulos desde los dímeros de tubulina y

estabilizan los microtúbulos al evitar la depolimerización, que provoca la inhibidición de la mitosis celular.

El término cáncer "positivo para HER2" abarca las células de cáncer que tienen niveles de HER2 superiores a los normales. Los ejemplos de cáncer positivo para HER2 incluyen al cáncer de mama positivo para HER2 y al cáncer gástrico positivo para HER2. Opcionalmente, el cáncer positivo para HER2 tiene un puntaje inmunohistoquímico (IHC) de 2+ o 3+ o una hibridización in situ (ISH) con un cociente de amplificación 2.0.

Los términos "célula huésped", "línea celular huésped" y "cultivo celular huésped" se utilizan de manera intercambiable y hacen referencia a las células en las cuales se ha introducido ácido nucléico exógeno, incluida la progenie de dichas células. Las células huésped incluyen a "transformantes" y "células transformadas", que incluyen a la célula transformada principal y a la progenie derivada de allí sin importar la cantidad de pasajes. Es posible que la progenie no sea completamente idéntica en cuanto al contenido de ácido nucléico con respecto a una célula progenitora, sino que puede contener mutaciones. Una progenie mutante que tiene la misma función o actividad biológica que la cribada o seleccionada en la célula transformada originalmente se incluye en el presente.

Un "anticuerpo humano" es un anticuerpo que posee una secuencia de aminoácidos que se corresponde a aquella de un anticuerpo producido por un humano o una célula humana o derivada de una fuente no humana que utiliza repertorios de anticuerpos humanos u otras secuencias de codificación de anticuerpos humanos. Esta definición de un anticuerpo humano excluye de manera específica a un anticuerpo humanizado que consta de residuos de uniones antigénicas no humanas. Los anticuerpos humanos pueden producirse mediante el uso de varias técnicas conocidas en la materia, incluidas las genotecas de exposición en fagos. Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks *y otros.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991). También disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos se encuentran los métodos descritos en Cole *y otros*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy (Anticuerpos monoclonales y tratamiento del cáncer)*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner *y otros*, *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991). Consulte también van Dijk y van de Winkel, *Curr. Opin. Farmacol.*, 5: 368-74 (2001). Los anticuerpos humanos pueden prepararse mediante la administración de un antígeno a un animal transgénico que ha sido modificado para producir dichos anticuerpos en respuesta a un desafío antigénico, pero cuyos loci endógenos han sido desactivados, p. ej.: xenoratones inmunizados (consulte, p. ej.: las Patentes de los EE. UU. N.° 6.075.181 y 6.150.584 con respecto a la tecnología XENOMOUSE™). Consulte también, por ejemplo, Li *y otros*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006) con respecto a los anticuerpos humanos generados mediante tecnología de hibridoma de células B humanas.

Un "marco de consenso humano" es un marco que representa los residuos de aminoácidos de ocurrencia más común en una selección de secuencias marco VL o VH de inmunoglobulina humana. Por lo general, la selección de secuencias VL o VH de

inmunoglobulina humana proviene de un subgrupo de secuencias de dominio variable. Por lo general, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como en Kabat y otros, *Sequences of Proteins of Immunological Interest (Secuencias de proteínas de interés inmunológico)*, Fifth Edition, NIH Publication (Quinta edición, Publicación del NIH) 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3. En una representación, para el VL, el subgrupo es el subgrupo kappa I como en Kabat y otros, *supra.* En una representación, para el VH, el subgrupo es el subgrupo III como en Kabat y otros, *supra*.

Un anticuerpo "humanizado" hace referencia a un anticuerpo quimérico que abarca residuos de aminoácidos de HVR no humanos y residuos de aminoácidos de FR humanos. En determinadas representaciones, un anticuerpo humanizado abarcará sustancialmente la totalidad de al menos uno y típicamente dos dominios variables, en los cuales todos o sustancialmente todos los HVR (p. ej. CDR) corresponden a aquellos de un anticuerpo no humano, y todos o sustancialmente todos los FR corresponden a aquellos de un anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado opcionalmente puede abarcar al menos una porcion de una región constante de anticuerpo derivada de un anticuerpo humano. Una "forma humanizada" de un anticuerpo, p. ej.: un anticuerpo no humano, hace referencia a un anticuerpo que fue sometido a la humanización.

El término "región hipervariable" o "HVR" como se utiliza en el presente hace referencia a cada una de las regiones de un dominio variable de anticuerpo que resulta hipervariable en secuencia ("regiones determinantes de complementaridad" o "CDR") o contiene los residuos que establecen contacto con el antígeno ("contactos de antígeno"). Por lo general, los anticuerpos abarcan seis HVR: tres en VH (H1, H2, H3) y tres en VL (L1, L2, L3). Los HVR ejemplares en el presente incluyen:

(a) bucles hipervariables que ocurren en los residuos de aminoácidos 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) (Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987));

(b) CDR que ocurren en los residuos de aminoácidos 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35b (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) (Kabat y otros*., Sequences of Proteins of Immunological Interest (Secuencias de proteínas de interés inmunológico)*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health (5.ta edición, Servicio de Salud Pública, Institutos Nacionales de Salud), Bethesda, MD (1991));

(c) contactos con antígenos que ocurren en los residuos de aminoácidos 27c-36 (L1), 46-55 (L2), 89-96 (L3), 30-35b (H1), 47-58 (H2) y 93-101 (H3) (MacCallum y otros. *J. Mol. Biol.* 262: 732-745 (1996)) y

(d) combinaciones de (a), (b), o (c), que incluyen los residuos de aminoácidos HVR 46-56 (L2), 47-56 (L2), 48-56 (L2), 49-56 (L2), 26-35 (H1), 26-35b (H1), 49-65 (H2), 93-102 (H3) y 94-102 (H3).

A menos que se indique lo contrario, los residuos de HVR y otros residuos del dominio variable (p. ej.: residuos FR) están numerados en el presente según Kabat y otros, *supra*.

Un "inmunoconjugado" es un anticuerpo conjugado en una o más moléculas heterólogas,

incluido entre otros, un agente citotóxico.

Un "sujeto" o un "individuo" es un mamífero. Los mamíferos incluyen, entre otros, a los animales domésticos (p. ej.: vacas, ovejas, gatos, perros y caballos), primates (p. ej.: primates humanos y no humanos, como los monos), conejos y roedores (p. ej.: ratones y ratas). En determinadas representaciones, el sujeto o individuo es un humano.

Un anticuerpo "aislado" es uno que ha sido separado de un componente de su entorno natural. En algunas representaciones, un anticuerpo es purificado a más del 95% o del 99% de pureza según lo determinado por, por ejemplo, métodos electroforéticos (p. ej.: SDS-PAGE, concentración isoeléctrica (IEF), electroforesis capilar) o cromatográficos (p. ej.: intercambio de iones o HPLC de fase inversa). Para revisar los métodos de evaluación de la pureza de los anticuerpos, consulte, p. ej.: Flatman y otros, *J. Chromatogr. B* 848:79-87 (2007).

Un ácido nucléico "aislado" hace referencia a una molécula de ácido nucléico que fue separada de un componente de su entorno natural. Un ácido nucléico aislado incluye a una molécula de ácido nucléico contenida en células que comúnmente contienen a la molécula de ácido nucléico, pero la molécula de ácido nucléico se encuentra presente de manera extracromosómica o en una ubicación cromosómica que es diferente a su ubicación cromosómica natural.

La "codificación del ácido nucléico aislado de un anticuerpo contra CD3" hace referencia a una o más moléculas de ácido nucléico que codifican cadenas pesadas y livianas de anticuerpos (o fragmentos de ellas), incluidas dichas moléculas de ácido nucléico de un solo vector o de vectores separados, y dichas moléculas de ácido nucléico presentes en una o más ubicaciones en una célula huésped.

El término "anticuerpo monoclonal" como se utiliza en el presente, hace referencia a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que abarcan la población son idénticos o se unen al mismo epítopo, excepto en el caso de los anticuerpos con posibles variantes, p. ej.: que contienen mutaciones de ocurrencia natural o surgen durante la producción de una preparación de anticuerpos monoclonales, dichas variantes por lo general están presentes en cantidades menores. En contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales, que típicamente incluyen anticuerpos diferentes dirigidos contra determinantes diferentes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales se dirige contra un solo determinante en un antígeno. De esta manera, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea y no debe interpretarse como que es necesaria la producción del anticuerpo mediante ningún método en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se utilizarán en conformidad con la presente inversión pueden fabricarse mediante una variedad de técnicas, incluidas entre otras, el método de hibridoma, los métodos de ADN recombinante, los métodos de exposición de fagos y los métodos que y los métodos que utilizan animales transgénicos que contienen todos o parte de los loci de la inmunoglobulina humana, dichos métodos y

otros métodos ejemplares para fabricar anticuerpos monoclonales se describen en el presente.

Un “anticuerpo desnudo” hace referencia a un anticuerpo que no está conjugado en una fracción heteróloga (p. ej.: una fracción citotóxica) o radioetiqueta. El anticuerpo desnudo puede estar presente en una formulación farmacéutica.

Los “anticuerpos nativos” hacen referencia a moléculas de inmunoglobulina de ocurrencia natural con estructuras variantes. Por ejemplo, los anticuerpos nativos de IgG son glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150,000 dáltones, compuestas de dos cadenas livianas idénticas y dos cadenas pesadas idénticas que están unidas por un bisulfuro. Desde N- hasta C-terminal, cada cadena pesada tiene una región variable (VH), también denominada dominio pesado variable o un dominio variable de cadena pesada, seguido por tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3). Similarmente, desde N- hasta C-terminal, cada cadena liviana tiene una región variable (VL), también denominada dominio liviano variable o un dominio variable de cadena liviana, seguido por un dominio liviano constante (CL). La cadena liviana de un anticuerpo puede estar asignada a uno de dos tipos, denominados kappa (κ) y lambda (λ), según la secuencia de aminoácidos de su dominio constante.

El término “prospecto” se utiliza para hacer referencia a las instrucciones que habitualmente se incluyen en los paquetes comerciales de los productos terapéuticos, que contienen información sobre las indicaciones, el uso, la dosis, la administración, los tratamientos combinados, las contraindicaciones o las advertencias con respecto al uso de dichos productos terapéuticos.

El término “antagonista de unión del eje de PD-1” hace referencia a una molécula que inhibe la interacción de un colaboración de unión al eje de PD-1 con uno o más de sus colaboradores de unión, para eliminar la disfunción de la célula T que surge como resultado de señalizar el eje de señalización de PD-1; con el resultado que es la restauración o mejora de la función de la célula T (p. ej.: proliferación, producción de citocinas, muerte de células objetivo). Como se lo utiliza en el presente, el antagonista de unión al eje PD-1 incluye un antagonista de unión a PD-1, un antagonista de unión a PD-L1 y un antagonista de unión a PD-L2.

El término “antagonista de unión a PD-1” se refiere a una molécula que disminuye, bloquea, inhibe, anula o interfiere en la transducción de señal resultante de la interacción de PD-1 con una o varias de sus moléculas de enlace, tales como PD-L1, PD-L2. En algunas representaciones, un antagonista de unión a PD-1 es una molécula que inhibe la unión de PD-1 a una o varias de sus moléculas de enlace. En un aspecto específico, el antagonista de unión a PD-1 inhibe la unión de PD-1 a PD-L1 o PD-L2. Por ejemplo, los antagonistas de PD-1 incluyen anticuerpos contra PD-1, fragmentos de unión a antígenos del mismo, inmunoadhesinas, proteínas de fusión, oligopéptidos y otras moléculas que disminuyen, bloquean, inhiben, anulan o interfieren con la transducción de señal resultante de la interacción de PD-1 con PD-L1 o PD-L2. En una representación, un antagonista de unión de PD-1 reduce la señal coestimulante negativa mediada por o a

través de proteínas de la superficie celular expresadas en linfocitos T, mediando la señal a través del PD-1 para representar una célula T disfuncional como menos disfuncional (p. ej.: realzando las respuestas del efector ante el reconocimiento del antígeno). En algunas representaciones, un antagonista de unión a PD-1 es un anticuerpo contra PD-1. En un aspecto específico, un antagonista de unión a PD-1 es MDX-1106 (nivolumab) descrito en el presente. En otro aspecto específico, un antagonista de unión a PD-1 es MK-3475 (lambrolizumab) descrito en el presente. En otro aspecto específico, un antagonista de unión a PD-1 es CT-011 (pidilizumab) descrito en el presente. En otro aspecto específico, un antagonista de unión a PD-1 es AMP-224 descrito en el presente.

El término "antagonista de unión a PD-L1" se refiere a una molécula que disminuye, bloquea, inhibe, anula o interfiere en la transducción de señal resultante de la interacción de PD-L1 con una o más de sus moléculas de enlace, tales como PD-1, B7-1. En algunas representaciones, un antagonista de unión a PD-L1 es una molécula que inhibe la unión de PD-L1 a sus colaboradores de enlace. En un aspecto específico, el antagonista de unión a PD-L1 inhibe la unión de PD-L1 a PD-1 o B7-1. En algunas representaciones, los antagonistas de unión a PD-L1 incluyen anticuerpos contra PD-L1, fragmentos de unión a antígenos del mismo, inmunoadhesinas, proteínas de fusión, oligopéptidos y otras moléculas que disminuyen, bloquean, inhiben, anulan o interfieren con la transducción de señal resultante de la interacción de PD-L1 con una o más de sus moléculas de enlace, tales como PD-1, B7-1. En una representación, un antagonista de unión a PD-L1 reduce la señal coestimulante negativa mediada por o a través de proteínas de la superficie celular expresadas en linfocitos T, mediando la señal a través del PD-L1 para representar una célula T disfuncional como menos disfuncional (p.ej.: realzando las respuestas del efector ante el reconocimiento del antígeno). En algunas representaciones, un antagonista de unión de la PD-L1 es un anticuerpo anti-PD-L1. En un aspecto específico, un anticuerpo anti-PD-L1 es el YW243.55.S70 descrito en el presente. En otro aspecto específico, un anticuerpo anti-PD-L1 es el MDX-1105 descrito en el presente. Otro aspecto específico especifica que un anticuerpo anti-PD-L1 es el MPDL3280A descrito en el presente. Otro aspecto específico especifica que un anticuerpo anti-PD-L1 es el MEDI4736 descrito en el presente.

El término "antagonista de unión de PD-L2" se refiere a una molécula que disminuye, bloquea, inhibe, anula o interfiere en la transducción de señal resultante de la interacción de PD-L2 con una o varias de sus moléculas de enlace, tal como la PD-1. En algunas representaciones, un antagonista de unión de PD-L2 es una molécula que inhibe la unión de PD-L2 y una o varias de sus moléculas de enlace. En un aspecto específico, el antagonista de unión de PD-L2 inhibe la unión del PD-L2 al PD-1. En algunas representaciones, los antagonistas de PD-L2 incluyen anticuerpos anti-PD-L2, fragmentos unificadores de antígenos del mismo, inmunoadhesinas, proteínas de fusión, oligopéptidos y otras moléculas que disminuyen, bloquean, inhiben, anulan o interfieren con la transducción de señal resultante de la interacción de PD-L2 con una o más de sus moléculas de enlace, tal como la PD-1. En una representación, un antagonista de unión de

PD-L2 reduce la señal coestimulante negativa mediada por o a través de proteínas de la superficie celular expresadas en linfocitos T, mediando la señal a través del PD-L2 para representar una célula T disfuncional como menos disfuncional (p.ej: realzando las respuestas de efector a un reconocimiento antígeno). En algunas representaciones, un antagonista de unión de PD-L2 es una inmunoadhesina.

A menos que se indique lo contrario, el término "proteína" aquí utilizado se refiere a cualquier proteína nativa de cualquier fuente vertebrada, incluyendo mamíferos tales como primates (p.ej humanos) y roedores (p.ej ratones y ratas). El término abarca proteínas "completas" sin procesar, así como también cualquier forma de proteína que resulte del procesamiento en la célula. El término también incluye variables naturales de la proteína, como por ejemplo variantes de empalme o alélicas. Las proteínas respectivas a la invención incluyen, por ejemplo, cualquier proteína enumerada en la Tabla 1.

"El porcentaje (%) de identidad de secuencias de aminoácidos" con respecto a una secuencia de polipéptido de referencia se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidato que es idéntica a los residuos de aminoácidos en la secuencia de polipéptidos de referencia, luego de alinear las secuencias e introducir espacios, si fuera necesario, para conseguir el porcentaje máximo de la identidad de secuencia, sin considerar cualquier sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. El proceso de alineación con el fin de determinar el porcentaje de la identidad de secuencia de aminoácidos puede lograrse de distintas maneras por expertos en la materia, por ejemplo, utilizando software informático de acceso público, tal como BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Aquellas personas expertas en la materia pueden determinar los parámetros adecuados para alinear secuencias, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir una alineación máxima sobre el largo completo de las secuencias en comparación. Sin embargo, los valores (%) de identidad de secuencia de aminoácidos se generan utilizando el programa informático de comparación de secuencias, ALIGN-2, para los fines aquí establecidos. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 fue creado por Genentech, Inc, mientras que el código fuente ha sido presentado con documentación del usuario en la Oficina de Derechos de Autor de E.E.U.U., Washington D.C., 20559, donde se inscribió bajo el N° de Registro de Derechos de Autor de E.E.U.U. TXU510087. El programa ALIGN-2 es de dominio público en Genentech, Inc., Sur de San Francisco, California, o puede recopilarse a partir del código fuente. El programa ALIGN-2 debe recopilarse para usar en un sistema operativo UNIX, incluyendo UNIX V4.OD digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias son establecidos por el programa ALIGN-2 y no varían.

En situaciones en las que se utiliza ALIGN-2 para comparar secuencias de aminoácidos, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos A dada con o contra una secuencia de aminoácidos B dada (que de manera alternativa puede plantearse como una secuencia de aminoácidos A dada que tiene o incluye un % de identidad de secuencia particular de aminoácidos con o contra una secuencia de aminoácidos B dada) se calcula de la siguiente manera:

100 veces la fracción X/Y

donde X es la cantidad de residuos de aminoácidos calificados como idénticamente compatibles por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en la alineación del programa de A y B, y donde Y es la cantidad total de residuos de aminoácidos en B. Ha de reconocerse que donde la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A a B no será igual al % de identidad de secuencia de aminoácidos de B a A. A menos que se establezca lo contrario, todos los valores de porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos utilizados en el presente se obtienen mediante el proceso descripto en el párrafo inmediatamente anterior utilizando el programa informático ALIGN-2.

El término "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación hecha de una manera que permita la actividad biológica de un ingrediente activo que ahí se contiene para ser eficaz, la cual no contiene componentes adicionales considerados inaceptablemente tóxicos para el sujeto para el cual se administraría dicha formulación.

Un "portador aceptable farmacéuticamente" es un ingrediente en una formulación farmacéutica, distinto de un ingrediente activo, que no se considera tóxico para un sujeto. Un portador aceptable farmacéuticamente incluye, aunque no exclusivamente, un tampón, excipiente, estabilizador o conservante.

Como se utiliza en el presente, la palabra "tratamiento" (y sus variaciones gramaticales tales como "tratar") alude a la intervención clínica en un intento de alterar el curso natural del individuo que se encuentra bajo tratamiento, lo cual puede realizarse por profilaxis o durante el curso de la patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen, pero no se limitan a, prevenir la ocurrencia o recurrencia de una enfermedad, aliviar los síntomas, disminuir cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, prevenir la metástasis, disminuir la tasa de evolución de la enfermedad, mejorar o paliar el estado de la enfermedad, y una remisión o un mejor pronóstico. En algunas representaciones, los anticuerpos de la invención son utilizados para retrasar el desarrollo de una enfermedad o disminuir su progreso.

El término "progresión retrasada" de un trastorno o enfermedad aquí utilizado implica postergar, dificultar, retrasar, estabilizar y/o posponer el desarrollo de la enfermedad o trastorno (p.ej: un trastorno proliferativo de células, p.ej: cáncer). Este retraso puede durar por variados lapsos de tiempo, dependiendo de la historia de la enfermedad y/o del individuo bajo tratamiento. Como es obvio para los expertos en la materia, un retraso suficiente o importante de hecho puede abarcar la prevención, ya que el individuo no desarrolla la enfermedad. Por ejemplo, se puede retrasar un cáncer en estado avanzado, como en el desarrollo de la metástasis.

"Disminuir" o "inhibir" implica la capacidad de causar un descenso global, por ejemplo, de un 20% o mayor, de un 50% o mayor, de un 75%, 85%, 90%, 95% o mayor. En ciertas representaciones, disminuir o inhibir puede referirse a la función efectora de un anticuerpo que se media por un anticuerpo de la región de fragmento cristalizable. Dicho

efector funciona específicamente, incluyendo citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA), y fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP).

El término "región variable" o "dominio variable" se refiere al dominio de un anticuerpo de cadena liviana o pesada que está involucrado en la unión del anticuerpo y el antígeno. Por lo general, los dominios variables de cadena pesada y cadena liviana (VH y VL, respectivamente) de un anticuerpo nativo tienen estructuras similares. Cada dominio comprende cuatro regiones altamente conservadas (FRs) y tres regiones hipervariables (RHVs). (Ver, p.ek, Kindt et ál. *Kuby Immunology*, 6ta Ed., W.H. Freeman and Co., página 91 (2007).) Un dominio VH o VL único puede ser suficiente para otorgar especificidad de unión al antígeno. Además, los anticuerpos que unen un antígeno particular pueden aislarse utilizando un dominio VH o VL de un anticuerpo que une el antígeno para tamizar una genoteca de dominios VH o VL complementarios, respectivamente. Ver, p.ej. Portolano et ál, *J. Immunol* 150:880-887 (1993); Clarkson et ál., *Nature* 352:624-628 (1991).

El término "vector" utilizado en el presente documento se refiere a la molécula nucleica ácida capaz de propagar otro ácido nucleico al cual está unida. El término incluye el vector como una estructura ácido nucleica autorreproductora, así como también el vector incorporado al genoma de una célula hospedadora en el cual ha sido introducido. Ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de los ácidos nucleicos a los que están unidos operativamente. En el presente documento nos referimos a dichos vectores como "vectores de expresión".

Como se usa en el presente, "administrar" implica un método de dar una dosis de un compuesto (p. ej. un anticuerpo de anti-CD3 de la invención o un ácido nucleico codificando un anticuerpo anti-CD3 de la invención) o una composición (p.ej, una composición farmacéutica. p.ej. una composición farmacéutica incluyendo un anticuerpo anti-CD3 de la invención) a un sujeto. Las composiciones utilizadas en los métodos descritos en el presente pueden administrarse, por ejemplo por vía intramuscular, intravenosa, intradermal, por vía percutánea, intraarterial, intraperitonal, intralesional, intracraneal, intraarticular, intraprostática, intrapleural, intratraqueal, intranasal, intravítrea, intravaginal, intrarectal, de forma tópica, por vía intratumoral, peritoneal, subcutánea, subconjuntival, intravesicular, mucosa, intrapericárdica, intraumbilical, intraocular, oral, tópica, local, por inhalación, por inyección, por infusión, por infusión contínua, por perfusión localizada lavando células diana directamente, por catéter, por lavado, en cremas o en composiciones lipídicas. El método de administración puede variar según diversos factores (p. ej. el compuesto o composición a administrar y la gravedad de la condición, enfermedad o trastorno bajo tratamiento).

II. COMPOSICIONES Y MÉTODOS

En parte, la invención se basa en anticuerpos anti-CD3. En ciertas representaciones, los anticuerpos anti-CD3 son multiespecíficos (es decir, biespecíficos) y, además de un CD3 o

un fragmento del mismo, unen una segunda molécula biológica (es decir, un antígeno de la superficie celular, p.ej: un antígeno tumoral). Los anticuerpos de la invención son útiles, por ejemplo, para tratar o retrasar el avance de un trastorno proliferativo de células (p.ej: cáncer) o un trastorno autoinmune, o para aumentar la función inmunológica en un sujeto que sufre dicho trastorno.

A. Anticuerpos anti-CD-3 modelo

En un aspecto, la invención produce anticuerpos aislados que se unen a CD3 (p.ej: CD3ε y/o CD3γ).

Por ejemplo, en algunas situaciones, un anticuerpo anti CD3 que tiene un primer dominio de unión puede comprender al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis regiones hipervariables (RHV) que se seleccionan de (a) una RHV-H1 que consta en una secuencia de aminoácidos con N°. de ID de SEC.: 1; (b) una RHV-H2 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.° de ID de SEC.: 2; (c) una RHV-H3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 3; (d) una RHV-L1 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 4; (e) una RHV-L2 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 5; y (f) una RHV-L3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 6. En algunos casos, el anticuerpo anti-CD3 contiene al menos una (por ejemplo, 1, 2, 3, o 4) de las regiones del marco de las cadenas pesadas FR-H1, FR-H2, FR-H3, y FR-H4 que consiste en las secuencias de N.º de ID de SEC.: 301-304, respectivamente, y/o al menos una (por ejemplo, 1, 2, 3, o 4) de las regiones del marco de la cadena liviana FR-L1, FR-L2, FR-L3, y FR-L4 que consiste en las secuencias de N.º de ID de SEC.: 305-308, respectivamente. En algunos casos, el anticuerpo anti-CD3 puede constar de un dominio de VH incluyendo una secuencia de aminoácidos con al menos una identidad de secuencia del 90% (p. ej., con una identidad de secuencia de al menos el 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%) con, o la secuencia de, N.° de ID de SEC.: 184 y/o un dominio de VL que consta de una secuencia de aminoácidos con al menos una identidad de secuencia del 90% (p. ej., con una identidad de secuencia de al menos el 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%) con, o la secuencia de, N.° de ID de SEC.: 185. En otros casos, el anticuerpo de anti-CD3 contiene al menos una (por ejemplo, 1, 2, 3, o 4) de las regiones del marco de las cadenas pesadas FR-H1, FR-H2, FR-H3, y FR-H4 que consiste en las secuencias de N.º de ID de SEC.: 293-296, respectivamente, y/o al menos una (por ejemplo, 1, 2, 3, o 4) de las regiones del marco de la cadena liviana FR-L1, FR-L2, FR-L3, y FR-L4 que consiste en las secuencias de N.º de ID de SEC.: 297-300, respectivamente. En algunos casos, el anticuerpo anti-CD3 puede constar de un dominio de VH incluyendo una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una identidad de secuencia del 90% (p. ej., con una identidad de secuencia de al menos el 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%) con, o la secuencia de, N.° de ID de SEC.: 186 y/o un dominio de VL que consta de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una identidad de secuencia del 90% (p. ej., con una identidad de secuencia de al menos el 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%,

98% o 99%) con, o la secuencia de, N.° de ID de SEC.: 187. En una situación particular, el anticuerpo anti-CD3 puede ser 40G5c, o un derivado o anticuerpo clonal del mismo.

En otro aspecto, un anticuerpo de la invención comprende (a) un dominio VH que incluye al menos uno, al menos dos o las tres secuencias RHV VH seleccionadas a partir de (i) una RHV-H1 que consta de una secuencia de aminoácidos con N.° de ID de SEC.: 1, (ii) una RHV-H2 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 2, y (iii) RHV-H3 que consta de una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del N.° de ID SEC.: 3; y (b) un dominio VH que incluye al menos uno, al menos dos o las tres secuencias RHV VH seleccionadas a partir de (i) una RHV-L1 que consta de una secuencia de aminoácidos con N.° de ID de SEC.: 4; (ii) una RHV-L2 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 5, y (iii) una RHV-L3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 6. En algunos casos, el anticuerpo anti-CD3 puede tener un dominio de VH que consta de una secuencia de aminoácidos con N.° de ID de SEC.: 184 y un dominio de VL que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 185. En algunos casos, el anticuerpo anti-CD3 puede tener un dominio de VH que consta de una secuencia de aminoácidos con N.° de ID de SEC.: 186 y un dominio de VL que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 187. En una situación particular, el anticuerpo anti-CD3 puede ser 40G5c, o un derivado o anticuerpo clonal del mismo.

En cualquiera de las versiones mencionadas anteriormente, se humaniza un anticuerpo anti-CD3. En una versión, un anticuerpo anti-CD3 incluye unas RHV como en cualquiera de las versiones anteriores. Además, abarca un marco receptor, p.ej. un marco de inmunoglubina humana o un marco de consenso humano.

En otro aspecto, se producen anticuerpos anti-CD3, en donde el anticuerpo abarca un VH como en todas las versiones provistas anteriormente, y un VL como en todas las versiones previas, en las que una o ambas secuencias de dominio variable incluyen modificaciones pos-traduccionales.

Otro rasgo indica que la invención produce un anticuerpo que se une al mismo epítope como un anticuerpo anti-CD3 provisto anteriormente. Por ejemplo, en ciertas versiones, se produce un anticuerpo que se une al mismo epítope que un anticuerpo anti-CD3 incluyendo un N.° de secuencia VH de ID de SEC.: 184 y un N.° de secuencia VL de ID de SEC.: 185. En ciertas versiones, se provee un anticuerpo que se une a un epítope dentro de un fragmento de CD3 (p.ej. CD3ε de humano), que consiste en aminoácidos 1-26 (N.° de ID de SEC.: 283) o 1-27 (N.º de ID de SEC.: 278) de la cadena CD3ε de humano.

En otro aspecto, la invención produce un anticuerpo que se une con un epítope CD3 único. En ciertas representaciones, el anticuerpo anti-CD3 de la invención hace un contacto único con aminoácidos de CD3ε de humano a una distancia de 3,5 ángstroms; 3,25 ángstroms; 3,00 ángstroms; 2,75 ángstroms, o menos. En algunas representaciones, se proporciona un anticuerpo que se une a un epítope que consta de uno, dos, tres, cuatro o cinco aminoácidos de CD3ε de humano a una distancia de 3,5 ángstroms; 3,25 ángstroms; 3,00 ángstroms; 2,75 ángstroms, o menos. En una versión, el anticuerpo anti-

CD3 de la invención entra en contacto únicamente con aminoácidos de CD3ε a una distancia de 3,5 ángstroms o menos. En ciertas versiones, se provee un anticuerpo que se une a un epítope comprendiendo uno, dos, tres, cuatro o cinco aminoácidos de la cadena CD3ε de humano a una distancia de 3,5 ángstroms o menos. Por ejemplo, en ciertas versiones, se provee un anticuerpo que se une a un epítope que consiste en aminoácidos de la cadena CD3ε de humano seleccionado de GIn1, Asp2, Asn4, Glu6 y Met7. En una versión en particular, en anticuerpo anti-CD3 se une a un epítope que incluye Glu6 específicamente. En otras versiones particulares, se provee un anticuerpo que no se une a un epítope que incluye aminoácido Glu5 de la cadena CD3ε de humano. En otras versiones particulares, se provee un anticuerpo que no se une a un epítope que incluye aminoácidos Gly3 y Glu5 de la cadena CD3ε de humano.

Se puede determinar un epítope anti-CD3 por un anticuerpo anti-CD3 unido a fragmentos péptídicos del epítope. Alternativamente, un epítope anti-CD3 mediante puede determinarse mediante mutagénesis por escaneo de alanina. En una representación, una reducción en la unión de un anticuerpo anti-CD3 a un CD3 mutado por un porcentaje de 20%, 30%, 50%, 80% o más indica que el residuo del aminoácido del CD3 mutado en un ensayo de mutagénesis por escaneo de alanina es un residuo de epítipe para ese anticuerpo anti-CD3. Alternativamente, un epítope anti-CD3 puede determinarse mediante espectrometría de masas. En algunas versiones, el epítope se determina por cristalografía (por ejemplo, métodos cristalográficos descriptos en los Ejemplos).

En algunas versiones, el epítope, tal como se establece por cristalografía, se determina utilizando aminoácidos Q1-M7 de CD3. En algunas versiones, el epítope, tal como se establece por cristalografía, se determina utilizando aminoácidos QDGNEEMGGITQTPYK (N.° de ID de SEC.: 284) de CD3.

En algunas versiones, el epítope, tal como se estableció por cristalografía, puede llevarse a cabo combinando el anticuerpo anti-CD3 Fab, disuelto en 0,15 m de NaCl, 25 mM tris, pH de 7,5 en 10 mg/mL, con un exceso molar del doble (1 mg) del péptido del complejo CD3ε y detectando inicialmente una matriz dispersa de precipitantes en un formato de difusión de vapor. Los cristales optimizados pueden desarrollarse en una mezcla 1:1 con una solución de depósito con 70% de v/v de metilpentano, y 0,1 m de tampón HEPES a un pH de 7,5. El depósito puede utilizarse como crioprotector. Los cristales pueden transferirse a temperatura criogénica por inmersión súbita en nitrógeno líquido.

Los datos de difracción de cristales pueden recopilarse en línea de haz del Advanced Photon Source 22ID, utilizando un detector CCD MAR300. Las defracciones registradas pueden integrarse y ampliarse utilizando el programa HKL2000.

La estructura puede escalonarse por el método de reemplazo molecular (MR) utilizando el programa Phaser. Por ejemplo, el modelo de búsqueda de MR es una sub-unidad Fab derivada de una estructura cristalina del complejo HGFA/Fab (código PDB: 2R0L). El péptido de complejo CD3ε se desarrolla en la estructura basada en un mapa Fo-Fc. Como consecuencia, la estructura puede refinarse utilizando los programas REFMAC5 y

PHENIX, implementando las funciones objetivo de probabilidad, el método de refinamiento de factor-B individual anisotrópico y el método de refinamiento TLS, para lograr la convergencia.

En otras versiones particulares, se produce un anticuerpo que incluye un paratopo que se une al mismo epítope que un anticuerpo anti-CD3 incluido en el presente. Por ejemplo, en ciertas versiones, se desarrolla un anticuerpo que se une al mismo epítope que un parotopo de anticuerpos anti-CD3 incluyendo aminoácidos que toman contacto a una distancia de 3,5 ángstroms o menos. En ciertas versiones, se provee un anticuerpo que se une al mismo epítope que un paratopo de anticuerpo anti-CD3 que consiste en aminoácidos de la región VH del anticuerpo anti-CD3 seleccionado del grupo, incluyendo 33Tyr, 35His, 50Trp, 97Tyr y 98Ser. En ciertas versiones, se provee un anticuerpo que se une al mismo epítope que un paratopo de anticuerpo anti-CD3, que consiste en uno, dos, tres, cuatro o cinco aminoácidos de la región VH de un anticuerpo anti-CD3 seleccionado del grupo que incluye 33Tyr, 35His, 50Trp, 97Tyr y 98Ser. En ciertas versiones, se provee un anticuerpo que se une al mismo epítope que un paratopo de anticuerpo anti-CD3, que consiste en aminoácidos de la región VL de un anticuerpo anti-CD3 seleccionado del grupo, incluyendo 27Arg, 27Asn, 30Lys, 32Tyr y 92Phe, 94Leu y 96Arg. En ciertas versiones, se provee un anticuerpo que se une al mismo epítope que un paratopo de anticuerpo anti-CD3, que consiste en uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete aminoácidos de la región VL de un anticuerpo anti-CD3 seleccionado del grupo, incluyendo 27Arg, 27Asn, 30Lys, 32Tyr, 92Phe, 94Leu y 96Arg. En una versión opcional, se proporciona un anticuerpo que no se une al mismo epítope que un paratopo de anticuerpo anti-CD3, el cual consta de aminoácidos de la región VL, incluyendo 91Ser. Un aspecto adicional de la invención indica que, de acuerdo a cualquiera de las versiones mencionadas anteriormente, un anticuerpo anti-CD3 es un anticuerpo monoclonal que consiste en un anticuerpo humano, humanizado o quimérico. En una versión, un anticuerpo anti-CD3 es un fragmento de anticuerpo, por ejemplo: un Fv, Fab, Fab', scFv, diacuerpo, o un fragmento de $F(ab')_2$. En otra versión, el anticuerpo es de largo completo, es decir, un anticuerpo IgG intacto (por ej: un anticuerpo IgG1 intacto) u otra clase anticuerpo o isotopo según lo aquí contemplado.

Como aspecto adicional, de acuerdo a cualquiera de las versiones mencionadas anteriormente, un anticuerpo anti-CD3 puede incorporar cualquiera de estas características, individualmente o en combinación, tal como se describe en las Secciones 1-7 debajo.

1. Afinidad del Anticuerpo

En determinadas representaciones, un anticuerpo provisto aquí tiene una constante de disociación (Kd) de ≤1μM, ≤ 100 nm, ≤10 nm, ≤1 nm, ≤0,1 nm, ≤0,01 nm, o ≤ 0,001 nm (p. ej.: 10^{-8} M o menos, p. ej.: de 10^{-8}M a 10^{-13} M, p. ej.: de 10^{-9}M a 10^{-13} M).

En una representación, Kd se mide con un ensayo de unión de antígenos radiomarcados (RIA). En una representación, se lleva a cabo un RIA junto con la versión Fab de un

anticuerpo de interés y su antígeno. Por ejemplo, la afinidad de unión de la solución de Fabs para antígenos se mide equilibrando Fab con una concentración mínima de un antígeno marcado (^{125}I) en presencia de una titulación en serie de antígenos sin marcar y capturando antígenos unidos con una placa recubierta de anticuerpos anti-Fab (ver, p.ej., Chen et ál., *J. Mol. Biol.* 293:865-881(1999)). Con el fin de establecer las condiciones para el ensayo, las placas de pozo múltiple MICROTITER® (termo-científicas) son cubiertas durante la noche con 5 ug/mL de anticuerpos anti-Fab de captura (Laboratorios Cappel) en 50 mM de carbonato de sodio (pH de 9,6), y consecutivamente bloqueadas con 2% de Albúmina del Suero Bovino (p/p) en PBS entre dos y cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23°C). En el caso de una placa no absorbente (Nunc #269620), los antígenos [^{125}I] de 100 pM o 26 pM se mezclan con diluciones en serie de un Fab de interés (p. ej. consistentes con la evaluación del anticuerpo anti-VEGF, Fab-12, en Presta et ál., *Cancer Res.* 57:4593-4599 (1997)). Luego, el Fab de interés se incuba toda la noche; sin embargo, el proceso de incubación puede continuar por un período más largo (p.ej de aproximadamente 65 horas) para garantizar que se alcance el equilibrio. Posteriormente, las mezclas se transfieren a la placa capturadora para ser incubadas a temperatura ambiente (p.ej. durante una hora). Luego, se quita la solución y se enjuaga la placa ocho veces con 0,1% de polisorbato 20 (TWEEN-20®) en PBS. Cuando las placas están secas, se agregan 150 µl/pozo de centelleo (MICROSCINT-20 ™; Packard), y las placas se recuentan con un contador gama TOPCOUNT ™ (Packard) durante diez minutos. Las concentraciones de cada Fab que proporcionan 20% de unión máxima o menos son seleccionadas para implementarlos en ensayos de unión competitivos.

De acuerdo a otra representación, se mide la Kd utilizando un ensayo de resonancia plasmónica de superficie BIACORE® Por ejemplo, un ensayo que utiliza BIACORE®-2000 o un BIACORE ®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) se realiza a 25°C con chips CM5 de antígenos inmovilizados a ~10 unidades de respuesta (RU). En una representación, los chips de biosensores de dextrano carboximetilado (CM5, BIACORE, Inc.), se activan con *N*-etil-*N'*- (3-dimetilaminopropilamina)-hidrocloruro de carbodiimida (EDC) y *N-hidroxisuccinimida* (NHS) conforme a las instrucciones del proveedor. El antígeno se diluye con 10 mM de acetato de sodio, pH de 4,8, a 5 µg/ml (~0,2 µM) antes de inyectar a una velocidad de flujo de 5 µl/minuto para conseguir aproximadamente 10 unidades de respuesta (RU) de proteínas unidas. Luego de la inyección en el antígeno, se inyecta 1 M de etanolamina a los grupos no reaccionados de bloqueo. En el caso de mediciones cinéticas, se inyectan diluciones en serie de Fab duplicadas (0,78 nM a 500 nM9 en PBS con 0,05% de polisorbato 20 (TWEEN-20™) surfactante (PBST) a 25°C en una velocidad de flujo de aproximadamente 25 µl/min. Las tasas de asociación (k_{on}) y disociación (k_{off}) se calculan utilizando un modelo de unión Langmuir simple individual (BIACORE ® Evaluation Software- versión 3.2), adaptando simultáneamente los sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación de equilibrio (Kd) se calcula como la proporción k_{on}/k_{off}. Ver, por ejemplo, Chen et ál., *J. Mol. Biol.* 293:865-881 (1999). Si la constante de asociación excede$10^6 M^{-1} s^{-1}$ del ensayo de

resonancia plasmónica de superficie mencionado anteriormente, la constante de asociación puede determinarse utilizando una técnica de enfriamiento fluorescente que mide el aumento o disminución en la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, paso de banda de 16 nm) a 25°C de un anticuerpo anti-antígeno de 20 nM (forma Fáb) en PBS, pH de 7,2 en presencia de crecientes concentraciones de antígeno medidas en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro equipado por el método de parada de flujo (instrumentos Aviv) o un espectrofotómetro SLM-AMINCO TM (TermoEspectrónico) de serie 8000 con una cubeta revuelta.

2. Fragmentos de anticuerpos

En determinadas representaciones, un anticuerpo provisto en el presente es el fragmento de un anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpos incluyen pero no se limitan a fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')2, Fv y scFv, y otros fragmentos que se describen a continuación. Para una revisión de ciertos fragmentos de anticuerpos, vea Hudson et al. *Nat. Med.* 9:129-134 (2003). Para una revisión de los fragmentos scFv, vea, p. ej., Pluckthün, en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., (Springer-Verlag, Nueva York), págs. 269-315 (1994); vea también WO 93/16185; y las patentes de EE.UU. N.° 5.571.894 y 5.587.458. Para una discusión de los fragmentos Fab y F(ab')2 que comprenden los residuos epítopos de unión con el receptor de recuperación y que aumentaron la vida media in vivo, vea la patente de EE.UU. N.° 5.869.046).

Los diacuerpos son fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión de antígenos que pueden ser bivalentes o biespecíficos. Vea, por ejemplo, EP 404,097; WO 1993/01161; Hudson et al. *Nat. Med.* 9:129-134 (2003); y Hollinger et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993). Los tricuerpos y tetracuerpos también se describen en Hudson et al. *Nat. Med.* 9:129-134 (2003).

Los anticuerpos de un solo dominio son fragmentos de anticuerpos que comprenden todo el dominio variable de una cadena pesada o una parte de él o todo el dominio de una cadena liviana de un anticuerpo o una parte de él. En ciertas representaciones, un anticuerpo de un solo dominio es un anticuerpo humano de un solo dominio (Domantis, Inc., Waltham, MA; vea, p. ej., la patente de EE.UU. N.° 6.248.516 B1).

Los fragmentos de anticuerpos se pueden hacer mediante diversas técnicas, que incluyen pero no se limitan a la digestión proteolítica de anticuerpos intactos, así como la producción de células anfitrionas recombinantes (p. ej. E. coli o fago), tal como se describe en este documento.

3. Anticuerpos quiméricos y humanizados

En determinadas representaciones, un anticuerpo provisto en el presente es un anticuerpo quimérico. Se describen ciertos anticuerpos quiméricos, p. ej., en la patente de EE.UU. N.° 4.816.567; y Morrison et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855

(1984)). En un ejemplo, un anticuerpo quimérico consta de una región variable no humana (p. ej., una región variable derivada de un ratón, una rata, un hámster, un conejo, o un primate no humano, como un mono) y una región constante humana. En otro ejemplo, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo con conmutación de clase en el que la clase o subclase se ha modificado respecto de la del anticuerpo primario. Los anticuerpos quiméricos incluyen fragmentos de unión de antígenos de los mismos.

En determinadas representaciones, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo humanizado. Generalmente, un anticuerpo no humano es humanizado para reducir la inmunogenicidad a los seres humanos, al tiempo que mantiene la especificidad y afinidad del anticuerpo parental no humano. Por lo general, un anticuerpo humanizado consta de uno o más dominios variables en los que las HVR, p. ej., las CDR (o partes de las mismas) derivan de un anticuerpo no humano, y las FR (o partes de las mismas) derivan de secuencias de anticuerpos humanos. Un anticuerpo humanizado opcionalmente puede abarcar al menos una porción de una región constante humana. En algunas representaciones, algunos residuos de la FR en un anticuerpo humanizado se sustituyen con los correspondientes residuos de un anticuerpo no humano (p. ej., el anticuerpo del que derivan los residuos de la HVR), p. ej., para restaurar o mejorar la especificidad o afinidad de los anticuerpos.

Los anticuerpos humanizados y los métodos para hacerlos se revisan p. ej., en Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008), y se describen, p. ej., en Riechmann et al*., Nature* 332:323-329 (1988); Queen et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86:10029-10033 (1989); las patentes de EE.UU. N.° 5.821.337, 7.527.791, 6.982.321, y 7.087.409; Kashmiri *et al*., *Methods* 36:25-34 (2005) (describen la región que determina la especificidad [SDR]); Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489-498 (1991) (describe "recubrimiento"); Dall'Acqua et al., *Methods* 36:43-60 (2005) (describe "intercambio de FR"); y Osbourn et al., *Methods* 36:61-68 (2005) y Klimka et al., *Br. J. Cancer*, 83:252-260 (2000) (describe el enfoque de "selección guiada" al intercambio de FR).

Las regiones de estructura humana que pueden ser utilizadas para humanización incluyen, pero no se limitan a: regiones del marco seleccionadas utilizando el método "más adecuado" (vea, p. ej., Sims et al. *J. Immunol.* 151:2296 (1993)); regiones del marco derivadas de la secuencia de consenso de anticuerpos humanos de un subgrupo particular de regiones variables de cadena pesada o liviana (vea p. ej., Carter et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); y Presta et al. *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)); regiones del marco humanas maduras (mutadas somáticamente) o regiones del marco germinal humano (vea p. ej., Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)); y regiones del marco derivadas de genotecas de FR de detección (vea p. ej., Baca et al., *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684 (1997) y Rosok et al., *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618 (1996)).

4. Anticuerpos humanos

En determinadas representaciones, un anticuerpo provisto en el presente es un

anticuerpo humano. Los anticuerpos humanos pueden producirse mediante el uso de varias técnicas conocidas en la materia. Los anticuerpos humanos se describen a grandes rasgos en van Dijk y van de Winkel, *Curr. Opin. Farmacol.* 5: 368-74 (2001) y Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20:450-459 (2008).

Los anticuerpos humanos pueden ser preparados mediante la administración de un inmunógeno a un animal transgénico que haya sido modificado para producir anticuerpos humanos intactos o anticuerpos intactos con regiones variables humanas en respuesta a un desafío antigénico. Estos animales suelen contener la inmunoglobulina humana loci, o una parte de ella, que sustituye a la inmunoglobulina loci endógena, o que se presenta extracromosomalmente o se integra de forma aleatoria en los cromosomas del animal. En estos ratones transgénicos, la inmunoglobulina endógena loci generalmente ha sido inactivada. Para la revisión de los métodos para la obtención de anticuerpos humanos de animales transgénicos, vea Lonberg, Nat. *Biotech.* 23:1117-1125 (2005). Vea también, p. ej., las patentes de EE.UU. N.° 6.075.181 y 6.150.584 que describen la tecnología XENOMOUSETM; la patente de EE.UU. N.° 5.770.429 que describe la tecnología HuMab®; la patente de EE.UU. N.° 7.041.870 que describe la tecnología K-M MOUSE® y la publicación de presentación de patente de EE.UU. N.° 2007/0061900, que describe la tecnología VelociMouse®). Las regiones variables humanas de anticuerpos intactos generados por estos animales pueden sufrir más modificaciones, p. ej., combinándolas con una región constante humana diferente.

Los anticuerpos humanos también pueden hacerse por métodos basados en hibridomas. También se han descrito las líneas celulares de mieloma humano y heteromielona humano-ratón para la producción de anticuerpos monoclonales humanos. (Vea, p. ej., Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pág. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987); y Boerner et al., *J. Immunol*., 147: 86 (1991).) Los anticuerpos humanos generados mediante la tecnología de hibridomas de células B humanas también se describen en Li et al*., Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006). Otros métodos incluyen los descritos, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N.° 7.189.826 (que describe la producción de anticuerpos IgM monoclonales humanos de líneas celulares hibridomas) y Ni, *Xiandai Mianyixue*, 26(4):265-268 (2006) (que describe los hibridomas humanos-humanos). La tecnología de hibridomas humanos (tecnología Trioma) también se describe en Vollmers and Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005) y Vollmers and Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3):185-91 (2005).

Los anticuerpos humanos también pueden generarse aislando secuencias de dominio variable de clones Fv seleccionados de genotecas de exhibición de fagos derivados de humanos. Tales secuencias de dominio variable pueden combinarse con un dominio constante humano deseado. A continuación se describen las técnicas para la selección de anticuerpos humanos de genotecas de anticuerpos.

5. Anticuerpos derivados de genotecas

Los anticuerpos de la invención pueden ser aislados seleccionando genotecas combinatorias de anticuerpos con la actividad o las actividades deseadas. Por ejemplo, una variedad de métodos son conocidos en la materia por generar genotecas de exhibición de fagos y seleccionar esas genotecas para los anticuerpos que reúnan las características de unión deseadas. Se revisan tales métodos, p. ej., en Hoogenboom et al. en *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) y se describen p. ej., en the McCafferty et al., *Nature* 348:552-554; Clackson et al., *Nature* 352: 624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Marks and Bradbury, en *Methods in Molecular Biology* 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004); and Lee et al., *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132(2004).

En ciertos métodos de exhibición de fagos, repertorios de genes de VH y VL son clonados por separado mediante reacción en cadena de polimerasa (PCR) y recombinados aleatoriamente en las genotecas de fagos, que luego pueden ser examinadas para fagos de unión de antígenos tal como se describe en Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Generalmente, los fagos presentan fragmentos de anticuerpos, ya sea fragmentos de cadena simple Fv (scFv) o fragmentos Fab. Las genotecas de fuentes inmunizadas proporcionan anticuerpos de alta afinidad al inmunógeno sin el requisito de desarrollo de hibridomas. Por otra parte, el repertorio no tratado previamente puede clonarse (p. ej., del ser humano) para proporcionar una fuente única de anticuerpos a una amplia variedad de antígenos propios y no propios sin ningún tipo de inmunización, tal como se describe en Griffiths et al., EMBO J, 12: 725-734 (1993). Finalmente, las genotecas no tratadas previamente pueden también hacerse sintéticamente por clonación de los segmentos no reordenados del gen V de las células madre y usando los iniciadores de PCR que contienen una secuencia aleatoria para codificar las regiones CDR3 altamente variables y lograr un reordenamiento in vitro, tal como se describe en Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992). Las publicaciones de patentes que describen las genotecas de fagos de anticuerpos humanos incluyen, por ejemplo: patente de EE.UU N.° 5.750.373, y las patentes de publicación de EE.UU N.° 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936, y 2009/0002360.

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos aislados de las genotecas de anticuerpos humanos se consideran anticuerpos humanos o fragmentos de anticuerpos humanos en este documento.

6. Anticuerpos multiespecíficos

En cualquiera de los aspectos anteriores, el anticuerpo anti-CD3 que se proporciona en este documento, por ejemplo, es un anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos

multiespecíficos son anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión para al menos dos sitios diferentes. En ciertas representaciones, los anticuerpos biespecíficos pueden unirse a dos epítopes diferentes de CD3 (p. ej., CD3ε o CD3γ). En ciertas representaciones, una de las especificidades de unión es para CD3 (p. ej., CD3ε o CD3γ) y la otra es para cualquier otro antígeno (p. ej., una segunda molécula biológica, p. ej., un antígeno celular de superficie, p. ej., un antígeno tumoral). Por consiguiente, un anticuerpo biespecífico anti-CD3 puede tener especificidades de unión para CD3 y una segunda molécula biológica, como una segunda molécula biológica (p. ej., un antígeno tumoral) incluido en la tabla 1 y descrito en la publicación de EE.UU. N.° 2010/0111856.

TABLA 1. Receptores de los antígenos tumorales de los anticuerpos biespecíficos anti-CD3 de la invención

CD20	CD79a	ETBR	IL13Ralpha 2	M-CSF	P2X5	SSX-2
0772P	CD79b	proteína de fusión ETV6-AML1	IL20Rα	MCSP	p53	SSX-4
adipofilina	Cdc27	EZH2	carboxilesterasa intestinal	mdm-2	PAP	STEAP1
AIM-2	CDK4	FcRH1	IRTA2	MDP	PAX5	STEAP1
ALDH1A1	CDKN2A	FcRH2	Calicreína 4	ME1	PBF	STEAP2
alfa actinina 4	CEA	FcRH5	KIF20A	Melan-A / MART-1	PMEL17	survivina
alfafetoproteína	CLL1	FLT3-ITD	KK-LC-1	Meloe	proteína de fusión pml-RARalpha	proteína de fusión SYT-SSX1 o -SSX2
B7-H4	Cw6	GDNF-Ra1	Lengsin	MSG783	PSMA	TGF-betaRII
BAFF-R	CXCR5	GEDA	LGR5	MUC1	PTPRK	TMEFF1
BAGE-1	CXORF61	GFRA1	LY64	MUC5AC	RAB38 / NY-MEL-1	TMEM118
BCLX (L)	ciclina D1	glipicano-3	Ly6E	mucina	RAGE-1	TMEM46
Proteína	Ciclina	GnTVf	Ly6G6D	MUM-1f	RBAF600	TRAG-3

CD22	EpCAM	HERV-K-MEL	MAGE-A9	NY-BR-1	SIRT2	XAGE-1b/GAGED2a
CD33	EphA3	HLA-DOB	MAGE-C1	NY-ESO-1/LAGE-2	SLC35D3	EGFR-T790M;
CD45	EphB2R	hsp70-2	MAGE-C2	OA1	SNRPD1	BMPR1B
CD70	Epiregulin	IDO1	mamaglobin a-A	OGT	SOX10	
CD72	EGFR	IGF2B3	MART2	OS-9	Sp17	
EGFR-G719A	EGFR-G719C;	EGFR-G719S;	EGFR-L858R	EGFR-S768I	EGFR-L861Q	

para CD3 y una segunda molécula biológica que comprende un complejo HLA-péptido seleccionado del grupo constituido por 0772P (CA125, MUC16; GenBank n.° de adhesión AF36148); adipofilina (Perilipina-2, proteína relacionada con la diferenciación adiposa, ADRP, ADFP, MGC10598; secuencia de referencia NCBI: NP_001113.2); AIM-2 (ausente en melanoma 2, PYHIN4, proteína inducible por interferón AIM2; secuencia de referencia NCBI: NP_004824.1); ALDH1A1 (aldehido deshidrogenasa familia 1, miembro A1,

ALDH1, PUMB1, retinaldehido deshidrogenasa 1, ALDC, ALDH-E1, ALHDII, RALDH 1, CE 1.2.1.36, ALDH11, HEL-9 HEL-S-53e, HEL12, RALDH1, acetaldehido deshidrogenasa 1, aldehido deshidrogenasa 1, soluble, aldehido deshidrogenasa, hígado citosólico, ALDH clase 1, proteína luminal epidídimo 12, proteína luminal epidídimo 9, proteína de unión del esperma secretora del epidídimo Li 53e, retinal deshidrogenasa 1, RalDH1, aldehido deshidrogenasa familia 1 miembro A1, aldehido deshidrogenasa, citosólica, CE 1.2.1; secuencia de referencia NCBI: NP_000680.2); alfa-actinina-4 (ACTN4 actinina, Alfa 4, FSGS1, 1 de glomeruloesclerosis segmentaria focal, alfa-actinina 4 no muscular, proteína de unión cruzada F-actina, FSGS, actinina-4, actinina Alpha4 isoforma, alfa-actinina-4; secuencia de referencia NCBI: NP_004915.2); alfa-fetoproteína (AFP, HPAFP, FETA, alfa-1-fetoproteína, alfa-fetoglobulina, alfa-1-fetoproteína, alfa-fetoglobulina, HP; GenBank: AAB58754.1); Anfiregulina (AREG, SDGF, Factor de crecimiento derivado de schwanoma, factor de crecimiento derivado de las células del colorecto, AR, CRDGF; GenBank: AAA51781.1); ARTC1 (ART1, ADP-Ribosiltransferasa 1, Mono (ADP-ribosil) transferasa 1, ADP-Ribosiltransferasa C2 y C3 tipo toxina 1, ART2, CD296, RT6, ADP-Ribosiltransferasa 2, NAD ligado a GPI (+)--arginina ADP-Ribosiltransferasa 1, EC 2.4.2.31, antígeno de CD296; NP); ASLG659; ASPHD1 (aspartato beta-hidroxilasa que contiene 1 dominio, aspartato beta-hidroxilasa que contiene dominio de proteína 1, EC 1.14.11.-, EC 1.14.11; GenBank: AAI44153.1); B7-H4 (VTCN1, inhibidor de activación de células T 1 que contiene dominio V-Set, B7H4, miembro de la superfamilia B7 1, proteína inmunitaria coestimuladora B7-H4, B7h.5, molécula coestimuladora de células T B7x, B7S1, B7X, VCTN1, H4, B7 miembro de la familia, PRO1291, B7 miembro de la familia, H4, molécula coestimuladora de células T B7x, inhibidor de activación de células T 1 que contiene dominio V-Set, proteína B7S1; GenBank: AAZ17406.1); BAFF-R (TNFRSF13C, superfamilia de receptores de factor de necrosis tumoral, miembro 13C, BAFFR, receptor del factor de activación de células B, receptor BAFF, receptor 3 BLyS, CVID4, BROMIX, CD268, receptor del factor de activación de células B, prolixin, miembro de la superfamilia receptora del factor de necrosis tumoral 13C, BR3, antígeno de CD268; secuencia de referencia NCBI: NP_443177.1); BAGE-1; BCLX (L); proteína de fusión BCR-ABL (b3a2); beta-catenina (CTNNB1 catenina (proteína asociada a la caderina), Beta 1, 88kDa, CTNNB, MRD19, catenina (proteína asociada a la caderina), Beta 1 (88kD), armadillo, beta catenina-1; GenBank: CAA61107.1); BING-4 (WDR46, WD repetir dominio 46, C6orf11, BING4, proteína BING4 con repetición de WD, cromosoma 6 marco abierto de lectura 11, FP221, UTP7, proteína 46 con repetición de WD; NP); BMPR1B (receptor tipo IB de proteínas morfogenéticas de hueso, acceso de Genbank n.º NM_00120; NP); B-RAF (Brevican (BCAN, BEHAB, acceso de Genbank n.º AF22905); Brevican (BCAN proteoglicano Condroitín sulfato 7, proteína de unión Hyaluronan enriquecida cerebro, BEHAB, CSPG7, Brevican de proteoglicanos, proteína base Brevican, sulfato de condroitina Proteoglycan BEHAB; GenBank: AAH27971.1); CALCA (polipéptido alfa relacionado a polipéptido, CALC1, calcitonina 1, calcitonina, alfa-tipo CGRP, péptido Calcitonin relacionado al gen I, CGRP-I, CGRP, CGRP1, CT, KC, polipéptido

relacionados con calcitonina y calcitonina, alfa, katacalcin; NP); CASP-5 (CASP5, caspasa 5, cisteína peptidasa relacionada a apoptosis, caspasa 5, cisteína-proteasa relacionada a apoptosis, proteasa ICH-3, proteasa TY, ICE (rel)-III, III ICE (rel), ICEREL-III, ICH-3, caspasa-5, TY proteasa, CE 3.4.22.58, ICH3, EC 3.4.22; NP); CASP-8; CD19 (CD19 - antígeno del linfocito b CD19 isoforma 2 precursor, B4, CVID3 [Homo sapiens], secuencia de referencia NCBI: NP_001761.3); CD20 (CD20 - antígeno de linfocitos b CD20, 4-dominios que atraviesan la membrana, subfamilia A, miembro 1, B1, Bp35, CD20, CVID5, LEU-16, MS4A2, S7; Secuencia de Referencia NCBI: NP_690605.1); CD21 (CD21 (CR2 (receptor de complemento o C3DR (receptor de C3d/Epstein Barr virus) o acceso de Genbank Hs.73792 n.º M2600); (CD22 (B-célula receptor CD22-B isoforma, BL-CAM Lyb-8, Lyb8, SIGLEC-2, FLJ22814, acceso de Genbank n.º AK02646); CD22; CD33 (molécula CD33, antígeno CD33 (Gp67), ácido siálico vinculante Ig-símil lectina 3, ácido siálico vinculante Ig-símil lectina 3, SIGLEC3, gp67, SIGLEC-3, células mieloides superficie antígeno CD33, p67, Siglec-3, antígeno CD33; GenBank: AAH28152.1); CD45; CD70 (CD70 - superfamilia de factores de necrosis tumoral (ligando) miembro 7; antígeno de superficie CD70; Antígeno Ki-24; CD27 Ligando; CD27-L; miembro de la superfamilia de tumor necrosis factor ligand 7; NCBI secuencia de referencia para la especie homo sapiens: NP_001243.1); CD72 (CD72 (antígeno de diferenciación celular B CD72, Lyb-; 359 aa, pI: 8.66, MW: 40225 TM: 1 [P] Cromosoma del gen: 9p13.3, acceso de Genbank n.º NP_001773.); CD79a (CD79a (CD79A, CD79a, asociada a la inmunoglobulina alfa, una proteína específica de células B que covalentemente interactúa con beta Ig (CD79B) y forma un complejo en la superficie con las moléculas de Ig M, transmite una señal implicados en la diferenciación de células B), pI: 4.84, MW: 25028 TM: 2 [P] Cromosoma del gen: 19q13.2, acceso a Genbank n.º NP_001774.1); CD79b (CD79b (CD79B, CD79b, IGb (asociada a la inmunoglobulina beta), B29, acceso a Genbank n.º NM_000626 o 1103867); Cdc27 (ciclo de división celular 27, D0S1430E, D17S978E, subunidad 3 de complejo de promoción de anafase, subunidad 3 de complejo de promoción de anafase, ANAPC3, APC3, CDC27Hs, H-NUC, homólogo del CDC27, homólogo del ciclo 27 de división celular (S. Cerevisiae), HNUC, NUC2, complejo de promoción de anafase, proteína 3, homólogo del ciclo 27 de división celular, homólogo de proteína 27 del ciclo de división celular, homólogo del Nuc2; GenBank: AAH11656.1); Cdk4 (quinasa dependiente de ciclina 4, quinasa de proteína de división de células 4, PSK-J3, CE 2.7.11.22, CMM3, EC 2.7.11; Secuencia de Referencia NCBI: NP_000066.1); CDKN2A (Inhibidor 2A de quinasa dependiente de ciclina, MLM, CDKN2, MTS1, Inhibidor 2A de quinasa dependiente de ciclina (Melanoma, P16, Inhibe CDK4), Inhibidor A de quinasa 4 dependiente de ciclina, Supresor 1 de tumores múltiples, CDK4I, MTS-1, CMM2, P16, ARF, INK4, INK4A, P14, P14ARF, P16-INK4A, P16INK4, P16INK4A, P19, P19ARF, TP16, Inhibidor CDK4 P16-INK4, Reguladores beta negativos de ciclo celular, p14ARF, p16-INK4, p16-INK4a, p16INK4A, p19ARF; NP); CEA; CLL1 (CLL-1 (CLEC12A, MICL, y DCAL, codifica un miembro de la superfamilia de dominio lectina tipo C/similar a lectina tipo C (CTL/CTLD). Los miembros de esta familia comparten un pliegue proteico y tienen

distintas funciones, tales como adhesión de las células, señalización célula-célula, recambio de glucoproteína y funciones en la respuesta inflamatoria e inmune. La proteína codificada por este gen es una reguladora negativa de la función granulocito y monocito. Se han descrito variantes del transcrito de este gen con empalme alternativo, pero no se ha determinado la naturaleza en toda su extensión de algunas de estas variantes. El gen está relacionado de cerca con otros miembros de la superfamilia CTL/CTLD en la región del complejo de genes asesinos naturales en el cromosoma 12p13 (Drickamer K Curr. Opin. Struct. Biol. 9):585–90; van Rhenen A, et ál, Blood 110):2659–66; Chen CH, et ál. Blood 107):1459–67; Marshall AS, et ál. Eur. J. Immunol. 36):2159–69; Bakker AB, et ál Cancer Res. 64 :8443–50; Marshall AS, et ál J. Biol. Chem. 279 :14792–80. Se ha demostrado que CLL-1 es un receptor transmembrana de tipo 2 que comprende un único dominio similar a lectina tipo C (no se prevé que el mismo se una al calcio o al azúcar), la región del tallo, un dominio transmembrana y una cola citoplásmica corta que contiene un motivo ITIM); CLPP (Subunidad proteolítica de peptidasa de matriz mitocondrial caseinolítica, Endopeptidasa Clp, EC 3.4.21.92, PRLTS3, Proteasa ClpAP dependiente de ATP (E. Coli), Homólogo ClpP (Proteasa caseinolítica, Dependiente de ATP, Subunidad proteolítica, E. Coli), Peptidasa caseinolítica ClpP, Dependiente de ATP, Subunidad proteolítica homóloga (E. Coli), Proteasa caseinolítica ClpP, Dependiente de ATP, Subunidad proteolítica homóloga (E. Coli), humana, Subunidad proteolítica, Proteasa ClpAP dependiente de ATP, Subunidad proteolítica, Humana, Peptidasa caseinolítica ClpP dependiente de ATP, Subunidad proteolítica, Peptidasa caseionolítica ClpP, Dependiente de ATP, Subunidad proteolítica homóloga, Subunidad proteolítica de proteasa Clp dependiente de ATP putativo, Mitocondrial; NP); COA-1; CPSF; CRIPTO (CRIPTO (CR, CR1, CRGF, CRIPTO, TDGF1, factor de crecimiento derivado de teratocarcinoma, acceso de Genbank n.° NP_003203 o NM_00321); Cw6; CXCR5 CXCR5 (receptor 1 de linfoma de Burkitt, un receptor acoplado con proteína G que es activado por la quimioquina CXCL13, cumple funciones en la migración de linfocitos y defensa humoral, tiene un rol en la infección HIV-2 y quizás en desarrollo de SIDA, linfoma, mieloma y leucemia); 372 aa, pI: 8.54 MW: 41959 TM: 7 [P] Cromosoma del gen: 11q23.3, acceso Genbank n.° NP_001707.); CXORF61 CXORF61 - cromosoma X marco abierto de lectura 61[Homo sapiens], Referencia de secuencia NCBI: NP_001017978.1); ciclina D1 (CCND1, BCL1, PRAD1, D11S287E, CLL de células B/Linfoma 1, Proteína de linfoma 1 de células B, Oncogene BCL-1, Oncogene PRAD1, Ciclina D1 (PRAD1: Adenomatosis paratiroidea 1), Ciclina D1 específica de G1/S, Adenomatosis paratiroidea 1, U21B31, Ciclina D1 específica de G1/S, BCL-1; Referencia de secuencia NCBI : NP_444284.1); Ciclina-A1 (CCNA1, CT146, Ciclina A1; GenBank: AAH36346.1); proteína de fusión dek-can; DKK1 (Inhibidor 1 de vía de señalización Dickkopf WNT, SK, hDkk-1, Homólogo 1 Dickkopf (Xenopus Laevis), Homólogo Dickkopf 1 (Xenopus Laevis), DKK-1, Homólogo Dickkopf 1, Proteína 1 relacionada con Dickkopf, Símil Dickkopf-1, Proteína 1 símil Dickkopf, Proteína 1 relacionada con Dickkopf, Dickkopf-1, Dkk-1; GenBank: AAQ89364.1); DR1 (Regulador descendiente de transcrito 1, enlace TBP (Cofactor

negativo 2), Cofactor negativo 2-Beta, Fosfoproteína asociada con proteína con enlace TATA, NC2, NC2-BETA, Proteína Dr1, NC2-beta, Regulador descendiente de transcrito 1; Referencia de secuencia NCBI: NP_001929.1); DR13 (Complejo mayor de histocompatibilidad, Clase II, DR Beta 1, HLA-DR1B, DRw10, DW2.2/DR2.2, SS1, DRB1, HLA-DRB, Antígeno de histocompatibilidad HLA Clase II, Cadena DR-1 Beta, Antígeno de leucocito humano DRB1, Antígeno linfocito DRB1, Antígeno MHC Clase II, Cadena MHC Clase II HLA-DR Beta 1, Glucoproteína de superficie celular MHC Clase II HLA-DR, MHC Clase II HLA-DRw10-Beta, DR-1, DR-12, DR-13, DR-14, DR-16, DR-4, DR-5, DR-7, DR-8, DR-9, DR1, DR12, DR13, DR14, DR16, DR4, DR5, DR7, DR8, DR9, DRw11, DRw8, HLA-DRB2, Clon P2-Beta-3, Antígeno DRB1*1 MHC Clase II, Antígeno DRB1*10 MHC Clase II, Antígeno DRB1*11 MHC Clase II, Antígeno DRB1*12 MHC Clase II, Antígeno DRB1*13 MHC Clase II, Antígeno DRB1*14 MHC Clase II, Antígeno DRB1*15 MHC Clase II, Antígeno DRB1*16 MHC Clase II, Antígeno DRB1*3 MHC Clase II, Antígeno DRB1*4 MHC Clase II, Antígeno DRB1*7 MHC Clase II, Antígeno DRB1*8 MHC Clase II, Antígeno DRB1*9 MHC Clase II; NP); E16 (E16 (LAT1, SLC7A5, acceso Genbank n.° NM_00348); EDAR (EDAR - precursor EDAR miembro de la superfamilia de receptores de factor de necrosis de tumor, receptor EDA-A1; homólogo downless; receptor de ectodisplasina A; receptor de displasia ectodérmica; receptor 1 de ectodisplasina anhidrótica, DL; ECTD10A; ECTD10B; ED1R; ED3; ED5; EDA-A1R; EDA1R; EDA3; HRM1 [Homo sapiens]; Referencia de secuencia NCBI: NP_071731.1); EFTUD2 (Factor de elongación Tu GTP de enlace del dominio contenedor 2, Factor de elongación Tu GTP de enlace del dominio contenedor de proteína 2, hSNU114, Homólogo SNU114, Proteína específica de U5 SnRNP, 116 KDa, MFDGA, KIAA0031, 116 KD, Proteína específica de U5 SnRNP, Componente ribonucleico nuclear pequeño 116 KDa U5, MFDM, SNRNP116, Snrp116, Snu114, U5-116KD, SNRP116, U5-116 KDa; GenBank: AAH02360.1); EGFR (Receptor de factor de crecimiento epidérmico, ERBB, Proto-Oncogene C-ErbB-1, Receptor de tirosina-proteína quinasa ErbB-1, ERBB1, HER1, EC 2.7.10.1, Receptor de factor de crecimiento epidérmico (Leucemia eritroblástica aviar viral (V-Erb-B) Oncogene Homólogo), Leucemia eritroblástica viral (V-Erb-B) Oncogene Homólogo (Aviar), PIG61, Leucemia eritroblástica aviar viral (V-Erb-B) Oncogene Homólogo, Proteína 40 inhibidora de crecimiento celular, Proteína 61 de inducción de proliferación celular, mENA, EC 2.7.10; GenBank: AAH94761.1); EGFR-G719A ; EGFR-G719C; EGFR-G719S; EGFR-L858R; EGFR-L861Q; EGFR-S768I; EGFR-T790M; Factor de elongación 2 (EEF2, Factor de elongación 2 de traducción eucariota, EF2, Translocasa polipeptidilo-TRNA, EF-2, SCA26, EEF-2; Referencia de secuencia NCBI: NP_001952.1); ENAH (hMena) (Homólogo habilitado (Drosophila), MENA, Habilitado mamíferos, ENA, NDPP1, Homólogo habilitado de proteína; GenBank: AAH95481.1) – resultados sólo para “ENAH” y no “ENAH (hMena)”; EpCAM (Molécula de adhesión de células epiteliales, M4S1, MIC18, Transductor 1 de la señal de calcio asociado a tumores, TACSTD1, TROP1, Antígeno asociado a adenocarcinoma, Glucoproteína Trop-1 de superficie celular, Gruproteína epitelial 314, Proteína GA733-2 asociada a tumor gastrointestinal severo, EGP314, KSA, DIAR5,

HNPCC8, Antígeno identificado por anticuerpo monoclonal AUA1, EGP-2, EGP40, ESA, KS1/4, MK-1, Glucoproteína 2 epitelial humana, Componente de membrana, Cromosoma 4, Marcador superficial (35kD Glycoprotein), EGP, Ep-CAM, GA733-2, M1S2, CD326 Antígeno, Antígeno de superficie de células epiteliales, hEGP314, Antígeno KS 1/4, ACSTD1; GenBank: AAH14785.1); EphA3 (EPH Receptor A3, ETK1, ETK, TYRO4, HEK, Tirosina quinasa 1 símil Eph, Receptor ETK1 de tirosina-proteína quinasa, EK4, Quinasa 4 símil EPH, EC 2.7.10.1, EPHA3, HEK4, Receptor 3 efrina tipo A, Quinasa 1 de embrión humano, Proteína tirosina quinasa TYRO4, hEK4, Quinasa de embrión humano, Tirosina-proteína quinasa TYRO4, EC 2.7.10; GenBank: AAH63282.1); EphB2R ; Epirregulina (EREG, ER, proepirregulina; GenBank: AAI36405.1); ETBR (EDNRB, Receptor de endotelina tipo B, HSCR2, HSCR, Receptor de endotelina tipo no selectivo, ET-B, ET-BR, ETRB, ABCDS, WS4A, ETB, Receptor de endotelina B; NP); proteína de fusión ETV6-AML1; EZH2 (Potenciadora de zeste homólogo 2 (Drosophila), Lisina N-metiltransferasa 6, ENX-1, KMT6 EC 2.1.1.43, EZH1, WVS, Potenciadora de zeste homólogo 2 (Drosophila), ENX1, EZH2b, KMT6A, WVS2, Histona-lisina N-metiltransferasa EZH2, Potenciadora de zeste homólogo 2, EC 2.1.1; GenBank: AAH10858.1); FcRH1 (FCRL1, Símil receptor Fc 1, FCRH1, Receptor Fc homólogo 1, Proteína 1 símil FcR, Proteína 5 asociada a la translocación del receptor inmune, IFGP1, IRTA5, hIFGP1, Proteína 1 de familia IFGP, CD307a, Proteína 1 símil receptor Fc, Receptor Fc de superfamilia de inmunoglobulina, Gp42, FcRL1, Antígeno CD307a; GenBank: AAH33690.1); FcRH2 (FCRL2, Símil receptor Fc 2, SPAP1, Dominio SH2 con proteína 1 de anclaje de fosfatasa, Receptor Fc homólogo 2, Proteína 2 símil FcR, Proteína 4 asociada a translocación del receptor de inmunoglobulina, FCRH2, IFGP4, IRTA4, Proteína 4 de familia IFGP, SPAP1A, SPAP1B, SPAP1C, CD307b, Proteína 2 símil receptor Fc, Proteína 4 asociada a translocación del receptor inmune, Receptor Fc de superfamilia de inmunoglobulina, Gp42, Dominio SH2 con proteína 1 de anclaje de fosfatasa, FcRL2, Antígeno CD307b; GenBank: AAQ88497.1); FcRH5 (FCRL5, Símil 5 receptor Fc, IRTA2, Receptor Fc homólogo 5, Proteína 5 símil FcR, Proteína 2 asociada a translocación del receptor inmune, BXMAS1, FCRH5, CD307, CD307e, PRO820, Proteína 5 símil receptor Fc, Translocación asociada 2 de receptor de superfamilia de inmunoglobulina (IRTA2), FcRL5, CD307e Antígeno; GenBank: AAI01070.1); FLT3-ITD; FN1(Fibronectina 1, Globulina insoluble en frío, FN, Factor de estimulación de migración, CIG, FNZ, GFND2, LETS, ED-B, FINC, GFND, MSF, fibronectina; GenBank: AAI43764.1); G250 (MN, CAIX, Anhidrasa carbónica IX, Deshidratasa carbónica, Proteína G250 asociada a RCC, Carbonato deshidratasa IX, Membrana antígena MN, Antígeno G250 asociado a carcinoma celular renal, CA-IX, P54/58N, pMW1, Antígeno G250 asociado a RCC, Anhidrasa carbónica 9; NP); - resultados para “G250” y no “G250 / MN / CAIX”; GAGE-1,2,8; GAGE-3,4,5,6,7; GDNF-Ra1 (receptor alfa 1 de la familia GDNF; GFRA1; GDNFR; GDNFRA; RETL1; TRNR1; RET1L; GDNFR-alpha1; GFR-ALPHA-; U95847; BC014962; NM_145793 NM_005264); GEDA (acceso Genbank n.° AY26076); GFRA1 - receptor alfa 1 de la familia GDNF; receptor alfa 1 GDNF; GDNFR-alpha-1; GFR-alpha-1; ligando 1 RET; Factor neurotrópico receptor 1 relacionado con

TGF-beta [Homo sapiens]; ProtKB/Swiss-Prot: P56159.2; glipicano-3 (GPC3, Glipicano 3, SDYS, Glipicano proteoglicano 3, Proteína intestinal OCI-5, GTR2-2, MXR7, SGBS1, DGSX, OCI-5. SGB, SGBS, Proteoglicano de sulfato de heparán, Glipicano 3 secretado, OCI5; GenBank: AAH35972.1); GnTVf ; gp100 (PMEL, Proteína premelanosoma, SILV, D12S53E, PMEL17, SIL, Proteína melanocita Pmel 17, Antígeno GP100 específico para línea de melanocitos, Antígeno ME20 asociado a melanomas, Proteína homóloga locus plata, ME20-M, ME20M, P1, P100, Símil plata (Homólogo ratón), Homólogo plata (ratón), ME20, SI, Proteína melanocita Mel 17, Proteína melanocita PMEL, Martiz melanosomal Proteína17, Plata, Ratón, Homólogo de; GenBank: AAC60634.1); GPC; GPNMB (Glucoproteína (Transmembrana) Nmb, Glucoproteína NMB, Proteína símil glucoproteína Nmb, osteoactivina, Glucoproteína transmembrana HGFIN, HGFIN, NMB, Glucoproteína transmembrana, Glucoproteína transmembrana NMB; GenBank: AAH32783.1); GPR172A (receptor 172A acoplado con proteína G; GPCR41; FLJ11856; D15Ertd747e); NP_078807.1; NM_024531.3); GPR19 (receptor 19 acoplado con proteína G; Mm.478; NP_006134.1; NM_006143.2); GPR54 (receptor KISS1; KISS1R; GPR54; HOT7T175; AXOR1; NP_115940.2; NM_032551.4); HAVCR1 (Receptor celular 1 de virus de hepatitis A, Inmunoglobulina de células T miembro 1 de la familia mucina, Molécula 1 de lesión renal, KIM-1, KIM1, TIM, TIM-1, TIM1, TIMD-1, TIMD1, Receptor 1 de inmunoglobulina mucina de células T, Proteína 1 de membranas de células T, HAVCR, HAVCR-1, Dominio de inmunoglobulina de células T y Proteína 1 de dominio de mucina, HAVcr-1, Inmunoglobulina de células T y Dominio de mucina con proteína 1; GenBank: AAH13325.1); HER2 (ERBB2, V-Erb-B2 Leucemia eritroblástica aviar viral oncogene homólogo 2, NGL, NEU, Oncogene homólogo derivado de neuro/glioblastoma, Proteína de gen 19 de nodo linfático metastásico, Proto-Oncogene C-ErbB-2, Proto-Oncogene Neu, Receptor HER2 de superficie celular tipo tirosina quinasa, MLN 19, p185erbB2, EC 2.7.10.1, V-Erb-B2 Leucemia eritroblástica aviar viral oncogene homólogo 2 (Oncogene homólogo derivado de neuro/glioblastoma), CD340, HER-2, HER-2/neu, TKR1, Proteína C-Erb B2/Neu, herstatina, Oncogene homólogo derivado de neuroblastoma/glioblastoma, Receptor tirosina-proteína quinasa ErbB-2, V-Erb-B2 Leucemia eritroblástica viral oncogene homólogo 2, Oncogene homólogo derivado de neuro/glioblastoma, MLN19, Antígeno CD340, EC 2.7.10; NP); HER-2 / neu – sobrenombre del anterior; HERV-K-MEL ; HLA-DOB (Subunidad beta de la molécula MHC clase II (Antígeno Ia) que liga los péptidos y los une con CD4+ linfocitos T); 273 aa, pI: 6.56, MW: 30820.TM: 1 [P] Cromosoma del gen: 6p21.3, acceso Genbank n.° NP_002111); hsp70-2 (HSPA2, Proteína 2 de golpe de calor 70kDa, Proteína 2 de golpe de calor 70kD, HSP70-3, Proteína 2 asociada con golpe de calor 70 KDa, Proteína 2 de golpe de calor 70 KDa; GenBank: AAD21815.1); IDO1 (Indolamina 2,3-Dioxigenasa 1, IDO, INDO, Indolamina-Pirrol 2,3-Dioxigenasa, IDO-1, Indolamina-Pirrol 2,3 Dioxigenasa, Indolamina 2,3 Dioxigenasa, Indole 2,3 Dioxigenasa, EC 1.13.11.52; Referencia de secuencia NCBI: NP_002155.1); IGF2B3 ; IL13Ralpha2 (IL13RA2, Receptor de interleucina 13, Alfa 2, Antígeno 19 cancer/testículos, Proteína de enlace de interleucina

13, IL-13R-alfa-2, IL-13RA2, IL-13 Subunidad receptora alfa-2, IL-13R Subunidad alfa-2, CD213A2, CT19, IL-13R, IL13BP, Proteína de enlace de interleucina 13, Cadena alfa 2 receptora de interleucina 13, Subunidad alfa 2 receptora de interleucina, IL13R, Antígeno CD213a2; NP); IL20Rα; Carboxilesterasa intestinal; IRTA2 (sobrenombre de FcRH5); Kallikrein 4 (KLK4, Peptidasa 4 relacionada con Kallikrein, PRSS17, EMSP1, Serina proteinasa 1 de la matriz de esmalte, Proteína 1 símil Kallikrein, Serina proteasa 17, KLK-L1, PSTS, AI2A1, Kallikrein 4 (Prostasa, Matriz de esmalte, Próstata), ARM1, EMSP, Mensaje 1 regulado por andrógenos, Serina proteasa 1 de la matriz de esmalte, kallikrein, kallikrein-4, prostasa, EC 3.4.21.-, Prostasa, EC 3.4.21; GenBank: AAX30051.1); KIF20A (Miembro 20A de la familia de quinesina, RAB6KIFL, Interactuación de RAB6, Símil quinesina (Rabkinesin6), Mitotic a; LAGE-1; Proteína LDLR-fusión de fucosiltransferasas; Lengsin (LGSN, Lengsin, Proteína de cristalino con dominio de glutamina sintetasa, GLULD1, Dominio de glutamato-amoníaco ligasa con Proteína 1, LGS, Dominio contenedor 1 de glutamato-amoníaco ligasa (Glutamina sintetasa), Dominio contenedor 1 de glutamato-amoníaco ligasa, Símil glutamina sintetasa de cristalino; GenBank: AAF61255.1); LGR5 (repetición rica en leucina con receptor 5 acoplado con proteína G; GPR49, GPR6; NP_003658.1; NM_003667.2; LY64 (Antígeno linfocitos 64 (RP10, proteína de membrana de tipo I de la familia de repetición rica en leucina (LRR), regula la activación de las células B y la apoptosis, la pérdida de funciones está asociada con un incremento de enfermedades en pacientes con lupus eritematoso sistémico); 661 aa, pI: 6.20, MW: 74147 TM: 1 [P] Cromosoma del gen: 5q12, acceso Genbank n.° NP_005573.; Ly6E (complejo linfocito antígeno 6, locus E; Ly67,RIG-E,SCA-2,TSA-; NP_002337.1; NM_002346.2); Ly6G6D (complejo linfocito antígeno 6, locus G6D; Ly6-D, MEGT; NP_067079.2; NM_021246.2); LY6K (complejo linfocito antígeno 6, locus K; LY6K; HSJ001348; FLJ3522; NP_059997.3; NM_017527.3); dominio LyPD1 - LY6/PLAUR conteniendo 1, PHTS [Homo sapiens], GenBank: AAH17318.1); MAGE-A1 (Familia A de antígenos de melanoma, 1 (Controla la expresión del antígeno MZ2-E, MAGE1, Familia A 1 de antígenos de melanoma, MAGEA1, Antígeno de melanoma MAGE-1, Antígeno 1 asociado a melanoma, Antígeno MZ2-E asociado a melanoma, Antígeno MZ2-E, Antígeno 1.1 cancer/testículos, CT1.1, Antígeno MAGE-1, Familia 1 de antígenos cancer/testículos, Miembro 1, Familia 1 de antígenos cancer/testículos, Miembro 1, MAGE1A; Referencia de secuencia NCBI: NP_004979.3); MAGE-A10 (MAGEA10, Familia A de antígenos de melanoma, 10, MAGE10, Antígeno MAGE-10, Antígeno 10 asociado a melanoma, Antígeno 1.10 cancer/testículos, CT1.10, Familia 1 de antígenos cancer/testículos, Miembro 10, Familia 1 de antígenos cancer/testículos, Miembro 10; Referencia de secuencia NCBI: NP_001238757.1); MAGE-A12 (MAGEA12, Familia A de antígenos de melanoma, 12, MAGE12, Antígeno 1.12 cancer/testículos, CT1.12, Antígeno MAGE12F, Familia 1 de antígenos cancer/testículos, Miembro 12, Familia 1 de antígenos cancer/testículos, Miembro 12, Antígeno 12 asociado a melanoma, Antígeno MAGE-12; Referencia de secuencia NCBI: NP_001159859.1); MAGE-A2 (MAGEA2, Familia A de antígenos de melanoma, 2, MAGE2, Antígeno 1.2 cancer/testículos, CT1.2, MAGEA2A,

Antígeno MAGE-2, Familia 1 de antígenos cancer/testículos, Miembro 2, Familia 1 de antígenos cancer/testículos, Miembro 2, Antígeno 2 de melanoma, Antígeno 2 asociado a melanoma; Referencia de secuencia NCBI: NP_001269434.1); MAGE-A3 (MAGEA3, Familia A de antígenos de melanoma, 3, MAGE3, Antígeno MAGE-3, Antígeno MZ2-D, Antígeno 3 asociado a melanoma, Antígeno 1.3 cancer/testículos, CT1.3, Familia 1 de antígenos cancer/testículos, Miembro 3, HIP8, HYPD, MAGEA6, Familia 1 de antígenos cancer/testículos, Miembro 3; Referencia de secuencia NCBI: NP_005353.1); MAGE-A4 (MAGEA4, Familia A de antígenos de melanoma, 4, MAGE4, Antígeno 4 asociado a melanoma, Antígeno 1.4 cancer/testículos, CT1.4, Antígeno MAGE-4, Antígeno MAGE-41, Antígeno MAGE-X2, MAGE4A, MAGE4B, Familia 1 de antígenos cancer/testículos, Miembro 4, MAGE-41, MAGE-X2, Familia 1 de antígenos cancer/testículos, Miembro 4; Referencia de secuencia NCBI: NP_001011550.1); MAGE-A6 (MAGEA6, Familia A de antígenos de melanoma, 6, MAGE6, Antígeno MAGE-6, Antígeno 6 asociado a melanoma, Antígeno 1.6 cancer/testículos, CT1.6, Antígeno MAGE3B, Familia 1 de antígenos cancer/testículos, Familia A 6 de antígenos de melanoma, Miembro 6, MAGE-3b, MAGE3B, Familia 1 de antígenos cancer/testículos, Miembro 6; Referencia de secuencia NCBI: NP_787064.1); MAGE-A9 (MAGEA9, Familia A de antígenos de melanoma, 9, MAGE9, Antígeno MAGE-9, Antígeno 9 asociado a melanoma, Antígeno 1.9 cancer/testículos, CT1.9, Familia 1 de antígenos cancer/testículos, Miembro 9, Familia 1 de antígenos cancer/testículos, Miembro 9, MAGEA9A; Referencia de secuencia NCBI: NP_005356.1); MAGE-C1 (MAGEC1, Familia C de antígenos de melanoma, 1, Antígeno 7.1 cancer/testículos, CT7.1, Antígeno MAGE-C1, Familia 7 de antígenos cancer/testículos, Miembro 1, CT7, Familia 7 de antígenos cancer/testículos, Miembro 1, Antígeno C1 asociado a melanoma; Referencia de secuencia NCBI: NP_005453.2); MAGE-C2 (MAGEC2, Familia C de antígenos de melanoma, 2, MAGEE1, Antígeno 10 cancer/testículos, CT10, HCA587, Familia E de antígenos de melanoma, 1, Específico de cancer/testículos, Antígeno 587 asociado a carcinoma hepatocelular, Antígeno MAGE-C2, Antígeno MAGE-E1, Hepatocellular Cancer Antígeno 587 de cancer hepatocelular, Antígeno C2 asociado a melanoma; Referencia de secuencia NCBI: NP_057333.1); mamaglobina-A (SCGB2A2, Secretoglobina, Familia 2A, Miembro 2, MGB1, Mamaglobina 1, UGB2, Mamaglobina A, mamaglobina-A, mamaglobina-1, Familia Secretoglobina 2A Miembro 2; NP); MART2 (HHAT, Aciltransferasa de puercoespín, SKI1, Antígeno de melanoma reconocido por células T 2, Proteína 1 de puercoespín flaco, Skn, Antígeno de melanoma reconocido por células T 2, Proteína-cisteína N-palmitoiltransferasa HHAT, EC 2.3.1.-; GenBank: AAH39071.1); M-CSF (CSF1, Estimulante de colonia factor 1 (Macrófago), MCSF, CSF-1, lanimostim, Factor 1 de estímulo de colonia de macrófago humano, Lanimostim; GenBank: AAH21117.1); MCSP (SMCP, Proteína rica en cisteína asociada a la mitocondria del espermatozoide, MCS, Selenoproteína de cápsula mitocondrial, HSMCSGEN1, Proteína rica en cisteína asociada a la mitocondria del espermatozoide; Referencia de secuencia NCBI: NP_109588.2); XAGE-1b/GAGED2a; WT1 (Tumor 1 de Wilms, WAGR, GUD, WIT-2, WT33, Dominio amino-terminal de EWS, NPHS4, Últimos tres dedos de zinc

del dominio de enlace de ADN de WT1, AWT1, Proteína de tumor de Wilms, EWS-WT1; GenBank: AAB33443.1); VEGF; Tirosinasa (TYR; OCAIA; OCA1A; tirosinasa; SHEP; NP_000363.1; NM_000372.4; GenBank: AAB60319.1); TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, posible canal de catión del receptor transitorio, subfamilia M, miembro 4, acceso de Genbank n.º NM_01763); TRP2-INT2; TRP-2 ; TRP-1 / gp75 (Proteína 1 relacionada a la tirosinasa, 5,6-dihidroxindol-2-Oxidasa ácido carboxílico, CAS2, CATB, TYRP, OCA3, Catalasa B, PROTEÍNA b, glucoproteína 75, CE 1.14.18., Antígeno Melanoma Gp75, TYRP1, TRP, TYRRP, TRP1, SHEP11, Oxidasa DHICA, CE 1.14.18, GP75, CE 1.14.18.1; Triosa fosfato isomerasa (Triosa fosfato isomerasa 1, TPID, Triosa fosfato isomerasa, HEL-S-49, TIM, Proteína secreción epidídimo Li 49, TPI, Triosa fosfato isomerasa, CE 5.3.1.1; TRAG-3 (Miembro de la familia CSAG 2, Familia de antígeno Cáncer/Testículos 24, CSAG3B, Miembro 2, Miembro de la familia CSAG 3B, Familia de antígeno Cáncer/Testículos 24 Miembro 2, Antígeno Cáncer/Testículos 24.2, Gen asociado a la condrosarcoma 2/3 Proteína, Proteína asociada resistente a Taxol Gen 3, Gen asociado a la condrosarcoma 2/3 proteína-símil, CT24.2, Gen 3 asociado resistente a Taxol, TRAG-3, CSAG3A, TRAG3;); TMEM46 (homólogo 2 shisa (Xenopus laevis); SHISA; NP_001007539.1; NM_001007538.1; TMEM118 (proteína dedo angular, transmembrana2; RNFT2; FLJ1462; NP_001103373.1; NM_001109903.1; TMEFF1 (proteína transmembrana con EGF-símil y dos dominios folistatina-símil 1; Tomoregulin- ; H7365; C9orf2; C9ORF2; U19878; X83961; NM_080655; NM_003692; TGF-betaRII (TGFBR2, factor de crecimiento transformador, Receptor Beta II (70/80kDa), TGFbeta-RII, MFS2, tbetaR-II, TGFR-2, Receptor TGF-Beta Tipo IIB, Receptor TGF-Beta Tipo II, Receptor TGF-Beta Tipo 2, EC 2.7.11.30, Receptor beta de factor de crecimiento transformador tipo IIC, AAT3, TbetaR-II, factor de crecimiento transformador, Receptor beta II (70-80kD), Receptor TGF-Beta tipo II, FAA3, Receptor beta de factor de crecimiento transformador tipo III, LDS1B, HNPCC6, LDS2B, LDS2, RIIC, CE 2.7.11, TAAD2; TENB2 (TMEFF2, tomoregulin, TPEF, HPP1, TR, proteoglican transmembranosos putativo, relacionado a la familia EGF/heregulina de factores de crecimiento y folistatina); 374 aa, Accesión NCBI: AAD55776, AAF91397, AAG49451, NCBI RefSeq: NP_057276; Gen NCBI: 23671; OMIM: 605734; SwissProt Q9UIK5; Acceso de Genbank N.º AF179274; AY358907, CAF85723, CQ782436; TAG-2; TAG-1 (Contactin 2 (Axonal), TAG-1, AXT, Molécula de adhesión celular Axonin-1, TAX, Contactin 2 (expresada transitoriamente), TAX1, Contactin-2, Glucoproteína axonal TAG-1, Glucoproteína axona expresada transitoriamente, Glucoproteína axonal transitoria, Axonin-1, TAX-1, TAG1, FAME5; PRF: 444868); SYT-SSX1 o -SSX2 proteína de fusión; survivin; STEAP2 (HGNC_8639, IPCA-1, PCANAP1, STAMP1, STEAP2, STMP, gen 1 asociado al cáncer de próstata, proteína 1 asociada al cáncer de próstata, seis antígenos epiteliales de próstata 2, seis proteínas de próstata transmembrana, Genbank accession no. AF45513; STEAP1 (seis antígenos epiteliales de próstata, Acceso de Genbank n.º NM_01244; SSX-4; SSX-2 (SSX2, Sarcoma sinovial, X Breakpoint2, X Breakpoint 2, SSX, X Breakpoint 2B, Antigeno Cáncer/Testículos 5.2, X-Cromosoma-Relacionado 2, Antígeno tumoral HOM-MEL-40,

CT5.2, HD21, Antígeno Cáncer/Testículos Familia 5, HOM-MEL-40, Isoforma B, Antígeno Cáncer/Testículos Familia 5 miembro 2a, miembro 2a, Proteína SSX2, Sarcoma, Sarcoma, Sinovial, X-Cromosoma-Relacionada 2, sinovial, Sarcoma sinovial, X Breakpoint 2B, Sarcoma sinovial, SSX2A; Sp17; SOX10 (SRY (Región determinadora de sexo Y)-Box 10, ratón, PCWH, DOM, WS4, WS2E, WS4C, Megacolon dominante, ratón, Homologo humano de, Megacolon dominate, SRY-relacionado HMG-Box Gen 10, Homologo humano de,Factor de transcripción SOX-10; GenBank: CAG30470.1); SNRPD1 (pequeña ribonucleoproteina nuclear D1, pequeña ribonucleoproteina nuclear D1, polipéptido 16kDa, polipéptido (16kD), SNRPD, HsT2456, Sm-D1, SMD1, Sm-D autoantígeno, pequeña ribonucleoproteina nuclear D1 polipéptido 16kDa Pseudogene, SnRNP Proteína principal D1, pequeña ribonucleoproteina nuclear Sm D1; SLC35D3 (soluto compañía familia 35, miembro D3, FRCL1, Proteína de conexión limítrofe-símil 1, bA55K22.3, Frc, Límite-símil 1, soluto compañía familia 35 miembro D3; NCBI GenBank: NC_000006.11 NC_018917.2 NT_025741.16); SIRT2 (Sirtuina 2, NAD-dependiente deacetilasa sirtuin-2, SIRL2, silencio información regulatorio 2, Proteína reguladora SIR2 Homólogo 2, Proteína Sir2-Relacionada yipo 2, Proteína 2 SIR2-símil, Sirtuina tipo 2, Sirtuina (Regulación de información de tipo de apareamiento silencioso 2 homóloga) 2 (S.Cerevisiae), Sirtuina-2, Sirtuina (Regulación de información de tipo de apareamiento silencioso 2, S.Cerevisiae, Homóloga) 2, CE 3.5.1., SIR2; GenBank: AAK51133.1); Sema 5b (FLJ10372, KIAA1445, Mm.42015, SEMA5B, SEMAG, Semaforina 5b Hlog, dominio sema, siete repeticiones de trombospondina (tipo 1 y tipo 1-símil), dominio transmembrana (TM) y dominio citoplásmico corto, (semaforina) 5B, acceso de Genbank n.º AB04087; secernina 1 (SCRN1, SES1, KIAA0193, secerina-1; GenBank: EAL24458.1); SAGE (SAGE1, Antígeno sarcoma 1, Antígeno Cáncer/Testículos 14, CT14, Antígeno de tumor putativo; Secuencia de referencia NCBI: NP_061136.2); RU2AS (KAAG1, Antígeno asociado al riñón 1, RU2AS, RU2 Proteína del gen antisentido, Antígeno asociado al riñón 1; GenBank: AAF23613.1); RNF43 - E3 ligasa ubiquitina-proteína RNF43 precursor [Homo sapiens], RNF124; URCC; Secuencia de referencia: NP_060233.3; RhoC (;RGS5 (Regulador de señalización de proteína-G 5, MSTP032, Regulador de señalización de proteína-G 5, MSTP092, MST092, MSTP106, MST106, MSTP129, MST129; GenBank: AAB84001.1); RET (proto-oncogen RET; MEN2A; HSCR1; MEN2B; MTC1; PTC; CDHF12; Hs.168114; RET51; RET-ELE; NP_066124.1; NM_020975.4); RBAF600 (UBR4, ligasa proteína ubiquitina E3 componente N-Recognin 4, dedo de zinc, UBR1 Type 1, ZUBR1, E3 ligasa ubiquitina-proteína UBR4, RBAF600, Factor 600 KDa retinoblastoma asociada a la proteína, Proteína 1 dedo de zinc tipo UBR1, EC 6.3.2., N-recognin-4, KIAA0462, p600, CE 6.3.2, KIAA1307; GenBank: AAL83880.1); RAGE-1 (MOK, proteína quinasa MOK, Antígeno del tumor renal, RAGE, MAPK/MAK/MRK quinasa superpuesta, Antígeno del tumor renal 1, Antígeno del carcinoma de células renales, RAGE-1, CE 2.7.11.22, RAGE1; UniProtKB/Swiss-Prot: Q9UQ07.1); RAB38 / NY-MEL-1 (RAB38, NY-MEL-1, RAB38, Miembro RAS familia oncógena, Antígeno del melanoma NY-MEL-1, Proteína de unión de GTP relacionada aRab, Proteína relacionada a Ras Rab-38, rrGTPbp; GenBank:

AAH15808.1); PTPRK (DJ480J14.2.1 (Fosfatasa tirosina de proteína, Tipo receptor, K R-PTP-KAPPA, Kappa Fosfatasa tirosina de proteína, Kappa Fosfatasa tirosina de proteína), Fosfatasa tirosina de proteína, Tipo receptor, K, Kappa Fosfatasa tirosina de proteína, Fosfatasa tirosina de proteína, Tipo receptor, Kappa, R-PTP-kappa, Kappa Fosfatasa tirosina de proteína tipo receptor, CE 3.1.3.48, PTPK; GenBank: AAI44514.1); PSMA; PSCA hlg(2700050C12Rik, C530008O16Rik, RIKEN cDNA 2700050C12, RIKEN cDNA 2700050C12 gen, acceso de Genbank n.º AY358628); PSCA (Procursor del antígeno de células madre de la próstata, acceso de Genbank n.º AJ29743; ; PRDX5 (Peroxiredoxina 5, CE 1.11.1.15, TPx Tipo VI, B166, Enzima antioxidante B166, HEL-S-55, Tejido del hígado página 2D punto 71B, PMP20, Enzima antioxidante peroxisoma, PRDX6, Tioredoxina peroxidasa PMP20, PRXV, AOEB166, Proteína secretora de epidermis Li 55, Alu co-represor 1, Peroxiredoxina-5, Mitocondrial, Peroxiredoxina V, prx-V, Tioredoxina Reductasa, Prx-V, ACR1, Alu Corepressor, PLP; GenBank: CAG33484.1); PRAME (Antígeno expresado preferencialmente en melanoma, Antígeno expresado preferencialmente del melanoma, MAPE, OIP-4, OIPA, CT130, Antígeno Cáncer/Testículos 130, Antígeno melanoma expresado preferiblemente en tumores, Proteína de interacción con Opa 4, Proteína de interacción con Opa 4; GenBank: CAG30435.1); proteína de fusión pml-RARalpha; PMEL17 (homólogo plata; SILV; D12S53E; PMEL17; SI; SIL); ME20; gp10 BC001414; BT007202; M32295; M77348; NM_006928; PBF (ZNF395, proteína de dedo de zinc 395, PRF-1, Regulatorio de la enfermedad de Huntington, Proteína de unión de región regulatoria del gen HD, Proteína 2 de union de región, Proteínna 2, Factor 1 regulatorio del virus del papiloma, factor 2 regulatorio de HD, Factor regulatorio del virus del papiloma, PRF1, HDBP-2, Si-1-8-14, HDBP2, Proteína 2 de unión de región regulatoria del gen de la enfermedad de Huntington 2, HDRF-2, Factor PRF-1 regulatorio del virus del papiloma, PBF; GenBank: AAH01237.1); PAX5 (Paired Box 5, Gen 5 homeótico Paire5, BSAP, caja pareada de proteína Pax-5, Activador específico del linaje celular, Gen 5 de dominio pareado, caja pareada de gen 5 (Proteína activadora específica del linaje de células B), factor de transcripción específico de células B, caja pareada de gen 5 (activador específico del linaje de células B); PAP (REG3A, Alfa 3 derivado de islote regenerador, INGAP, PAP-H, Proteína pancreática Hepatointestinal, PBBCGF, Péptida de islote pro humana, REG-III, Proteína 1 asociada a la pancreatitis, Reg3, Reg III-Alfa, páncreas-intestinal-hepatocarcinoma, Proteína regeneradora derivada de islote III-Alfa, Factor de crecimiento celular Beta pancreático, HIP, Proteína PAP homóloga, HIP/PAP, Proteína inductora de proliferación 34, PAP1, Proteína inductora de proliferación 42, REG-3-alfa, Proteína regeneradora derivada de islote 3-Alfa, Proteína asociada a la Pancreatitis; GenBank: AAH36776.1); p53 (TP53, Proteína de tumores P53, TPR53, P53, Antígeno de tumor celular P53, Antígeno NY-CO-13, Proteína de tumor mutante 53, Fosfoproteína P53, P53 Supresor de tumores, BCC7, Proteína relacionada a la transformación 53, LFS1, Proteína de tumor 53, Síndrome Li-Fraumeni, Supresor de tumores P53; P2X5 (Receptor purinérgico P2X canal 5 con ventanas ligando, un canal de ion con ventana por ATP

extracelular, puede estar involucrado en la transmisión sináptica y la neurogénesis, la insuficiencia puede contribuir a la patofisiología de la inestabilidad del detrusor idiopático); 422 aa), pI: 7.63, MW: 47206 TM: 1 [P] Cromosoma del gen: 17p13.3, Acceso de GenBank N.º NP_002552.; OGT (Vinculado-O N-acetilglucosamina (GlcNAc) transferasa, O- GlcNAc transferasa P110 Subunidad, Vinculado-O N-acetilglucosamina (GlcNAc) transferasa (UDP-N-acetilglucosamina: Polipéptido-N-acetilglucosaminil transferasa, UDP-N-Acetylglucosamine--péptido N- acetilglucosaminiltransferasa 110 KDa Subunidad, UDP-N-acetilglucosamina: polipéptido-N-acetilglucosaminil transferasa, Difosfouridina-N-acetilglucosamina: polipéptido Beta-N-acetilglucosaminil transferasa, O- GlcNAc transferasa Subunidad P110, CE 2.4.1.255, Vinculado-O N-acetilglucosamina transferasa 110 KDa Subunidad, CE 2.4.1, HRNT1, CE 2.4.1.186, O-GlcNAc; GenBank: AAH38180.1); OA1 (Osteoartritis QTL 1, OASD; GenBank: CAA88742.1); NY-ESO-1/LAGE-2 (cáncer/testículo antígeno 1B, CTAG1B, NY-ESO-1, LAGE- 2, ESO1, CTAG1, CTAG, LAGE2B, antígeno cáncer/testículo 1, Antígeno cáncer/testículo Autoimmunogénico NY- ESO-1, Antígeno ancer 3, antígeno cáncer/testículo 6,1, Carcinoma de células escamosas del esófago Nueva York 1, L antígeno miembro de la Familia 2, LAGE2, CT6.1, LAGE2A; GenBank: AAI30365.1); NY-BR-1 (ANKRD30A, Dominio repetido Ankirina 30A, antígeno cáncer de pecho NY- BR- 1, Antígeno de cáncer de seno definido serológicamente NY-BR-1, Proteína con contenido de dominio repetido Ankirina 30A; Secuencia de Referencia NCBI: NP_443723.2); N-ras (NRAS, neuroblastoma RAS virales (V-Ras) Homólogo oncogen, NRAS1, Transformando la Proteína N-Ras, GTPase ANR, ALPS4, Proteína N-Ras Parte 4, NP6, Homólogo oncogen, HRAS1; GenBank: AAH05219.1); FJCN (factor de transcripción nuclear Y, Gamma, Hap5, HSM, Factor de transcripción nuclear Y Subunidad C, transactivador HSM-1/2 media, CCAAT subunidad de unión al factor C, NF-YC, CCAAT de transcripción de unión factor subunidad gamma, caja CAAT ADN-proteína de unión subunidad C, Subunidad de grandes dimensiones 2A del factor de unión de transcripción Histona H1, CBFC, Factor de transcripción nuclear Y subunidad gamma, CBF-C, transactivador HSM-1, H1TF2A, factor de transcripción NF-Y, C subunidad; neo-PAP (PAPOLG, Poly (A) polimerasa gamma, Neo-poli (A) polimerasa, Nuclear poli (A) polimerasa gamma, Polinucleótido adeniltransferasa gamma, SRP ARN 3" Enzima adelinato PAP2, PAP-gamma, Neo-PAP, SRP ARN 3" Enzima adelinato, PAP2, CE 2.7.7.19, PapG; Secuencia de Referencia NCBI: NP_075045.2); NCA (CEACAM6, acceso de GenBank n.º M1872); Napi3b (NAPI-3B, NPTIIb, Slc34a2, familia transportista de soluto 34 (fosfato de sodio), miembro 2, tipo II transportador de fosfato 3b dependiente de sodio, acceso de GenBank n.º NM_00642); Miosina clase I; MUM-3; MUM-2 (TRAPPC1, Subunidad 1 compleja de partículas de proteína de tráfico, BET5, Homólogo de BET5, MUM2, melanoma ubicuo mutado 2, Proteína de mieloma múltiple 2, Subunidad 1 compleja de partículas de proteína de tráfico; MUM-1f ; mucina (MUC1, mucina 1, célula superficiales asociadas, PEMA, PUM, CA 15-3, MCKD1, ADMCKD, Enfermedad de riñón medular quística 1 (autosómica dominante), ADMCKD1, mucina 1, transmembrana, CD227, Antígeno asociado al

carcinoma de seno DF3, MAM6, Antígeno de cáncer 15-3, MCD (Documento de Control de Materiales), Carcinoma asociada mucina, MCKD, Krebs Von Den Lungen-6, MUC-1/SEC, Mucina urinaria reactiva al maní, MUC1/ZD, Antígeno de emembrana epitelial asociada a tumores, Antígeno DF3, Mucina asociada a tumores, episialin, EMA, Antígeno de H23, H23AG, mucina-1, KL-6, Mucina epitelial asociada a tumores, MUC-1, Episialin, PEM, Antígeno CD227; UniProtKB/Swiss-Prot: P15941.3); MUC5AC (mucina 5AC, moco/formadores de gel oligoméricico, mucina traqueobronquial, MUC5, TBM, mucina 5, subtipos A y C, traqueobronquial/gástrico, LEB, mucina gástrica, mucina 5AC, pseudogen moco/formadores de gel oligomérico, antígeno del grupo de sangre Lewis B, LeB, vías respiratorias de la glucoproteína principales, MUC- 5AC, mucina 5 subtipo AC, traqueobronquial; MUC1 (mucina 1, superficie celular asociada, PEMA, PUM, CA 15-3, MCKD1, ADMCKD, enfermedad quística medular renal 1 (autosómica dominante), ADMCKD1, mucina 1, transmembrana, CD227, antígeno DF3 asociado al carcinoma de seno, MAM6, antígeno de cáncer 15-3, MCD (Documento de Control de Materiales), mucina asociada al carcinoma, MCKD, Krebs Von Den Lungen-6, MUC1/SEC, mucina urinaria reactiva al maní, MUC-1/X, mucina epithelial polimórfica, MUC1/ZD, antígeno de membrana epithelial asociado a tumores, antígeno DF3, mucina asociada a tumores, episialin, EMA, antígeno de h23, H23AG, mucina-1, KL-6, mucina epithelial asociada a tumores, MUC1, Episialin, PEM, antígeno de CD227; ; MSG783 (RNF124, proteína hipotética FLJ20315, acceso de GenBank n.º NM-01776; MRP4 - proteína 4 isoforma 3 asociada a la resistencia a múltiples fármacos, MOAT-B; MOATB [Homo sapiens]; Secuencia de Referencia NCBI: NP_001288758.1; MPF (MPF, MSLN, SMR, megacariocitos potenciando el factor, mesothelin, Genbank adhesión no. NM_00582; MMP-7 (MMP7, matrilysin, MPSL1, matrin, 7 metaloproteinasa de la matriz (útero, Matrilysin), Matrilysin uterina, metaloproteinasa de la matriz-7, CE 3.4.24.23, bomba-1 proteasa, Matrin, Metaloproteinasa uterina, PUMP1, MMP-7, CE 3.4.24, bomba-1; GenBank: AAC37543.1); MMP-2 (MMP2, matriz curación 2 (gelatinasa A, 72kDa gelatinasa, 72kDa tipo colagenasa IV), MONA, CLG4A, metaloproteinasa de la matriz 2 (gelatinasa A, 72kD gelatinasa, 72kD tipo colagenasa IV), CLG4, 72kDa gelatinasa, 72kDa tipo colagenasa IV), matriz metaloproteinasa-2, MMP-II, 72 KDa gelatinasa, colagenasa tipo IV-A, MMP-2, metaloproteinasa de la matriz-II, TBE-1, gelatinasa neutrófila, CE 3.4.24.24, CE 3.4.24; GenBank: AAH02576.1); y Meloe.

Por ejemplo, en algunas situaciones, un anticuerpo anti CD3 que tiene un primer dominio de unión puede comprender al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis regiones hipervariables (RHV) que se seleccionan de (a) una RHV-H1 que consta en una secuencia de aminoácidos con N°. de ID de SEC.: 1; (b) una RHV-H2 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.° de ID de SEC.: 2; (c) una RHV-H3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 3; (d) una RHV-L1 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 4; (e) una RHV-L2 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 5; y (f) una RHV-L3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 6, como 40G5c, puede tener un segundo dominio

de unión que se une con CD20.

En algunas situaciones, un anticuerpo anti CD3 que tiene un primer dominio de unión puede comprender al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis regiones hipervariables (RHV) que se seleccionan de (a) una RHV-H1 que consta en una secuencia de aminoácidos con N°. de ID de SEC.: 1; (b) una RHV-H2 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.° de ID de SEC.: 2; (c) una RHV-H3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 3; (d) una RHV-L1 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 4; (e) una RHV-L2 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 5; y (f) una RHV-L3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 6, como 40G5c, puede tener un segundo dominio de unión que se une con HER2. El segundo dominio de unión que se liga con HER2 puede, por ejemplo, comprender de al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis regiones hipervariables (RHV) que se seleccionan de (a) una RHV-CD20 que consta en una secuencia de aminoácidos con N°. de ID de SEC.: 169; (b) una RHV-H2 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.° de ID de SEC.: 170; (c) una RHV-H3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 171; (d) una RHV-L1 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 172; (e) una RHV-L2 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 173; y (f) una RHV-L3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 174, como las que tiene el anticuerpo anti HER2, hu4D5. En algunas situaciones, el segundo dominio de unión que une HER2 contiene al menos una (p.ej., 1, 2, 3, o 4) de las regiones del marco de las cadenas pesadas FR-H1, FR-H2, FR-H3, y FR-H4 que consiste en las secuencias de N.º de ID de SEC.: 549-552, respectivamente, y/o al menos una (p.ej., 1, 2, 3, o 4) de las regiones del marco de la cadena liviana FR-L1, FR-L2, FR-L3, y FR-L4 que consiste en las secuencias de N.º de ID de SEC.: 553-556, respectivamente. En algunas situaciones, el segundo dominio de unión que se liga con HER2 puede, por ejemplo, comprender de (a) un dominio de VH que consta de una secuencia de animoácidos que tiene al menos una identidad de secuencia del 90% (p.ej., con una identidad de secuencia de al menos el 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%) con, o la secuencia de, N.° de ID de SEC.: 270; (b) un dominio de VL que consta de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una identidad de secuencia del 90% (p.ej., con una identidad de secuencia de al menos el 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%) con, o la secuencia de, N.° de ID de SEC.: 271; o (c) un dominio de VH como en (a) y un dominio de VL como en (b).

En algunas situaciones, un anticuerpo anti CD3 que tiene un primer dominio de unión puede comprender al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis regiones hipervariables (RHV) que se seleccionan de (a) una RHV-H1 que consta en una secuencia de aminoácidos con N°. de ID de SEC.: 7; (b) una RHV-H2 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.° de ID de SEC.: 8; (c) una RHV-H3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 9; (d) una RHV-L1 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 10; (e) una RHV-L2 que consiste en una secuencia de

aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 11; y (f) una RHV-L3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 12, como 38E4v1, puede tener un segundo dominio de unión que se une con HER2. El segundo dominio de unión que se liga con HER2 puede, por ejemplo, comprender de al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis regiones hipervariables (RHV) que se seleccionan de (a) una RHV-CD20 que consta en una secuencia de aminoácidos con N°. de ID de SEC.: 169; (b) una RHV-H2 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.° de ID de SEC.: 170; (c) una RHV-H3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 171; (d) una RHV-L1 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 172; (e) una RHV-L2 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 173; y (f) una RHV-L3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 174, como las que tiene el anticuerpo anti HER2, hu4D5. En algunas situaciones, el segundo dominio de unión que se liga con HER2 puede, por ejemplo, comprender de (a) un dominio de VH que consta de una secuencia de animoácidos que tiene al menos una identidad de secuencia del 90% (p. ej., con una identidad de secuencia de al menos el 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%) con, o la secuencia de, N.° de ID de SEC.: 270; (b) un dominio de VL que consta de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una identidad de secuencia del 90% (p. ej., con una identidad de secuencia de al menos el 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%) con, o la secuencia de, N.° de ID de SEC.: 271; o (c) un dominio de VH como en (a) y un dominio de VL como en (b).

.

En algunas versiones, también se pueden utilizar anticuerpos biespecíficos para localizar agentes citotóxicos en células que expresan un antígeno tumoral, como los antígenos tumorales que aparecen en la Tabla 1 (p. ej. CD20, FcRH5, HER2, LYPD1, LY6G6D, PMEL17, LY6E, CD19, CD33, CD22, CD79A, CD79B, EDAR, GFRA1, MRP4, RET, Steap1, o TenB2). También se pueden preparar anticuerpos biespecíficos como fragmentos o anticuerpos completos.

Entre las técnicas para crear anticuerpos específicos se encuentran, pero no se limitan a, coexpresión recombinante de dos pares de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina con especificidades diferentes (consulte Milstein y Cuello, *Nature* 305: 537 (1983)), WO 93/08829, y Traunecker et ál., *EMBO J.* 10: 3655 (1991)), ingeniería "botón en ojal" (consulte, p. ej., patente de EE.UU. N.° 5.731.168). Se puede utilizar la ingeniería de "botón en ojal" para generar un primer grupo que contenga un botón y un segundo grupo que contenga un ojal que se pueda unir con el botón del primer grupo. El botón de los anticuerpos mutiespecíficos de la invención puede estar en un grupo anti-CD3 en una versión. De forma alternativa, el botón de los anticuerpos mutiespecíficos de la invención puede estar en un grupo anti-objetivo/antígeno en una versión. El ojal de los anticuerpos mutiespecíficos de la invención puede estar en un grupo anti-CD3 en una versión. De forma alternativa, el ojal de los anticuerpos multiespecíficos de la invención puede estar en un grupo anti-objetivo/antígeno en una versión. También se pueden crear anticuerpos multiespecíficos con tecnología de cruzado de inmunoglobulina

(también conocida como intercambio de dominio Fab o formato CrossMab) (consulte p. ej., WO2009/080253; Schaefer et ál., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108:11187-11192 (2011)). También se pueden crear anticuerpos multiespecíficos por medio de efectos reguladores electrostáticos para la creación de moléculas heterodiméricas del Fc del anticuerpo (WO 2009/089004A1); con una unión cruzada de dos más anticuerpos o fragmentos (consulte, p. ej., patente de EE.UU. N.° 4.676.980, y Brennan et ál., Science, 229: 81 (1985)); con una cremallera de leucina para producir anticuerpos biespecíficos (consulte, p. ej., Kostelny et ál., J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992)); con tecnología "diacuerpo" para crear fragmentos de anticuerpo biespecíficos (consulte, p. ej., Hollinger et ál., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)); y con dímeros de fragmento Fv de cadena sencilla (sFv, por su sigla en inglés) (consulte, p. ej., Gruber et ál., J. Immunol., 152:5368 (1994)); y preparando anticuerpos triespecíficos como se indica, p. ej., en Tutt et ál. *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

Los anticuerpos creados con tres o más sitios de unión de antígenos funcionales, entre ellos los "anticuerpos pulpo", también se incluyen en este documento (consulte, p. ej., US 2006/0025576A1).

Estos anticuerpos, o sus fragmentos, también pueden incluir "fragmentos FAb de doble acción" o "DAF" (por su sigla en inglés) que constan de un sitio de unión de antígeno que se une a CD3 y a otro antígeno diferente (p. ej., una segunda molécula biológica) (consulte, p. ej., US 2008/0069820).

7. Variantes de Anticuerpos

Se contemplan en algunas versiones las variantes de las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos anti-CD3 de la invención (p. ej., los anticuerpos anti-CD3 biespecíficos de la invención que se unen a CD3 y a una segunda molécula biológica como, p. ej., el antígeno de superficie de una célula, p. ej., el antígeno de un tumor, como los anticuerpos TDB de la invención o las variantes correspondientes). Por ejemplo, se puede desear aumentar la afinidad de unión u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Se pueden preparar variantes de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo al ingresar las modificaciones apropiadas en la secuencia de nucleótidos que codifica al anticuerpo, o con una síntesis peptídica. Entre estas modificaciones se encuentran, por ejemplo, las eliminaciones de, o inserciones en o sustituciones de los residuos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Cualquier combinación de eliminación, inserción o sustitución puede llegar a la construcción final, siempre que la construcción final tenga las características esperadas, por ejemplo, unión de antígenos.

a. Variantes de Sustitución, Inserción y Eliminación

En algunas versiones, se incluyen las variantes de anticuerpos que tienen una o más sustituciones de aminoácidos. Entre los sitios de interés para la mutagénesis por sustitución se encuentran las RHV y FR. En la Tabla 2 aparecen las sustituciones conservadoras con el título "sustituciones preferidas". En la Tabla 2 se incluyen más

cambios considerables con el título “sustituciones ilustrativas”, y como se describe posteriormente en referencia a las clases de cadenas laterales de los aminoácidos. Se pueden introducir sustituciones de aminoácidos en un anticuerpo de interés y se pueden seleccionar los productos según la actividad deseada, por ejemplo, aumento/mantenimiento de la unión de antígenos, disminución en la inmunogenicidad o aumento de ADCC o CDC.

TABLA 2. Sustituciones de Aminoácidos Ilustrativas y Preferidas

Original Residuo	**Sustituciones Ilustrativas**	**Sustituciones Preferidas**
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

modificaciones (p. ej., mejoras) en ciertas propiedades biológicas (p. ej., aumento de la afinidad, disminución de la inmunogenicidad) relativas al anticuerpo original o habrá

conservado sustancialmente ciertas propiedades biológicas del anticuerpo original. Una variante de sustitución ilustrativa es un anticuerpo madurado por afinidad que puede generarse convenientemente, p. ej., con técnicas de maduración por afinidad por medio de fagos como las que se describen aquí. Brevemente, se mutan uno o dos residuos RHV y se presentan los anticuerpos variables en los fagos y se selecciona según cierta actividad biológica (p. ej., afinidad de unión).

Se pueden realizar alteraciones (p. ej., sustituciones) en las RHV, p. ej., para aumentar la afinidad de los anticuerpos. Se pueden realizar esas alteraciones en los "puntos de acceso" de RHV, p. ej., los residuos decodificados por codones que tienen una mutación en una frecuencia alta durante el proceso de maduración somática (consulte, p. ej., Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)), o residuos que contactan con los antígenos, con la prueba de afinidad de unión de la variación resultante de VH o VL. Maduración por afinidad construyendo y seleccionando de genotecas secundarias como se describe, p. ej., en Hoogenboom et ál en Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien et ál., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001).) En algunas versiones de maduración por afinidad, se introduce diversidad en los genes variables seleccionados para madurar con cualquiera de varios métodos (p. ej., RCP con tendencia al error, intercambio de cadenas o mutagénesis dirigida por oligonucleótidos). Entonces se crea una genoteca secundaria. Se examina la genoteca para identificar cualquier variante en los anticuerpos con la afinidad deseada. Otro método para introducir diversidad incluye un método dirigido por RHV, en el que se hacen aleatorios varios residuos RHV (p. ej., entre 4 y 6 residuos por vez). Los residuos RHV involucrados en la unión de antígenos pueden identificarse específicamente, p. ej., utilizando modelado o mutagénesis por barrido de alanina. Se suele concentrar sobre CDR-H3 y CDR-L3.

En algunas versiones, puede haber sustituciones, inserciones o eliminaciones dentro de una o mas RHV siempre que las alteraciones no reduzcan sustancialmente la habilidad del anticuerpo para unirse con el antígeno. Por ejemplo, se pueden convertir en RHV a las alteraciones conservadoras (p. ej., las sustituciones conservadoras que se incluyen aquí) que no reduzcan sustancialmente la afinidad de unión. Esas alternaciones pueden estar, por ejemplo, por fuera de residuos en contacto con antígenos en las RHV. En algunas versiones de la variante de las secuencias VH y VL que se mencionan antes, cada RHV no tiene alteración o contiene no más de una, dos o tres sustituciones de aminoácidos.

Un método útil para identificar los residuos o regiones de un anticuerpo que pueden ser objeto de mutagénesis se llama "mutagénesis por barrido de alanina" como describe Cunningham y Wells (1989) Science, 244:1081-1085. En este método, se identifica y reemplaza un residuo o grupo de residuos objetivo (p. ej., residuos cargados como arg, asp, his, lys y glu) con aminoácidos neutrales o con carga negativa (p. ej., alanina o polialanina) para determinar si se afecta la interacción del anticuerpo con el antígeno. Se pueden introducir más sustituciones en los sitios de los aminoácidos que demuestran

sensibilidad funcional a las sustituciones iniciales. Opcional, o adicionalmente, se puede agregar una estructura de cristal de un complejo antígeno-anticuerpo para identificar los puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Esos residuos de contacto o linderos pueden ser objeto o eliminarse como candidatos para la sustitución. Se pueden evaluar las variantes para determinar si contienen las propiedades deseadas.

Las inserciones en la secuencia de aminoácidos incluyen fusiones de amino o carboxilo terminales que puede variar desde un residuo hasta polipéptidos que contengan cientos de residuos, así como las inserciones intrasecuencia de uno o varios residuos de aminoácidos. Entre los ejemplos de las inserciones terminales se encuentra un anticuerpo con un residuo metionil N-terminal. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión de N- o C-terminal del anticuerpo con una enzima (p. ej., para ADEPT) o un polipéptido que aumenta la vida media del suero del anticuerpo.

b. Variantes de Glucosilación

En ciertas versiones, los anticuerpos anti-CD3 de la invención (p. ej., los anticuerpos anti-CD3 biespecíficos de la invención que se unen a CD3 y a una segunda molécula biológica como, p. ej., un antígeno de superficie celular, p. ej., el antígeno de un tumor, como los anticuerpos TDB de la invención o las variantes correspondientes) pueden alterarse para aumentar o disminuir cuanto se glucosila el anticuerpo. Se puede lograr agregar o eliminar sitios de glucosilación a un anticuerpo anti-CD3 de la invención alterando la secuencia de aminoácidos para que se creen o eliminen uno o más de los sitios de glucosilación.

Cuando el anticuerpo involucra una región Fc, se puede alterar el hidrato de carbono unido a él. Los anticuerpos nativos que producen las células de los mamíferos generalmente incluyen un oligosacárido biantenario y ramificado que por lo general se liga por una unión N- con Asn297 del dominio CH2 de la región Fc. Consulte, p. ej., Wright et ál. *TIBTECH* 15:26-32 (1997). El oligosacárido puede incluir varios hidratos de carbono, p. ej., manosa, N-acetilglucosamina (GlcNAc), galactosa y ácido siálico, así como una fucosa unida a un GlcNAc en la "raíz" de la estructura del oligosacárido biantenario. En algunas versiones, se pueden realizar las modificaciones del oligosacárido en un anticuerpo de la invención para crear variantes de anticuerpo con ciertas propiedades mejoradas.

En una versión, se incluyen las variantes del anticuerpo anti-CD3 que tienen una estructura de hidrato de carbono sin fucosa unida (directa o indirectamente) a una región Fc. Por ejemplo, la cantidad de fucosa en dicho anticuerpo puede variar entre 1% y 80%, 1% y 65%, 5% y 65% o 20% y 40%. La cantidad de fucosa se determina calculando la cantidad promedio de fucosa dentro de la cadena de azúcar en Asn297, en relación a la cantidad de glicoestructuras unidas a Asn297 (p. ej., estructuras complejas, híbridas y altas en manosa) como se mide con la espectrometría de masas MALDI-TOF, como se describe por ejemplo en WO 2008/077546. Asn297 hace referencia al residuo

de asparagina ubicado por la posición297 en la región Fc (numeración UE de los residuos de la región Fc); sin embargo, Asn297 también puede encontrarse ±3 aminoácidos arriba o abajo de la posición 297, o sea, entre las posiciones 294 y 300, por algunas variaciones menores en la secuencia de los anticuerpos. Dichas variantes fucolizadas podrían mejorar la función ADCC. Consulte, p. ej., presentación de patentes de EE.UU. N.° US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Entre los ejemplos de publicaciones relacionadas con variantes de anticuerpos "desfucolizados" o "deficientes en fucosa" se encuentran: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki et ál. *J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et ál. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004). Entre los ejemplos de líneas celulares capaces de producir anticuerpos desfucolizados se encuentran las células CHO Lec 13 sin fucolización de proteínas (Ripka et ál. *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); Presentación de patente de EE.UU. N.º US 2003/0157108 A1, Presta, L; y WO 2004/056312 A1, Adams *et ál*., en espacial en el ejemplo 11) y líneas celulares knockout, tales como el gen alfa-1,6-fucolsiltransferasa, *FUT8, células de* knockout CHO (consulte, por ejemplo a Yamane-Ohnuki et ál. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004); Kanda, Y. et ál*., Biotechnol. Bioeng*., 94(4):680-688 (2006); y WO2003/085107).

También se proporcionan variantes de los anticuerpos anti-CD3 con oligosacáridos bisectados, por ejemplo, en los cuales se bisecta con GIcNAc un oligosacárido biantenario ligado a la región Fc del anticuerpo. Es posible que tales variantes hayan reducido la fucosilación y/o mejorado la función de la ADCC. Se describen ejemplos de tales variantes de anticuerpos, p.ej., en WO 2003/011878 (Jean-Mairet et ál.), Presentación de patente de EE.UU. N.º 6.602.684 (Umana et ál.) y US 2005/0123546 (Umana *et ál.*). También se proporcionan variantes de anticuerpos con al menos un residuo de galactosa en el oligosacárido unido a la región Fc. Es posible que estas variantes de anticuerpos hayan mejorado la función de la CDC. Estas variantes de anticuerpos se describen, por ejemplo, en WO 1997/30087 (Patel et ál.), WO 1998/58964 (Raju, S.) y WO 1999/22764 (Raju, S.).

c. Variantes de la región Fc

En algunas versiones, se puede introducir una o más modificaciones a los amino ácidos en la región Fc de un anticuerpo anti-CD3 de la invención (por ejemplo, un anticuerpo anti-CD3 biespecífico de la invención que se une al CD3 y a una segunda molécula biológica, p.ej., a un antígeno de superficie celular, un antígeno tumoral, como un anticuerpo TDB de la invención o sus mismas variantes), por lo tanto se genera una variante de la región Fc (consulte, p.ej., US 2012/0251531). La variante de la región Fc puede comprender una secuencia de la región Fc humana, p.ej., una región Fc humana IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, que incluye una modificación a un amino ácido, p.ej., una

sustitución, en una o más posiciones de amino ácidos.

En algunas versiones, la invención contempla una variante del anticuerpo anti-CD3 que posee algunas pero no todas las funciones de efector, lo que la convierte en una buena candidata para las presentaciones en las que si bien la semivida del anticuerpo *in vivo* es importante, algunas funciones de efector son innecesarias o perjudiciales, como un complemento o una ADCC. *También es posible realizar ensayos de citotoxicidad* in vitro *y/o* in vivo para confirmar la reducción/agotamiento de la actividades de la CDC y/o de la ADCC. Por ejemplo, es posible realizar ensayos de unión de receptores Fc (FcR) para garantizar que el anticuerpo carece de unión FcγR (por lo tanto, es probable que carezca de actividad ADCC), pero sigue manteniendo la capacidad de unión FcRn. Las células primarias para la mediación de ADCC, células NK, expresan Fc(RIII solamente, mientras que los monocitos expresan Fc(RI, Fc(la expresión de FcR RII y Fc(RIII. Fen células hematopopéyicas se resume en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991). Se presentan ejemplos, no restrictivos, de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad de la ADCC de una molécula de interés, en la patente de EE.UU. N.º 5.500.362 (consulte, p.ej., Hellstrom, I., et ál. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83:7059-7063 (1986)) y Hellstrom, I et ál., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82:1499-1502 (1985); 5,821,337 (consulte Bruggemann, M. et ál., *J. Exp. Med.* 166:1351-1361 (1987)). Por otra parte, se pueden utilizar métodos de determinación no radioactivos (consulte, p.ej., el ensayo de citotoxicidad no radiactivo ACTI™ para la citometría de flujo (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA; y el ensayo de citotoxicidad no radiactivo CytoTox 96® (Promega, Madison, WI). La células efectoras útiles para estos ensayos incluyen las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células asesinas naturales (NK). Por otro lado, o adicionalmente, se puede determinar la actividad de la ADCC de la molécula de interés *in vivo*, p.ej., en un modelo de animal como el que presenta Clynes et ál. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 95:652-656 (1998). También se pueden realizar ensayos de unión de C1q para confirmar que el anticuerpo es incapaz de unir C1q, y, en consecuencia, carece de actividad CDC. Consulte, p.ej. el método ELISA de unión C1q y C3c en WO 2006/029879 y en WO 2005/100402. A fin de evaluar la activación del complemento, se puede realizar un ensayo de CDC (consulte, por ejemplo, Gazzano-Santoro *et ál. J. Immunol. Métodos* 202:163 (1996); Cragg, M.S. et ál. *Blood.* 101:1045-1052 (2003); y Cragg, M.S. y M.J. Glennie *Blood.* 103:2738-2743 (2004)). Los ensayos de la unión FcRn y la eliminación/semivida *in vivo* también pueden realizarse con métodos conocidos (consulte, p.ej. Petkova, S.B. et ál. *Int'l. Immunol.* 18(12):1759-1769 (2006)).

Los anticuerpos con función de efector disminuida incluyen aquellos con sustitución de uno o más de los residuos de las región Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 (de las patentes de EE.UU. N.° 6.737.056 y 8.219.149). Estos mutantes Fc incluyen mutantes Fc con sustituciones en dos o más posiciones de aminoácidos 265, 269, 270, 297 y 327, incluido el mutante Fc llamado "DANA" con sustitución en los residuos 265 y 297 a la alanina (patente de EE.UU. N.° 7.332.581 y 8.219.149).

En algunas versiones, se sustituye la prolina en la posición 329 de una región Fc humana en estado natural en el anticuerpo con glicina o arginina o un residuo de aminoácido lo suficientemente grande para destruir el sandwich de prolina dentro de la interfaz del receptor Fc/Fc.gamma. que se forma entre la prolina 329 del Fc y los residuos triptófanos Trp 87 y Trp 110 de FcgRIII (Sondermann et ál.: Nature 406, 267-273 (20 de julio 2000)). En algunas versiones, el anticuerpo incluye al menos una sustitución más de aminoácido. En una versión, la sustitución adicionada de aminoácido es S228P, E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297D o P331S, e incluso en otra versión, la sustitución adicionada de aminoácido es L234A y L235A de la región humana Fc IgG1 o S228P y L235E de la región humana Fc IgG4 (consulte, p.ej., US 2012/0251531) e incluso en otra versión, la sustitución adicionada de aminoácido es L234A y L235A y P329G de la región humana Fc IgG1.

Se describen ciertas variantes de anticuerpo con unión a FcR mejorada o disminuida (consulte, p.ej., Patente de EE.UU. N.º 6.737.056; WO 2004/056312, y Shields et ál.*, J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001)).

En algunas versiones, una variante de anticuerpo incluye una región Fc con una o más sustituciones de aminoácidos que mejoran la ADCC, p.ej., sustituciones en las posiciones 298, 333, y/o 334 de la región Fc (numeración de residuos de la UE).

En algunas versiones, las alteraciones se realizan en la región Fc que resultan en la unión de C1q alterada (es decir, mejorada o disminuida) y/o en Citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), p.ej., como lo describe la Patente de EE.UU. N.º 6.194.551, WO 99/51642 e Idusogie et ál. *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

Los anticuerpos con semividas aumentadas y unión mejorada para el receptor Fc neonatal (FcRn), el cual es responsable de la transferencia de IgC materno al feto (Guyer et ál, *J. Immunol.* 117:587 (1976) y Kim et ál., *J. Immunol.* 24:249 (1994)), se describen en US2005/0014934A1 (Hinton et ál.). Esos anticuerpos incluyen una región Fc con una o más sustituciones ahí mismo que mejoran la unión de la región Fc con FcRn. Tales variantes Fc incluyen aquellas con sustituciones en uno o más residuos de la región Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 o 434, p.ej., sustitución del residuo de la región Fc 434 (patentes de EE.UU. N.° 7.371.826).

También consulte Duncan & Winter, *Nature* 322:738-40 (1988), patente de EE.UU. N.° 5.648.260, patente de EE.UU. N.° 5.624.821 y WO 94/29351 en relación a otros ejemplos de las variantes de la región Fc.

En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD3 (p.ej., el anticuerpo anti-CD3 bioespecífico) contiene una región Fc que incluye una mutación N297G. En algunos entornos, el anticuerpo anti-CD3 que incluye la mutación N297G comprende un grupo de anti-CD3 que está compuesto por un primer dominio de unión que consta de las siguientes seis RHV: (a) una RHV-H1 que comprende una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 1; (b) una RHV-H2 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 2; (c) una RHV-H3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de

SEC.: 3; (d) una RHV-L1 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 4; (e) una RHV-L2 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 5; y (f) una RHV-L3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 6; y un grupo anti-CD20 que consiste en un segundo dominio de unión que incluye los siguientes seis RHV: (a) un RHV-H1 que comprende la secuencia de amino ácido con N.º de ID de SEC.: 157; (b) una RHV-H2 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 158; (c) una RHV-H3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 159; (d) una RHV-L1 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 160; (e) una RHV-L2 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 161; y (f) una RHV-L3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 162.

En algunas versiones, el anticuerpo anti-CD3 que incluye la mutación N297G comprende un grupo de anti-CD3 que está compuesto por un primer dominio de unión que consta de (a) una HV que comprende una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 184 y (b) un dominio de VL que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 185 y un grupo anti-CD20 que comprende un segundo dominio de unión que consta de (a) un dominio de HV que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 266 y (b) un dominio de VL que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 267.

En algunas versiones, el anticuerpo anti-CD3 que incluye la mutación N297G puede comprender uno o más dominios constantes de cadenas pesadas, donde el o los dominios constantes de cadenas pesadas son seleccionados de un primer dominio CH1 ($CH1_1$), un primer dominio CH2 ($CH2_1$), un primer dominio CH3 ($CH3_1$), un primer dominio CH1 ($CH1_2$), un segundo dominio CH2 ($CH2_2$) y un segundo dominio CH3 ($CH3_2$). En algunas ocasiones, al menos uno o los dominios constantes de cadenas pesadas está emparejado con otro dominio constante de cadenas pesadas. En algunas ocasiones, los dominios $CH3_1$ y $CH3_2$ comprenden una protuberancia o una cavidad, donde la protuberancia o cavidad en el dominio $CH3_1$ puede posicionarse en la cavidad o la protuberancia respectiva del dominio $CH3_2$. En algunas ocasiones, los dominios $CH3_1$ y $CH3_2$ se encuentran en una interfaz entre la protuberancia y cavidad mencionadas. En algunas ocasiones, los dominios $CH2_1$ y $CH2_2$ comprenden una protuberancia o una cavidad, donde la protuberancia o cavidad en el dominio $CH2_1$ puede posicionarse en la cavidad o la protuberancia respectiva del dominio $CH2_2$. En otras ocasiones, los dominios $CH2_1$ y $CH2_2$ se encuentran en una interfaz entre la protuberancia y cavidad mencionadas. En algunas ocasiones, el anticuerpo anti-CD3 es un anticuerpo IgG1.

En otras versiones, el anticuerpo anti-CD3 que incluye la mutación N297G comprende un grupo de anti-CD3 que está compuesto por un primer dominio de unión que consta de (a) una HV que comprende una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 184 y (b) un dominio de VL que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 185 y un grupo anti-CD20 que comprende un segundo dominio de unión que consta de (a) un dominio de HV que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de

SEC.: 266 y (b) un dominio de VL que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 267, donde (a) el grupo anti-CD3 comprende mutaciones por sustitución de T366S, L368A, Y407V y N297G y (b) el grupo anti-CD20 comprende mutaciones por sustitución de T366W y N297G.

d. Variantes de anticuerpos creados con cisteína

En ciertas versiones, es posible querer crear anticuerpos creados con cisteína, p.ej., "thioMAbs", en el cual se sustituye uno o más residuos de un anticuerpo con residuos de cisteína. En versiones particulares, los residuos sustituidos ocurren en sitios accesibles del anticuerpo. La sustitución de esos residuos con cisteína hace que los grupos de tiol se posicionen ahí mismo en sitios accesibles del anticuerpo y pueden utilizarse para conjugar el anticuerpo con otras fracciones, como fracciones de medicamentos o fracciones de medicamentos de enlace para crear un inmunoconjugado, como se describe más adelante. En algunas versiones, se puede sustituir con cisteína a uno o más de los siguientes residuos: V205 (numeración Kabat) de la cadena ligera, A118 (numeración de la UE) de la cadena pesada y S400 (numeración de la UE) de la cadena pesada de la región Fc. Es posible generar anticuerpos creados con cisteína de acuerdo a lo descrito en, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N.° 7.521.541.

e. Derivados de anticuerpos

En algunas versiones, se puede introducir una o más modificaciones al anticuerpo anti-CD3 de la invención (p.ej., un anticuerpo anti-CD3 biespecífico de la invención que se une al CD3 y a una segunda molécula biológica, p.ej., a un antígeno de superficie celular, un antígeno tumoral, como un anticuerpo TDB de la invención o sus mismas variantes) para que dispongan de fracciones no protéicas conocidas y disponibles. Las fracciones adecuadas capaces de ser derivadas del anticuerpo incluyen pero no se limitan a polímeros solubles en agua. Ejemplos no restrictivos de polímeros solubles en agua incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/polietilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrán, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, poli-1, 3-dioxolano, poli-1, 3, 6-trioxano, copolímero de anhidro maleico/etileno, poliaminoácidos (ya sean homopolímeros o copolímeros aleatorios) y polietilenglicol de dextrán o poli (n-vinil pirrilidona), homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de etileno/óxido de polipropileno, poliol polioxietilado (p.ej., glicerol), alcohol polivinílico y mezclas correspondientes. Los propionaldehídos de polietilenglicol pueden presentar ventajas en el proceso de fabricación debido a su estabilidad en el agua. El polímero puede presentar un cierto peso molecular y puede estar o no ramificado. El número de polímeros ligados al anticuerpo puede variar y, si se liga más de un polímero, pueden ser la misma o diferentes moléculas. En general, el número y/o tipo de polímeros utilizados para derivar puede determinarse con base en consideraciones que incluyen, pero no se limitan a, las propiedades particulares o funciones del anticuerpo que deben mejorarse, ya sea que el derivado del anticuerpo se

utilizará en una terapia bajo determinadas condiciones, etc.

En otra versión, se proporcionan los conjugados de un anticuerpo y la fracción no proteica que puede ser calentada por selección mediante la exposición a radiación. En una versión, la fracción no proteica es un nanotubo de carbono (Kam et ál., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102: 11600-11605 (2005)). La radiación puede ser de cualquier longitud de onda, pero no se limita a longitudes de onda que no dañan células ordinarias, pero que calientan la fracción no proteica a una temperatura en la que se mata a las células próximas a la fracción no proteica del anticuerpo.

B. Métodos recombinantes y composiciones

Es posible producir con los métodos recombinantes y las composiciones anticuerpos anti-CD3 de la invención (p. ej., los anticuerpos anti-CD3 biespecíficos de la invención que se unen a CD3 y a una segunda molécula biológica como, p. ej., el antígeno de la superficie celular, p. ej., el antígeno de un tumor, como los anticuerpos TDB de la invención o las variantes correspondientes), según lo descrito en la patente de EE.UU. N.° 4.816.567. En una versión, se presenta el ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-CD3 aquí descrito. Tal ácido nucleico puede codificar una secuencia de aminoácidos que incluye el VL y/o una secuencia de aminoácidos que incluye el VH del anticuerpo (p.ej. las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo). En otra versión, se presentan uno o más vectores (p.ej., los vectores de expresión) que incluyen el mencionado ácido nucleico. En otra versión, se presenta una célula huésped que incluye el mencionado ácido nucleico. En una de dichas versiones, una célula huésped consta de (p.ej., fue transformada con): (1) un vector que consta de un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que consta del VL del anticuerpo y una secuencia de aminoácidos que consta del VH del anticuerpo o (2) un primer vector que consta de un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que consta del VL de un anticuerpo y un segundo vector que consta de un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que consta del VH del anticuerpo. En una versión, la célula huésped es eucariota, p.ej., la célula del ovario de un hamster chino (CHO) o una célula linfoide (p.ej., la célula Y0, NS0, Sp20). En una versión, se presenta el método para formar un anticuerpo anti-CD3, donde el método comprende el cultivo de una célula huésped que consta de un ácido nucleico que codifica al anticuerpo, como se presenta arriba, en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo y, de manera optativa, recupera el anticuerpo de la célula huésped (o el medio de cultivo de la célula huésped).

Para la producción recombinante de un anticuerpo anti-CD3, se aísla e inserta ácido nucleico codificante de un anticuerpo, como se describe anteriormente, en uno o más vectores para una clonación y/o expresión adicional en una célula huésped. Es posible aislar y secuenciar dicho ácido nucleico fácilmente por medio de procedimientos convencionales (p. ej., mediante sondas oligonucleótidas que son capaces de unirse específicamente a genes codificantes de las cadenas pesadas y livianas del anticuerpo).

Dentro de las células huésped consideradas apropiadas para la clonación o expresión de

los vectores codificantes de anticuerpos se incluyen las células procariotas y eucariotas que se describen en el presente. Por ejemplo, es posible producir anticuerpos en bacterias, en particular, cuando no se requiere glucosilación ni la función efectora de Fc. Para la expresión de fragmentos de anticuerpos y polipéptidos en bacterias, véase, p. ej., los siguientes números de las patentes de EE.UU.: 5,648,237, 5,789,199, y 5,840,523. (Véase, a su vez, Charlton, *Methods in Molecular Biology, Vol. 248* (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), págs. 245-254, descripción de la expresión de fragmentos de anticuerpos en *E. coli*.) Después de la expresión, es posible aislar el anticuerpo de la pasta de células bacterianas en una fracción soluble y se puede purificar aún más.

Además de las procariotas, los microbios eucariotas tales como los hongos filamentosos o las levaduras son huéspedes adecuados de clonación o expresión para vectores codificantes de anticuerpos como, por ejemplo, cepas de hongos o levaduras cuyas vías de glucosilación se han "humanizado", resultando, así, en la producción de un anticuerpo con un patrón de glucosilación parcialmente o totalmente humano. Véase Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004), y Li et al., *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006).

Las células huésped consideradas apropiadas para la expresión de anticuerpos glicosilados se derivan, a su vez, de organismos pluricelulares (invertebrados y vertebrados). Entre los ejemplos de células de invertebrados se incluyen las células de los insectos y de las plantas. Se han identificado numerosas cepas baculovirales que se pueden usar en conjunción con las células de los insectos, especialmente para la transfección de las células de la *Spodoptera frugiperda*.

A su vez, es posible usar los cultivos de las células vegetales como huéspedes. *Véase, p. ej.*, los siguientes números de las patentes de EE.UU.: 5,959,177, 6,040,498, 6,420,548, 7,125,978, y 6,417,429 (descripción de la tecnología PLANTIBODIES™ para la producción de anticuerpos en plantas transgénicas).

Las células de los vertebrados también se pueden usar como huéspedes. Por ejemplo, las líneas celulares de los mamíferos que se adaptan para crecer en suspensión pueden resultar útiles. Algunos ejemplos de aquellas líneas celulares huésped de los mamíferos que pueden resultar útiles son: una línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7); una línea de riñón embrionario humano (293 o células 293, como se describe, p. ej., en Graham et al., *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); células de riñón de hámster neonato (BHK); células de Sertoli de ratón (células TM4, como se describe, p. ej., en Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1); células de riñón de mono verde africano (VERO-76); células de carcinoma cervical humano (HELA); células de riñón canino (MDCK); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A); células de pulmón humano (W138); células de hígado humano (Hep G2); tumor mamario de ratón (MMT 060562); células TRI, como se describe, p. ej., en Mather et al*., Annals N.Y. Acad. Sci*. 383:44-68 (1982); células MRC 5; y células FS4. Entre otras de las líneas celulares huésped de los mamíferos que pueden resultar útiles se incluyen las células del ovario del hámster chino (CHO), incluidas las células DHFR-CHO (Urlaub et al., Proc. *Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 77:4216 (1980)); y las líneas celulares de mieloma como, por ejemplo, Y0,

NS0 y Sp2/0. Para una revisión de ciertas líneas celulares huésped de los mamíferos que resultan apropiadas para la producción de anticuerpos, véase, p. ej., Yazaki y Wu, *Methods in Molecular Biology, Vol. 248* (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), págs. 255-268 (2003).

C. Ensayos

Es posible identificar, seleccionar o caracterizar los anticuerpos anti-CD3 de la invención (p. ej., los anticuerpos anti-CD3 biespecíficos de la invención que se unen a CD3 y a una segunda molécula biológica como, p. ej., el antígeno de la superficie celular, p. ej., el antígeno de un tumor, como los anticuerpos TDB de la invención o las variantes correspondientes) que se proporcionan en el presente en relación con sus propiedades químicas o físicas y/o las actividades biológicas por medio de varios ensayos conocidos en la materia.

1. Ensayos de unión y demás ensayos

En un aspecto, se prueba un anticuerpo anti-CD3 de la invención en relación con su actividad de unión de antígenos, por ejemplo, a través de métodos tales como ELISA, Western blot, etc.

En otro aspecto, es posible usar ensayos de competencia para identificar un anticuerpo que compite con un anticuerpo anti-CD3 de la invención para la unión con el CD3.

En un ensayo ejemplar de competición, se incuba el CD3 inmovilizado en una solución que comprende un primer anticuerpo etiquetado que se une al CD3 y un segundo anticuerpo no etiquetado que se analiza en relación con su capacidad para competir con el primer anticuerpo en la unión al CD3. El segundo anticuerpo se puede encontrar presente en un hibridoma sobrenadante. A modo de control, se incuba el CD3 inmovilizado en una solución que comprende un primer anticuerpo etiquetado, pero no así el segundo anticuerpo no etiquetado. Después de la incubación bajo condiciones permisivas para la unión del primer anticuerpo al CD3, se elimina el anticuerpo excedente sin unir y se mide la cantidad de etiquetas asociadas al CD3 inmovilizado. Si la cantidad de etiquetas asociadas al CD3 inmovilizado es significativamente más reducida en la muestra de la prueba relativa a la muestra de control, esto indica, entonces, que el segundo anticuerpo compite con el primer anticuerpo en la unión con el CD3. Véase, p. ej., Harlow y Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cap.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

2. Ensayos de actividad

En un aspecto, se proporcionan ensayos para la identificación de los anticuerpos anti-CD3 correspondientes con actividad biológica. La actividad biológica puede incluir, por ejemplo, la unión al CD3 (p. ej., CD3 en la superficie de una célula T) o un fragmento peptídico correspondiente, ya sea *in vivo*, *in vitro*, o *ex vivo*. En el caso de un anticuerpo anti-CD3 multiespecífico (p. ej., biespecífico) de la invención (p. ej., un anticuerpo TDB

con un brazo anti-CD3 y un brazo que reconoce una segunda molécula biológica, p. ej., un antígeno de la superficie celular, p. ej., un antígeno de un tumor), la actividad biológica puede incluir, a su vez, activación de la célula efectora (p. ej., activación de la célula T (p. ej., CD8+ y/o CD4+ célula T)), expansión de la población de células efectoras (es decir, una reducción en la población de las células que expresan la segunda molécula biológica en su superficie celular), y/o matanza de las células objetivo. Se proporcionan los anticuerpos con dicha actividad biológica *in vivo* y/o *in vitro.* En ciertas realizaciones, un anticuerpo de la invención se analiza en relación con dicha actividad biológica, como se describe en detalle en los Ejemplos que se encuentran a continuación.

En algunas representaciones, la actividad comprende la capacidad de sostener la eliminación de células B y/o la activación de células T citotóxicas. En ciertas representaciones, se evalúan las células anti-B que buscan anticuerpos anti-CD3 de la invención (tales como una TDB anti-CD20) para tal eliminación de células B y/o la activación del efecto citotóxico de la actividad de las células T biológicas mediante cualquiera de los métodos aquí descritos, en particular los exjemplos. En algunas representaciones de cualquiera de los ensayos de estas actividades, las PBMC pueden aislarse a partir de sangre entera de donantes saludables por separación Ficoll. Particularmente, la sangre de seres humanos puede extraerse en jeringas con heparina y las PBMC aisladas con Leucosep y Ficoll Paque Plus. De ser necesario, se pueden separar las células CD4+T y CD8+T con kits Miltenyi conforme las instrucciones del fabricante.

Además, las células pueden lavarse en un medio de RPMI con un 10% de FBS, suplementado con GlutaMax, penicilina y estreptomicina; y se agregaron ~0,2 millones de células suspendidas a una placa con fondo en U de 96 pocillos. Las células pueden cultivarse en RPMI 1640 suplementado con 10% de FBS a 37 °C en una incubadora de cultivo de células estándar humidificada. Para los ensayos de eliminación de células BJAB, se pueden incubar 20.000 células BJAB con células efectoras, ya sea células T purificadas o huPBMC, como lo indican las proporciones según el ensayo, en presencia de diversas concentraciones de anticuerpos TDB durante 24 horas. Para los ensayos de eliminación de células B endógenas, se pueden incubar 200.000 huPBMC en diversas concentraciones de anticuerpos TDB durante 24 horas.

Tras el cultivo, las células pueden lavarse con un tampón FACS (BSA al 0.05 %, azida de Na al 0.05 % en PBS) y suspenderse en 100µl de un tampón FACS con 1 µg/ml de yoduro de propidio. Los datos pueden recopilarse en un citómetro de flujo FACSCalibur y analizarse con FlowJo. Las células B vivas pueden descartarse como células PI-CD19 o PI-CD20+B mediante FACS y puede obtenerse el recuento de células absoluto con perlas FITC agregadas a la mezcla de la reacción como control de recuento interno. El porcentaje (%) de eliminación de células puede calcularse con base en los controles no tratados con TDB. Las células T activadas se pueden detectar por la expresión de superficie de CD69 y CD25 mediante el uso de anti-CD69-FITC y anti-CD25-PE.

D. Inmunoconjugados

La invención, a su vez, proporciona inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo

anti-CD3 que se conjuga a uno o más agentes citotóxicos, tales como medicamentos o agentes quimioterapéuticos, agentes inhibidores del crecimiento, toxinas (p. ej., toxinas proteicas, toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal, o animal, o fragmentos de la misma), o isotopos radioactivos.

En una realización, un inmunoconjugado es un conjugado de anticuerpo y fármaco (ADC) donde se conjuga un anticuerpo a uno o más medicamentos, que incluye, pero no se limita a, un maitansinoide (véase los siguientes números de las patentes de EE.UU.: 5,208,020, 5,416,064 y la patente europea EP 0 425 235 B1); una auristatina como, por ejemplo, las fracciones DE y DF del fármaco monometil auristatina (MMAE y MMAF) (véase los siguientes números de las patentes de EE.UU.: 5,635,483 y 5,780,588, y 7,498,298); una dolastatina; una calicheamicina o derivado de la misma (véase los siguientes números de las patentes de EE.UU.: 5,712,374, 5,714,586, 5,739,116, 5,767,285, 5,770,701, 5,770,710, 5,773,001, y 5,877,296; Hinman et al., *Cancer Res.* 53:3336-3342 (1993); y Lode et al., *Cancer Res.* 58:2925-2928 (1998)); una antraciclina como, por ejemplo, daunomicina o doxorrubicina (véase Kratz et al., *Current Med. Chem.* 13:477-523 (2006); Jeffrey et al., *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 16:358-362 (2006); Torgov et al., *Bioconj. Chem.* 16:717-721 (2005); Nagy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 97:829-834 (2000); Dubowchik et al., *Bioorg. & Med. Chem. Letters* 12:1529-1532 (2002); King et al., *J. Med. Chem.* 45:4336-4343 (2002); y el siguiente número de las patentes de EE.UU.: 6,630,579); un metotrexato; una vindesina; un taxano como, por ejemplo, docetaxel, paclitaxel, larotaxel, tesetaxel y ortataxel; un tricoteceno; y CC1065.

En otra realización, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo anti-CD3, como se describe en el presente, conjugado con una toxina enzimáticamente activa o con un fragmento de la misma, que incluye, pero no se limita a, difteria de cadena A, fragmentos activos no vinculantes de la toxina de la difteria, exotoxina de cadena A (a partir de Pseudomonas aeruginosa), ricina de cadena A, abrina de cadena A, modeccina de cadena A, alfa-sarcina, proteínas de Aleurites fordii, proteínas de diantina, proteínas de Phytolacca americana (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de Momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de Saponaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y tricotecenos.

En otra realización, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo anti-CD3, como se describe en el presente, conjugado con un átomo radioactivo para formar un radioconjugado. Se encuentra disponible una variedad de isotopos radioactivos para la producción de radioconjugados. Algunos ejemplos incluyen At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32}, Pb^{212} e isotopos radioactivos de Lu. Cuando el radioconjugado se usa para la detección, puede comprender un átomo radioactivo para los estudios cintigráficos, por ejemplo, tc99m o I123, o una etiqueta de espín para las imágenes por resonancia magnética nuclear (NMR) (también conocida como resonancia magnética (MRI)), como, por ejemplo, iodo-123 nuevamente, iodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

Se puede conjugar un anticuerpo con un agente citotóxico por medio de una variedad de

agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales como, p. ej., N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados de imidoésteres bifuncionales (como, p. ej., dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (como, p. ej., disuccinimidil suberato), aldehídos (como, p. ej., glutareldehído), compuestos bis-azido (como, p. ej., bis (p-azidobenzoil) hexandiamina), derivados bis-diazonio (como, p. ej., bis-(p-diazoniumbenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (como, p. ej., 2,6-diisocianato de tolieno), y compuestos de flúor bis-activos (como, p. ej., 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina según se describe en Vitetta et al., *Science* 238:1098 (1987). El ácido triaminepentaacético 1-isotiocianatobencil-3-metildietileno (MX-DTPA) etiquetado con carbono-14 es un agente quelante ejemplar para la conjugación de radionucleótidos en el anticuerpo. Véase WO94/11026. El enlace puede ser un "enlace escindible" que facilita la liberación de un fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, es posible usar un enlace ácido lábil, un enlace peptídico, un enlace fotolábil, un enlace dimetil o un enlace con contenido de disulfuro (Chari et al., *Cancer Res.* 52:127-131 (1992); Patente de EE.UU. No. 5,208,020).

Los presentes inmunoconjugados o ADCs contemplan expresamente, pero no se limitan a, los conjugados preparados con re-agentes de enlace cruzado, que incluyen, pero no se limitan a, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC, y sulfo-SMPB, y SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfona)benzoato) que se encuentran comercialmente disponibles (p. ej., en Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., EE.UU.).

E. Métodos y composiciones para el diagnóstico y la detección

En ciertas realizaciones, cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 de la invención (p. ej., los anticuerpos anti-CD3 biespecíficos de la invención que se unen a CD3 y a una segunda molécula biológica como, p. ej., un antígeno de la superficie celular, p. ej., el antígeno de un tumor, como los anticuerpos TDB de la invención o las variantes correspondientes) es útil para la detección de la presencia de un CD3 en una muestra biológica. El término "detección", según su uso en el presente, incluye la detección tanto cuantitativa como cualitativa. En ciertas realizaciones, una muestra biológica comprende una célula o un tejido.

En una realización, se proporciona un anticuerpo anti-CD3 para ser usado en un método de diagnóstico o detección. En un aspecto adicional, se suministra un método para la detección de la presencia de un CD3 en una muestra biológica. En ciertas realizaciones, el método implica contactar la muestra biológica con un anticuerpo anti-CD3, según se describe en el presente, bajo condiciones permisivas para la unión del anticuerpo anti-CD3 al CD3, y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo anti-CD3 y el CD3. Dicho método puede ser *in vitro* o *in vivo*.

En ciertas realizaciones, se proporcionan anticuerpos anti-CD3 etiquetados. Las etiquetas incluyen, pero no se limitan a, etiquetas o fracciones que se detectan

directamente (como, por ejemplo, etiquetas fluorescentes, cromofóricas, electrodensas, quimioluminiscentes y radiactivas), como así también fracciones, tales como enzimas o ligandos, que se detectan indirectamente, por ejemplo, a través de una reacción enzimática o de una interacción molecular. Las etiquetas ejemplares incluyen, pero no se limitan a, los radioisótopos ^{32}P, ^{14}C, ^{125}I, ^{3}H, y ^{131}I, fluoróforos como, por ejemplo, quelatos de tierra rara o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, luceriferasas, por ejemplo, la luciferasa de luciérnaga y la luciferasa bacteriana (Patente de EE.UU. No. 4,737,456), luciferina, 2,3-dihidroftalazinedionas, la peroxidasa de rábano rusticano (HRP), la fosfatasa alcalina, la β-galactosidasa, la glucoamilasa, la lisozima, la sacarida, las oxidasas como, por ejemplo, la glucosa oxidasa, la galactosa oxidasa y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, las oxidasas heterocíclicas como, por ejemplo, la uricasa y la xantina oxidasa, acoplada con una enzima que emplea peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor de un tinte como, por ejemplo, HRP, la lactoperoxidasa o la microperoxidasa, biotina/avidina, etiquetas de espín, etiquetas con bacteriófagos, radicales libres estables, y similares.

F. Formulaciones farmacéuticas

Las formulaciones farmacéuticas de un anticuerpo anti-CD3 de la invención (p. ej., el anticuerpo anti-CD3 biespecífico de la invención que se une al CD3 y a una segunda molécula biológica como, por ejemplo, un antígeno de la superficie celular como, p. ej., un antígeno de un tumor, como un anticuerpo TDB de la invención o la variante correspondiente) se preparan al mezclar dicho anticuerpo con el grado deseado de pureza con uno o más portadores farmacéuticamente aceptados de carácter opcional (*Pharmaceutical Sciences de Remington,* 16a edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los portadores farmacéuticamente aceptados son, por lo general, no tóxicos para los receptores en las dosis y las concentraciones empleadas, e incluyen, pero no se limitan a: tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluidos el ácido ascórbico y la metionina, conservantes (como el cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; butil, fenol o alcohol bencílico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m- cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas como, p. ej., albúmina sérica, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos incluyendo glucosa, mañosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; iones formadores de sales como el sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos proteicos de Zn), y/o agentes tensoactivos no iónicos tales como el polietilenglicol (PEG). Los presentes portadores farmacéuticamente aceptables de carácter ejemplar incluyen, a su vez, agentes intersticiales para la dispersión farmacológica tales como glicoproteínas

hialuronidasa solubles activas a pH neutro (sHASEGP), por ejemplo, glicoproteínas hialuronidasa PH-20 solubles en humanos tales como rHuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.). Ciertas sHASEGPs ejemplares y los métodos de uso, incluido rHuPH20, se describen en los siguientes números de las publicaciones de las patentes de EE.UU.: 2005/0260186 y 2006/0104968. En un aspecto, una sHASEGP se combina con uno o más glicosaminoglicanos adicionales como, por ejemplo, las condroitinas.

Las formulaciones de anticuerpos liofilizadas de carácter ejemplar se describen en la patente de EE.UU. No. 6,267,958. Las formulaciones de anticuerpos acuosas incluyen las descriptas en la patente de EE.UU. No. 6,171,586 y WO2006/044908, las últimas formulaciones incluyen un tampón de histidina-acetato.

La presente formulación puede contener, a su vez, más de un ingrediente activo según sea necesario en relación con la indicación específica que se esté tratando, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no se afectan negativamente entre sí. Por ejemplo, podría resultar deseable proporcionar un agente terapéutico adicional (p. ej., un agente quimioterapéutico, un agente citotóxico, un agente inhibidor del crecimiento, y/o un agente anti-hormonal, como los mencionados anteriormente). Dichos ingredientes activos se encuentran presentes de manera apropiada en combinación en cantidades que son efectivas para los propósitos previstos.

Los ingredientes activos se pueden atrapar en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacilato), respectivamente; en sistemas coloidales de suministro de fármacos (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se describen en *Pharmaceutical Sciences de Remington,* 16a edición, Osol, A. Ed. (1980).

Es posible elaborar preparaciones de liberación sostenida. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el anticuerpo, matrices que están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas.

Las formulaciones a usar para la administración *in vivo* son, por lo general, estériles. La esterilidad se puede lograr con facilidad, por ejemplo, por medio de la filtración a través de membranas de filtración estériles.

G. Métodos y composiciones terapéuticos

Es posible usar cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 de la invención (p. ej., los anticuerpos anti-CD3 biespecíficos de la invención que se unen a CD3 y a una segunda molécula biológica como, p. ej., el antígeno de la superficie celular, p. ej., el antígeno de un tumor, como los anticuerpos TDB de la invención o las variantes correspondientes) en los métodos terapéuticos.

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-CD3 para ser usado como un medicamento. En otros aspectos, se proporciona un anticuerpo anti-CD3 para ser usado

en el tratamiento o en el retraso correspondiente al progreso de un trastorno de proliferación celular (p. ej., cáncer) o de un trastorno autoinmunitario (p. ej., artritis). En ciertas realizaciones, se proporciona un anticuerpo anti-CD3 para ser usado en un método de tratamiento. En ciertas realizaciones, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD3 para ser usado en un método de tratamiento de un individuo con un trastorno de proliferación celular o con un trastorno autoinmunitario que comprenda la administración a dicho individuo de una cantidad efectiva del anticuerpo anti-CD3. En una realización de la antes mencionada naturaleza, el método comprende, a su vez, la administración al individuo de una cantidad efectiva de, al menos, un agente terapéutico adicional, según se describe anteriormente. En otras realizaciones, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD3 para ser usado en la mejora de la función inmunitaria de un individuo que padezca un trastorno de proliferación celular o un trastorno autoinmunitario. En ciertas realizaciones, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD3 para ser usado en un método para la mejora de la función inmunitaria de un individuo que padezca un trastorno de proliferación celular o un trastorno autoinmunitario que comprenda la administración al individuo de una cantidad efectiva del anticuerpo anti-CD3 para activar las células efectoras (p. ej., células T, p. ej., CD8+ y/o CD4+ células T), expandir (incrementar) una población de células efectoras, reducir una población de células objetivo (p. ej., una célula que expresa una segunda molécula biológica reconocida por un anticuerpo anti-CD3 de la invención como, por ejemplo, un anticuerpo TDB biespecífico de la invención), y/o matar una célula objetivo (p. ej., célula objetivo de un tumor). Un “individuo”, conforme a cualquiera de las realizaciones anteriores, puede ser un humano.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD3 para ser usado en la fabricación o preparación de un medicamento. En una realización, el medicamento se usa para el tratamiento de un trastorno de proliferación celular (p. ej., cáncer) o de un trastorno autoinmunitario (p. ej., artritis). En una realización adicional, el medicamento es para ser usado en un método de tratamiento de un trastorno de proliferación celular o de un trastorno autoinmunitario que comprenda la administración a un individuo con un trastorno de proliferación celular o con un trastorno autoinmunitario de una cantidad efectiva del medicamento. En una realización de la antes mencionada naturaleza, el método comprende, a su vez, la administración al individuo de una cantidad efectiva de, al menos, un agente terapéutico adicional, según se describe anteriormente. En una realización adicional, el medicamento se usa para activar las células efectoras (p. ej., células T, p. ej., CD8+ y/o CD4+ células T), expandir (incrementar) una población de células efectoras, reducir una población de células objetivo (p. ej., una célula que expresa una segunda molécula biológica reconocida por un anticuerpo anti-CD3 de la invención como, por ejemplo, un anticuerpo TDB biespecífico de la invención), y/o matar células objetivo (p. ej., célula objetivo de un tumor) en el individuo. En una realización adicional, el medicamento es para ser usado en un método para la mejora de la función inmunitaria de un individuo que padezca un trastorno de proliferación celular o un trastorno

autoinmunitario que comprenda la administración al individuo de una cantidad efectiva del medicamento para activar las células efectoras (p. ej., células T, p. ej., CD8+ y/o CD4+ células T), expandir (incrementar) una población de células efectoras, reducir una población de células objetivo (p. ej., una célula que expresa una segunda molécula biológica reconocida por un anticuerpo anti-CD3 de la invención como, por ejemplo, un anticuerpo TDB biespecífico de la invención), y/o matar una célula objetivo (p. ej., célula objetivo de un tumor). Un "individuo", conforme a cualquiera de las realizaciones anteriores, puede ser un humano.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para el tratamiento de un trastorno de proliferación celular (p. ej., cáncer) o de un trastorno autoinmunitario (p. ej., artritis). En una realización, el método comprende la administración al individuo que padezca un trastorno de proliferación celular o un trastorno autoinmunitario de una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-CD3. En una realización de la antes mencionada naturaleza, el método comprende, a su vez, la administración al individuo de una cantidad efectiva de, al menos, un agente terapéutico adicional, según se describe anteriormente. Un "individuo", conforme a cualquiera de las realizaciones anteriores, puede ser un humano.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para la mejora de la función inmunitaria de un individuo que padezca un trastorno de proliferación celular o un trastorno autoinmunitario en un individuo con un trastorno de proliferación celular o con un trastorno autoinmunitario. En una realización, el método comprende la administración al individuo de una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-CD3 para activar las células efectoras (p. ej., células T, p. ej., CD3+ y/o CD8+ células T), expandir (incrementar) una población de células efectoras, reducir una población de células objetivo (p. ej., una célula que expresa una segunda molécula biológica reconocida por un anticuerpo anti-CD4 de la invención como, por ejemplo, un anticuerpo TDB biespecífico de la invención), y/o matar una célula objetivo (p. ej., célula objetivo de un tumor). En una realización, un "individuo" es un humano.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para el tratamiento de un cáncer hematológico tal como un cáncer de células B (por ejemplo, linfoma de células B maduras) por medio de la administración de una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-CD3 de la invención, como un anticuerpo anti-CD3 biespecífico de la invención, como una TDB que busca células anti-B, como un CD20-TDB con un brazo anti-CD3 y un brazo anti-CD20. En un aspecto adicional de la realización, el linfoma de células B maduras es un linfoma no Hodgkin (NHL). En un aspecto adicional de la realización, el NHL es seleccionado del grupo que comprende: linfoma difuso de células B grandes semejantes a las del centro germinal (GCB), linfoma difuso de células B grandes semejantes a la célula B activada (ABC), linfoma folicular (FL), linfoma de células de manto (MCL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfoide crónica (CLL), linfoma de zona marginal (MZL), leucemia linfocítica de célula pequeña (SLL), linfoma linfoplasmacítico (LL), macroglobulinemia de Waldenstrom (WM), linfoma del sistema nervioso central (CNSL),

linfoma de Burkitt (BL), leucemia prolinfocítica de células B, linfoma esplénico de zona marginal, leucemia de células vellosas, linfoma o leucemia esplénico, inclasificable, linfoma esplénico difuso de células B pequeñas de la pulpa roja, variante de leucemia de células vellosas, macroglobulinemia de Waldenstrom, enfermedades de cadenas pesadas, enfermedad de cadenas pesadas alfa, enfermedad de cadenas pesadas gamma, enfermedad de cadenas pesadas μ, mieloma de células plasmáticas, plasmocitoma óseo solitario, plasmocitoma extraóseo, linfoma de zona marginal nodal de tejido linfoide asociado a mucosa (linfoma MALT), linfoma de zona marginal nodal, linfoma de zona marginal nodal pediátrico, linfoma folicular pediátrico, linfoma primario cutáneo de células del centro folicular, linfoma de células grandes B rico en células T/histiocitos, linfoma primario del sistema nervioso central, linfoma cutáneo primario, linfoma tipo pierna, linfoma difuso de células B grandes positivo al virus de Epstein-Barr del anciano, linfoma difuso de células B grandes asociado con la inflamación crónica, granulomatosis linfomatoide, linfoma primario mediastinal de células B (tímico), linfoma de células B grandes intravascular, linfoma de células B grandes positivo al ALK, linfoma plasmablástico, linfoma de células B grandes tras enfermedad de Castleman asociada a infección por virus HHV8, linfoma primario de efusión: linfoma de células B, inclasificable, con características intermedias entre linfoma difuso de células B grandes y linfoma de Burkitt, y linfoma de células B, inclasificable, con características intermedias entre linfoma difuso de células B grandes y linfoma clásico de Hodgkin. En una realización preferente de la invención, el método abarca el tratamiento de un cáncer que comprende linfoma difuso de células B grandes semejantes a las del centro germinal (GCB), linfoma difuso de células B grandes semejantes a la célula B activada (ABC), linfoma folicular (FL), linfoma de células de manto (MCL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfoide crónica (CLL), linfoma de zona marginal (MZL), leucemia linfocítica de célula pequeña (SLL), linfoma linfoplasmacítico (LL), macroglobulinemia de Waldenstrom (WM), linfoma del sistema nervioso central (CNSL), linfoma de Burkitt (BL).

En una realización, el método comprende la administración a un individuo que padezca dicho cáncer hematológico (como un cáncer de células B, por ejemplo, linfoma de células B) de una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-CD3 de la invención, como un anticuerpo TDB biespecífico, como un CD20-TDB que comprende un brazo dirigido a anti-CD20 y un brazo dirigido a anti-CD3. En una realización, un CD20 TDB es co-administrado con rituximab y obinutuzumab.

En una realización adicional, el anticuerpo anti-CD3 de la invención (por ejemplo, el CD20 TDB), con o sin un anticuerpo monoclonal CD20, es administrado con un agente quimioterapéutico y/o un conjugado de anticuerpo y fármaco (ADC). En otra realización, el agente terapéutico es un modificador biológico.

En un aspecto adicional de la invención, el tratamiento adicional comprende un anticuerpo anti-CD20. En una realización, el anticuerpo anti-CD20 es rituximab. En una realización, el anticuerpo anti-CD20 es un anticuerpo B-Ly 1 humanizado. En una

realización, el anticuerpo B-Ly 1 humanizado es obinituzumab. En una realización, el anticuerpo anti-CD20 es ofatumumab, ublituximab, o ibritumomab tiuxetan.

En un aspecto adicional de la invención, el tratamiento adicional comprende un agente alquilante. En una realización, el agente alquilante es 4-[5-[Bis(2-cloroetil)amino]-1-metilbenzimidazol-2-il]ácido butanoico y las sales del mismo. En una realización, el agente alquilante es bendamustina.

En un aspecto adicional de la invención, el tratamiento adicional comprende un inhibidor de BCL-2. En una realización, el inhibidor de BCL-2 es 4-(4-{[2-(4-clorofenil)-4,4-dimetilciclohex-1-en-1-il]metiyl}piperazin-1-il)-N-({3-nitro-4-[(tetrahidro-2H-piran-4-ilmetil)amino]fenil}sulfonil)-2-(1H-pirrolo[2,3-b]piridin-5-iloxi)benzamida y las sales de la misma. En una realización, el inhibidor de BCL-2 es venetoclax (CAS n.°: 1257044-40-8).

En un aspecto adicional de la invención, el tratamiento adicional comprende un inhibidor de fosfoinositida 3-quinasa (PI3K). En una realización, el inhibidor de PI3K inhibe la isoforma delta de PI3K (p.ej. P110δ). En algunas realizaciones, el inhibidor de PI3K es 5-fluoro-3-fenil-2 - [(1S) -1- (7H-purin-6-ilamino) propil] -4 (3H) -quinazolinona y las sales de la misma. En algunas realizaciones, el inhibidor de PI3K es idelalisib (CAS n.°: 870281-82-6). En una realización, el inhibidor de PI3K inhibe las isoformas alfa y delta de PI3K. En algunas realizaciones, el inhibidor de PI3K es 2-{3-[2-(1-isopropil-3-metil-1H-1,2–4-triazol-5-il)-5,6-dihidrobenzo[f]imidazo[1,2-d][1,4]oxazepin-9-il]-1H-pirazol-1-il}-2-metilpropanamida y las sales de la misma.

En un aspecto adicional de la invención, el tratamiento adicional comprende un inhibidor de tirosina quinasa de Bruton (BTK). En una realización, el inhibidor de BTK es1-[(3R)-3-[4-amino-3-(4-fenoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il]piperidin-1-il]prop-2-en-1-ona y las sales de la misma. En una realización, el inhibidor de BTK es ibrutinib (CAS n.°: 936563-96-1).

En un aspecto adicional de la invención, el tratamiento adicional comprende talidomida o un derivado de la misma. En una realización, la talidomida o un derivado de la misma es (RS)-3-(4-amino-1-oxo 1,3-dihidro-2H-isoindol- 2-il) piperidina-2,6-diona y las sales de la misma. En una realización, la talidomida o un derivado de la misma es lendalidomida (CAS n.°: 191732-72-6).

En un aspecto adicional de la invención,el tratamiento adicional comprende una o más de ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina o prednisolona (CHOP). En una realización, el tratamiento adicional comprende además un anticuerpo anti-CD20 según lo antes descrito (p.ej. GA-101 o Rituxan®). Puede utilizarse, sin limitación, cualquiera de los métodos y tratamientos anteriores para cualquier tipo de cáncer, que incluye, por ejemplo, el tratamiento de un cáncer de células B o cáncer de mama.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para el tratamiento de cánceres HER2 positivos. En una realización, el método comprende la administración a un individuo que padezca dicho cáncer de una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-HER2 de la invención, como un anticuerpo TDB biespecífico, con un brazo dirigido anti-

HER2 y un brazo dirigido anti-CD3. En una realización preferente, el HER2-TDB posee un perfil de toxicidad aceptable cuando se lo administra en una dosis efectiva al paciente. En una realización, el brazo CD3 del HER2-TDB con un perfil de toxicidad aceptable es un brazo CD3 de baja afinidad. En una realización, el brazo CD3 del HER2-TDB con un perfil de toxicidad aceptable es 40G5c.

En una realización preferente, el cáncer HER2 positivo es un cáncer de mama HER2 positivo o cáncer gástrico HER2 positivo. En una realización, un HER2 TDB es co-administrado con uno o más agentes terapéuticos adicionales que se dirigen a la vía HER. En una realización, el agente terapéutico que se dirige a la vía HER es seleccionado de un inhibidor EGFR, un inhibidor HER2, un inhibidor HER3, y/o un inhibidor HER4. En una realización, un HER2 TDB es co-administrado con uno o más agentes terapéuticos adicionales seleccionados de trastuzumab (Herceptin®), T-DM1 (Kadcyla®) y pertuzumab (Perjeta®). En una realización, un HER2 TDB es co-administrado con trastuzumab. En una realización, un HER2 TDB es co-administrado con T-DM1. En una realización, un HER2 TDB es co-administrado con pertuzumab. En una realización, un HER2 TDB es co-administrado con trastuzumab y pertuzumab. En una realización, un HER2 TDB es co-administrado con T-DM1 y trastuzumab.

En un aspecto adicional, la invención proporciona formulaciones farmacéuticas que comprenden alguno de los anticuerpos anti-CD3 previstos en el presente, p.ej. para utilizar en alguno de los métodos clínicos anteriores. En una realización, una fórmula farmacéutica comprende alguno de los anticuerpos anti-CD3 previstos en el presente y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización, una formulación farmacéutica comprende alguno de los anticuerpos anti-CD3 previstos en el presente y, al menos, un agente clínico adicional, por ejemplo, según lo descrito en el presente.

Los anticuerpos de la invención pueden utilizarse solos o en combinación con otros agentes en un tratamiento. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención puede coadministrarse con, al menos, un agente clínico adicional. En ciertas realizaciones, un agente clínico adicional es un agente quimioterapéutico, agente inhibidor del crecimiento, agente citotóxico, agente utilizado en terapia de radiación, agente anti-angiogénesis, agente apoptótico, agente anti-tubulina, u otro agente, tal como un antagonista del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (p.ej. un inhibidor de tirosina quinasa), inhibidor de HER1 / EGFR (p.ej. erlotinib (Tarceva*TM*), inhibidor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (p.ej. Gleevec*TM* (mesilato de imatinib)), un inhibidor de la COX-2 (p.ej. celecoxib), interferón, citoquinas, anticuerpos que no sean el anticuerpo anti-CD3 de la invención, como un anticuerpo que se une a uno o más de los siguientes receptores ErbB2, ErbB3, ErbB4, PDGFR-beta, BlyS, APRIL, BCMA VEGF, o VEGF objetivo, TRAIL/Apo2, PD-1, PD-L1, PD-L2, u otro agente bioactivo o de química orgánica.

En algunas modalidades, la invención proporciona un método en el que el agente clínico adicional es un glucocorticoide. En una realización, el glucocorticoide es dexametasona.

Dichas terapias de combinación indicadas anteriormente abarcan la administración

combinada (donde dos o más agentes clínicos se incluyen en las mismas formulaciones o formulaciones separadas) y la administración separada, en cuyo caso, se pueden producir la administración del anticuerpo de la invención antes, simultáneamente, o después de la administración del agente o agentes clínicos adicionales. En una realización, la administración del anticuerpo anti-CD3 y la administración de un agente clínico adicional se producen en un mes o en el plazo de aproximadamente una, dos o tres semanas, o en aproximadamente uno, dos, tres, cuatro, cinco, o seis días, el uno del otro. También se puede usar cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 de la invención (p. ej., los anticuerpos anti-CD3 biespecíficos de la invención que se unen a CD3 y a una segunda molécula biológica como, p. ej., el antígeno de la superficie celular, el antígeno de un tumor, como el anticuerpo TDB de la invención o la variante correspondiente) en combinación con el tratamiento de radiación.

Un anticuerpo de la invención (o cualquier agente clinico adicional) se puede administrar por cualquier medio adecuado, que incluye parenteral, intrapulmonar e intranasal, y, si se desea para el tratamiento local, la administración intralesional. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, o subcutánea. En algunas representaciones, el anticuerpo se administra por vía subcutánea. En algunas representaciones, el anticuerpo anti-CD3 que se daministra mediante inyección subcutánea exhibe una respuesta menos tóxica en el paciente en que el mismo anticuerpo anti-CD3 le es administrado por inyección intravenosa. La dosis puede administrarse por cualquier vía adecuada, por ejemplo, mediante inyecciones, como inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica. En el presente se contemplan varios cronogramas de administración de la dosis que incluyen, por ejemplo, administraciones únicas o múltiples, en diversos puntos de tiempo, administración en bolo e infusión de pulso.

Los anticuerpos de la invención se formularían, dosificarían y administrarían de manera coherente con la buena práctica médica. Los factores a considerar en este contexto incluyen el trastorno particular a tratar, el mamífero específico que se trata, la condición clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de suministro del agente, el método de administración, el cronograma de la administración y otros factores conocidos por los médicos. El anticuerpo no necesariamente debe ser, pero se formula opcionalmente con uno o más agentes utilizados en la actualidad para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad del anticuerpo presente en la formulación, el tipo de trastorno o tratamiento y otros factores analizados anteriormente. En general, se utilizan en las mismas dosis y vías de administración que se describen en el presente, o aproximadamente del 1 al 99% de las dosis descritas en el presente, o en cualquier dosis y por cualquier vía que se determine que es empíricamente/clínicamente adecuada.

Para la prevención o el tratamiento de la enfermedad, la dosis adecuada de un anticuerpo de la invención (cuando se usa solo o en combinación con uno o más de otros

agentes clínicos adicionales) dependerá del tipo de enfermedad a tratar, el tipo de anticuerpo, la gravedad y el curso de la enfermedad, si el anticuerpo se administra con fines preventivos o clínicos, tratamiento previo, la historia clínica del paciente y la respuesta al anticuerpo, y la discreción del médico tratante. El anticuerpo se administra convenientemente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos.

Como propuesta general, la cantidad clínicamente eficaz del anticuerpo anti-CD3 administrada a humanos estará en el rango de alrededor de 0,01 a 100 mg/kg del peso corporal del paciente ya sea mediante una o más administraciones. En algunas realizaciones, el anticuerpo utilizado es de alrededor de 0,01 a 45 mg/kg, alrededor de 0,01 a 40 mg/kg, alrededor de 0,01 a 35 mg/kg, alrededor de 0,01 a 30 mg/kg, alrededor de 0,01 a 25 mg/kg, alrededor de 0,01 a 20 mg/kg, alrededor de 0,01 a 15 mg/kg, alrededor de 0,01 a 10 mg/kg, alrededor de 0,01 a 5 mg/kg, o alrededor de 0,01 a 1 mg/kg administrador diariamente, por ejemplo. En una realización, un anticuerpo anti-CD3 descrito en el presente se administra a humanos a una dosis de alrededor de 100 mg, alrededor de 200 mg, alrededor de 300 mg, alrededor de 400 mg, alrededor de 500 mg, alrededor de 600 mg, alrededor de 700 mg, alrededor de 800 mg, alrededor de 900 mg, alrededor de 1000 mg, alrededor de 1100 mg, alrededor de 1200 mg, alrededor de 1300 mg o alrededor de 1400 mg el día 1 de los ciclos de 21 días. La dosis puede administrarse como una dosis única o con dosis múltiples (p.ej. 2 o 3 dosis), como infusiones. Para las dosis repetidas durante varios días o más, según la condición, el tratamiento se mantendría, en general, hasta que se produzca una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Una dosis ejemplar del anticuerpo estaría en el rango de alrededor de 0,05 mg/kg a alrededor de 10 mg/kg. Por lo tanto, una o más dosis de alrededor de 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas) podría administrarse al paciente. Dichas dosis pueden administrarse intermitentemente, por ejemplo, cada semana o cada tres semanas (p.ej. de modo tal que el paciente reciba de aproximadamente dos a unas veinte o, por ejemplo, alrededor de seis dosis del anticuerpo anti-CD3). Puede administrarse una dosis de carga inicial más elevada, seguida de una o más dosis más bajas. El avance de este tratamiento se monitoriza fácilmente a través de técnicas y ensayos convencionales.

En algunas realizaciones, los métodos pueden comprender además un tratamiento adicional. El tratamiento adicional puede ser terapia de radiación, cirugía, quimioterapia, terapia genética, terapia de ADN, terapia viral, terapia de ARN, inmunoterapia, trasplante de médula osea, nanoterapia, terapia de anticuerpo monoclonal o una combinación de los anteriores. El tratamiento adicional puede ser en forma de tratamiento adyuvante o neoadyuvante. En algunas realizaciones, el tratamiento adicional es la administración del inhibidor de molécula pequeña enzimática o del agente anti-metastásico. En algunas realizaciones, el tratamiento adicional es la administración de agentes limitantes de efectos secundarios (p.ej. agentes destinados a disminuir la ocurrencia o gravedad de los efectos secundarios del tratamiento, como los agentes antinauseosos, etc.). En algunas realizaciones, el tratamiento adicional es la terapia de radiación. En algunas

realizaciones, el tratamiento adicional es cirugía. En algunas realizaciones, el tratamiento adicional es una combinación de terapia de radiación y cirugía. En algunas realizaciones, el tratamiento adicional es la irradación gamma. En algunas realizaciones, el tratamiento adicional puede ser una administración separada de uno o más de los agentes clínicos antes descritos.

H. Artículos de fabricación

En otro aspecto de la invención, se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento, la prevención o el diagnóstico de los trastornos antes descritos. El artículo de fabricación comprende un envase y una etiqueta o un inserto del empaque en o asociado con el envase. Los envases adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas, bolsas de solución IV, etc. Los envases pueden estar formados de diversos materiales como vidrio o plástico. El envase contiene una composición que es por sí misma o combinada con otra composición eficaz para tratar, prevenir o diagnosticar la condición y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el envase puede tener una bolsa de infusión o un vial que tiene un tapón perforable con una aguja de inyección hipodérmica). Por lo menos un agente activo de la compoisición es un anticuerpo de la invención. La etiqueta o el inserto del empaque indica que la composición se utiliza para tratar la condición de elección. Por otra parte, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer envase con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un anticuerpo de la invención; y (b) un segundo envase con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un agente citotóxico o de otro modo clínico adicional. El artículo de fabricación en esta realización de la invención puede comprender, además, un inserto del empaque que incique que la composiciones pueden utilizarse para tratar una condición especíica. Opcional o adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo (o tercer) envase que comprende una solucíoon amortiguadora farmacéuticamente aceptable, como agua bacteriostática para inyección (BWFI), solución salina amortiguada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, que incluyen otras soluciones amortiguadoras, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

III. EJEMPLOS

Los siguientes son ejemplos de métodos y composiciones de la invención. Se entiende que pueden ponerse en práctica otras diversas versiones, dada la descripción general proporcionada anteriormente.

Ejemplo 1. Generación de Anticuerpos Anti-CD3

Antígenos CD3ε

A. CD3ε humano y macaco biespecíficos+ CD3γ fusionado con IgG2a-Fc de ratón (CD3εγ-muFc)

El ADNc que codifica porciones extracelulares de CD3ε humano o de mono cynomolgus (macaco) o CD3γ se fusionó en el C-terminal con un IgG2a de ratón en Fc para generar fusiones de CD3-Fc. Los ADNc que codifican los dominios extracelulares de CD3ε y CD3γ humano o macaco se generaron con ARN total de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) activada con anti-CD3/anti-CD28. Las PBMC normales se activaron mediante anti-CD3 y anti-CD28 inmovilizados por placa en RPMI complementado con un 10% de FBS durante 72 h. El ARNm total se aisló con un mini kit RNeasy de Qiagen. Se clonó el ADNc con iniciadores específicos de genes por RT-PCR en vectores TOPO con productos de PCR amplificados con polimerasa Taq siguiendo el protocolo proporcionado con el kit de clonación TOPO TA de Invitrogen. Los fragmentos resultantes se introdujeron en un vector de expresión mamífero que contiene un dominio Fc de IgG2a murino por subclonación libre de restricciones con polimerasa de ADN de alta fidelidad Phusion (New England Biolabs, Catálogo n.° M0530L). Los fragmentos de CD3 se amplificaron de esta manera con la superposición de las regiones contenidas en el plásmido de la plantilla para orientarlos directamente en forma descendente de la secuencia de la señal y el N-terminal al Fc murino.

Tanto para las construcciones humana como de macaco, el CD3ε-Fc que contiene el plásmido se co-expresó temporalmente con el CD3γ-Fc que contiene el plásmido en las células CHO mamíferas. Los heterodímeros de CD3ε/γ se purificaron con sefarosa de proteína A (Pharmacia Biotech).

B. Conjugados de KLH de péptido de N-terminal (CD3ε-KLH)

Se sintetizaron fragmentos de péptidos que contienen secuencias de N-terminal de CD3ε de macaco y humano. Los fragmentos destinados a la inmunización se conjugaron con hemocianina de lapa californiana (KLH), una proteína portadora ampliamente utilizada para generar una respuesta inmune importante. Al añadir la cisteína de origen natural en la posición 28 para el CD3ε de macaco y humano permitía el acoplamiento de KLH activada por maleimida a la cisteína de C-terminal que contiene tiol.

*C. CD3ε-26mero-CD3*γ de cadena sencilla *(CD3εγ)*

Los ADNc que codifican porciones extracelulares de subunidades CD3ε y CD3γ humanas fueron generados por RCP. Los aminoácidos 1-97 de CD3ε humano y los aminoácidos 1-81 de CD3γ humano se conectaron con un conector peptídico flexible de 26 aminoácidos para formar una construcción de CD3ε-26mero-CD3γ (CD3εγ) (Figura 1). La construcción se clonó en un vector de expresión con un His-tag para la secreción de *E. coli* con el promotor de fosfatasa alcalina y la secuencia de la señal de secreción STIII. CD3εγ se purificó en una columna Ni y posteriormente se volvió a plegar. A continuación, el CD3εγ debidamente plegado se purificó luego con una columna de afinidad OKT3.

Además, para algunos experimentos de aglutinación, se compró CD3ε comercial a Creative Biomart, Shirley, New York 11967 (Número de catálogo CD3E-2194H).

Inmunizaciones

A. Inmunizaciones de ratón

Se inmunizó a ratones BALB/c o C57BL/6 (2 µg o 10 µg/inyección por ratón). Los antígenos, suspendidos en adyuvante de monofosforil lípido A /trehalosa dicorinomicolato, se inyectaron en la almohadilla de la pata a intervalos de 3 a 4 días por un total de 12-15 refuerzos. Tres días después del refuerzo previo a la infusión final, se recolectaron linfocitos de bazos y nódulos linfáticos de ratones inmunizados. Los linfocitos de los ratones aislados se fusionaron con células de mieloma SP2/0-Ag14 (Recolección de cultivo tipo estadounidense) con el aparato Cyto Pulse CEEF-50 (Cyto Pulse Sciences). Brevemente, después de lavar dos veces con medio C de Citofusion (N.° de cat. LCM-C), las células del bazo y las células SP2/0-Ag14 aisladas se mezclaron en una proporción de 1:1 y luego se suspendieron a 10 millones de células/ml en medio C de Citofusion, se realizó electrofusión de acuerdo con la instrucción del fabricante. Las células fusionadas se cultivaron en medio C de ClonaCell-HY (N.° de cat. 03803) durante la noche a 37 °C en una incubadora de CO_2 al 7%. Al día siguiente, las células fusionadas se centrifugaron y luego se suspendieron en 10 ml de medio C de ClonaCell-HY y luego se mezclaron suavemente con 90 ml de medio D basado en metilcelulosa ClonaCell-HY (N.° de cat. 03804) que contiene componentes de HAT. Las células se colocaron en placas OmniTray (Thermo Scientific) y se permitió su crecimiento a 37 °C en una incubadora de CO_2 al 7%. Después de 6 a 7 días de incubación, se recogieron clones de hibridoma individuales con ClonePix FL (Molecular Devices) y se transfirieron en placas de cultivo de células de 96 pozos (N.° 353075, Becton Dickinson) con medio E de 200 µl/pozo de ClonaCell-HY (N.° de cat. 03805). Los medios de cultivo de hibridoma se cambiaron antes de la evaluación ELISA.

B. Inmunizaciones de conejo

Se realizaron inmunizaciones en conejos con 0,5 mg/inyección con CD3ε-KLH humano y de macaco CFA/IFA cada 2 semanas por 5 inyecciones (d0, d14, d28, d42, d56). Se tomaron sangrados los días 52 y 66.

Las fusiones y selecciones de PEG se realizaron de la siguiente manera: Se evaluaron los clones para unión a la porción N-terminal de CD3ε conjugada con tiroglobulina (THY) con ELISA. Se determinó que todos los clones positivos tienen una reacción cruzada con CD3ε de macaco mediante ELISA y se seleccionaron 16 clones únicos para subclonación. Se extrajo el ARN total del sedimento celular congelado y se purificó con un kit RNeasy de Qiagen siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADNc de primera cadena se sintetizó con un paso de RT-PCR (Qiagen). Los dominios VH y VL de conejo se amplificaron aún más con PCR con un protocolo descrito para generar genotecas inmunes de conejo (Kontermann y Dubel. *Antibody Engineering*. 1: 115-123, 2010). Se

designó la degeneración moderada para representar los genes de inmunoglobulina de la línea germinal del conejo común.

Selección de anticuerpos

A. Selección de hibridoma de ratón

3 días después del cambio de medios, se seleccionaron supernadantes de hibridoma mediante ELISA para la unión con CD3ε tanto humano como de macaco, como se describe a continuación. Todos los clones positivos de ELISA se seleccionaron además mediante citometría de flujo para la unión a células T Jurkat humanas, PBMC humanas y PBMC de macaco (Figuras 2 y 3). Se purificaron supernadantes de hibridoma mediante cromatografía de afinidad de Proteína A, luego se realizó una filtración estéril (tamaño de poro de 0,2-µm, Nalge Nunc International, NY, EE.UU.) y se almacenaron a 4°C en PBS. Se confirmaron mAbs purificados mediante ELISA antes de la evaluación en ensayos funcionales. Se determinó el isotopo mAb con un kit para isotipos de anticuerpos monoclonales de ratón de Roche Diagnostics Corporation.

La Figura 4A muestra las secuencias de aminoácidos de dominios variables de cadena ligera y pesada de los anticuerpos anti-CD3 13A3, 72H6 y 19B1. La Figura 4A también delimita las secuencias de HVR para cada uno de los tres anticuerpos. Las Figuras 4B, 4C, 5A y 5B muestran las secuencias de aminoácidos de dominios variables de cadena ligera y pesada de otros anticuerpos anti-CD3.

B. Selección después de las inmunizaciones de conejo

Se clonaron ocho secuencias de cadena pesada individuales y seis secuencias de cadena ligera individuales de las líneas de células de hibridoma. La Figura 7 muestra las secuencias de cadena pesada y ligera para uno de estos anticuerpos, Rab17. Debido a la gran similitud en la secuencia se decidió enfocarse en 6 pares pesados y ligeros. Los 6 anticuerpos resultantes se expresaron como IgG quiméricos de conejo/humano a pequeña escala (cultivos de 100 ml de 293S) y se seleccionaron para la unión a CD3 epsilon mediante ELISA.

Caracterización de anticuerpos: ensayos de afinidad de unión y actividad de activación de células T

A. Ensayo ELISA de unión de CD3εγ

El ensayo ELISA de unión de CD3εγ se llevó a cabo en placas ELISA de microtitulación de 96 pozos (Greiner, Alemania) recubiertos con aminoácidos de N-terminal de CD3ε ya sea humano/de macaco conjugados con THY o CD3ε/γ ya sea humano/de macaco fusionado con Fc murino a 2 µg/ml en una solución amortiguadora de carbono de 0,05 M (pH 9,6), 4°C durante la noche. Después de lavar tres veces con solución amortiguadora de lavado (0,05% Tween 20 en PBS), las placas se bloquearon con 200 µL de diluyentes de ensayo ELISA con BSA. Se añadieron e incubaron 100 µL de supernadantes cultivados o mAb purificados diluidos durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres

veces y se incubaroncon IgG Fc anti ratón de cabra conjugado con HRP durante 1 hora. Después de lavar tres veces, se detectó una enzima ligada al agregar 100 µL/pozo de sustrato de TMB (BioFX Laboratories, MD, EE.UU.) durante 5 minutos. Se detuvieron las reacciones al agregar 100 µL/pozo de reactivo de detención (BioFX Laboratories, MD, EE.UU.) y la detección de color a A_{630} *nm*.

B. Análisis de citometría de flujo

Células T Jurkat humanas, PBMC humanas o PBMC de macaco se lavaron dos veces con solución amortiguadora de tinción de FACS (solución salina amortiguada con fosfato que contiene un 1% de suero fetal bovino) y luego se suspendieron en solución amortiguadora de tinción de FACS hasta una concentración final de 5 x 10^6 celulas/ml. Se agregaron células de 100 µl a la placa de cultivo de tejido de 96 pozo con fondo en U (#353077, Becton Dickinson) y se agregaron 100 µl de supernadantes de hibridoma o mAbs purificados diluidos. Después de 30 minutos de incubación en hielo, se lavaron las células dos veces con solución amortiguadora de tinción de FACS y se tiñeron posteriormente con anticuerpo IgG anti ratón de cabra conjugado con FITC o aloficocianina (APC)(#1012-11, Southern Biotech) a una dilución de 1:300 durante 30 minutos. Después de lavar dos veces con solución amortiguadora de tinción de FACS, las células se analizaron mediante citometría de flujo FACSCalibur (BD Biosciences). Los datos se analizaron con el software FlowJo (Tree Star, Inc.).

C. Ensayo de activación de célula T humana

Se recolectó sangre humana en jeringas heparinizadas y se aisló PBMC con Leucosep (Greiner Bio-one, n.° de cat. 227290P) y Ficoll Paque Plus (GE Healthcare Biosciences, n.° de cat. 95038-168), según lo recomendado por la fabricación. Las células se lavaron en medio RPMI que contiene un 10% de FBS, complementado con GlutaMax (Gibco, n.° de cat. 35050-061), penicilina y estreptomicina (Gibco, n.° de cat.15140-122), y se agregaron ~0,2 millones de células suspendidas a una placa con fondo en U de 96 pocillos. Se agregaron anticuerpos anti-CD3 entre 0,01 y 10 µg/ml. Después cultivar durante ~ 20 horas, se lavaron las células con solución amortiguadora FACS (0,5% BSA, 0,05% azida de Na en PBS). Luego se tiñeron las células con anti-CD69-FITC (BD, cat n.° 555530), anti-CD25-PE (BD, cat n.° 555432) anti-CD4-APC (BD, cat n.° 555349) o anti-CD8-APC (BD, cat n.° 555369) en solución amortiguadora FACS, se lavaron con solución amortiguadora FACS y se suspendieron en 100 ul de solución amortiguadora de FACS que contiene 1µg/ml de yoduro de propidio. Se recopilaron los datos en un citómetro de flujo FACSCalibur y se analizaron con FlowJo. Se determinó el grado de activación de las células T comparando el porcentaje de población CD69 + y CD25 + en las células CD4 + o CD8 + T.

D. Ensayo de activación de células T en macacos

Se extrajo sangre de macaco en tubos heparinizados. Se lisaron glóbulos rojos dos veces

con tampón de lisis de glóbulos rojos ACK (0,874% de NH4Cl, 0,1% de KHCO3, 0,00368 de EDTA de disodio). Las células se lavaron en medio RPMI que contiene un 10% de FBS, complementado con GlutaMax (Gibco, n.° de cat. 35050-061), penicilina y estreptomicina (Gibco, n.° de cat.15140-122), y se agregaron ~0,2 millones de células suspendidas a una placa con fondo en U de 96 pocillos. Se agregaron anticuerpos anti-CD3 a 10 µg/ml. Después cultivar durante ~ 20 horas, se lavaron las células con solución amortiguadora FACS (0,5% BSA, 0,05% azida de Na en PBS). Luego se tiñeron las células con anti-CD69-FITC (BD, n.° de cat. 555530), anti-CD25-PE (BD, n.° de cat. 555432) anti-CD4-APC (BD, n.° de cat. 551980) en solución amortiguadora FACS, se lavaron con solución amortiguadora FACS y se suspendieron en 100 µg de solución amortiguadora de FACS que contiene 1 µg/ml de yoduro de propidio. Se recopilaron los datos en un citómetro de flujo FACSCalibur y se analizaron con FlowJo. Se determinó el porcentaje de activación de células T al comparar el porcentaje de la población de CD69+ y CD25+ en las células T CD4+.

Generación de variantes de anticuerpos anti-CD3

A. Clonación y secuenciación de hibridomas de reacción cruzada humano/macoco de ratón CD3εγ

Se extrajo el ARN total de células de hibridoma de ratón con el kit RNeasy (Qiagen) y se sintetizó ADNc de primera cadena con un kit SuperScript III RT (Invitrogen). Se amplificaron genes de anticuerpo con RCP de polimerasa Taq con corrección de errores con una mezcla de cebadores 5' degenerados y cebadores 3' Cγ□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□Se purificaron los productos RCP y se obtuvieron las regiones variables de los anticuerpos de cadenas ligeras y pesadas mediante la secuenciación del producto de RCP. Se digirieron las regiones variables de anticuerpo de cadenas ligeras y pesadas con enzimas de restricción adecuadas y se clonaron en los vectores de expresión pRK respectivos. Los anticuerpos murinos se expresaron en 293 células.

B. Humanización

Se alinearon las secuencias de hibridomas de reacción cruzada de humano/macaco CD3εγ hasta lograr el consenso humano o los dominios variables pesados o ligeros de la línea germinal más homólogos posibles (Figura 7). Se derivó una secuencia de consenso llamada mu40G5c de los dominios variables de cadena pesada o ligera de los clones de hibridona relacionados (Figura 7). Se diseñaron regiones hipervariables (HVR) en marcos humanos de selector para generar injertos de CDR humanizados (consulte, por ejemplo, las figuras 8A-8F). Variantes humanizadas se evaluaron en forma de fragmentos Fab o como IgG. Las posiciones de dominio VL 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) y las posiciones de dominio VH 26-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) se utilizaron para los injertos (Figuras 8A-8F). También se generaron variantes adicionales que incluyeron varias combinaciones de una o más posiciones de vernier de ratón y se evaluaron para

determinar la afinidad de unión (consulte, p.ej., las Figuras 9A-9F). Se incorporaron residuos de dominio de variables murinas en posiciones seleccionadas de *vernier* en una secuencia humanizada final con base en su capacidad para mejorar la afinidad de unión. La Figura 10 muestra las afinidades de unión monovalentes para los anticuerpos humanizados seleccionados para los diferentes antígenos CD3ε. La Figura 11 muestra las afinidades de unión para las variantes de afinidad del anticuerpo anti-CD3 humanizado 38E4 (38E4v1-38E4v9) y 40G5c.

C. Mapeo parátopo

Cada residuo en HVR-L3 y HVR-H3 de hu38E4 se mutó por separado a la alanina con la mutagénesis Kunkle. Además, la posición 95 en HVR-H3 también se mutó a serina, treonina o glutamato. Se expresaron la variantes con estas mutaciones puntuales como Fab en células HEK293 y se seleccionaron inicialmente con un método de cinética de ciclo único en un Biacore T100. También se aumentaron las variantes seleccionadas y se purificaron para un método convencional de cinética por multiciclo. Para la cinética de ciclo único, se inmovilizaron chips de sensor Biacore serie S CM5 con anticuerpos Fab anti-humanos (kit de captura de Fab humana, GE Healthcare). Cada Fab fue capturado de sobrenadante de cultivo y las concentraciones crecientes (que van desde 3 nM a 250 nM en tampón de IESE) de CD3εγ humano fueron inyectados secuencialmente con un caudal de 30 µl/min en un solo ciclo de análisis sin regeneración de la superficie entre las inyecciones; se adquirió una disociación de 10 min para cada ciclo. Para el ciclo múltiple de cinética convencional, se inmobilizaron CD3εγ humano, CD3εγ macaco o un 27-mer péptido sobre chip sensor Biacore serie S CM5 con el uso del kit de acoplamiento amino de Biacore. Diluciones seriadas 3 veces de cada variante Fab se inyectaron con un caudal de 30 µl/min. Cada muestra se analizó con un protocolo de Asociación de 3 minutos y disociación de 3 minutos. En ambos métodos, los chips Biacore se regeneraron mediante 10 mM glicina (pH 1.7). Se corrigió la respuesta de unión mediante sustracción en blanco y se utilizó un modelo de Languir 1:1 de colocación simultánea de k_{on} y k_{off} para el análisis de la cinética. Los efectos de estas mutaciones, resumidos en la figura 12, indican residuo de la cadena ligera R96 y residuos de cadena pesada Y97, R99 y F100b juegan un papel crítico en el enlace a CD3εγ.

D. Mapeo epítopo CD3

Se introdujeron mutaciones de la alanina en CD3ε1-27-Fc para evaluar el reconocimiento de epítopos de anticuerpos de anti-CD3ε N-terminal vinculante. Se inmovilizó cada variante de CD3ε1-27-Fc en placas Nunc Maxisorp de un día para el otro en PBS a 2 µg/ml a 4 °C. Tras bloquear las placas con leche en polvo al 2% en PBS con 0,05% de Tween 20 durante 1h, se agregó 100 µl de 3 nM anti-CD3ε a cada uno bueno y se dejó enlazar durante 1h a 25 °C. Después de 6 lavados con PBS con un 0,05% Tween 20, se detectó la unión de anticuerpos por la adición de anti-ratón IgG-HRP de anticuerpo secundario, como se muestra en la figura 13A.

CD3εγ se sub clonó en un Fagémido M13 que contiene una etiqueta de gD C-terminal seguido de un codón de parada ámbar, para que pueda aparece en fago o expresarse en una cepa no supresora de *E. coli*. Se utilizó este Fagémido CD3εγ como una plantilla para hacer las mutaciones individuales de alanina en CD3ε mediante mutagénesis Kunkel. Cada mutante de alanina CD3ε que aparece en Fago, se confirmó por secuenciación del ADN aislado de una sola colonia, crecido durante la noche en 2YT/Carb plus fago KO7 ayudante y se purificó mediante la precipitación de PEG. El efecto de la mutación de alanina en CD3εγ en la unión de anticuerpos anti-CD3 se evaluó mediante un fago ELISA. Se inmovilizó cada anticuerpo anti-CD3 en una placa maxisorp NUNC a 2 µg/ml de tampón PBS durante la noche a 4 °C. Se agregó el sobrenadante fago purificado que muestra una variante de alanina CD3εγ (1.0 OD450) a la placa y se dejó enlazar a temperatura ambiente con agites durante 1 h. Después del lavado, se detectó fago ligado con anti-M13-HRP (GE Healthcare cat. # 45-001-419). Se comparó el ligado de cada variante de alanina CD3εγ con el ligado fago CD3εγ tipo salvaje (figura 13B). También se caracterizaron las variantes de alanina que afectaron enlace con anticuerpos anti-CD3, por la evaluación de enlace como una función de la concentración de fago (Figura 13C).

Para cuantificar el impacto de las mutaciones de alanina en CD3 en la unión de anticuerpos, se expresaron mutantes de alanina de CD3 en una cepa de no supresora de *E. coli*. Las variantes CD3εγ secretadas fueron capturadas de la fracción periplásmica cruda mediante el uso del anticuerpo anti-CD3 UCHT1v9. Se inmobilizó a UCHT1v9 en un chip serie S CM5 a través del acoplamiento de amina mediante el uso del kit de captura del anticuerpo anti-humano IgG (Fc) (BR-1008-39) de GE Healthcare. Se realizaron mediciones SPR en el instrumento Biacore 4000, mediante el software de evaluación cinética. Para medir las afinidades vinculantes monovalentes, se utilizaron anticuerpos anti-CD3 biespecíficos, en los cuales un brazo era el anti-CD3 a ser probado y el brazo reconoció un antígeno irrelevante. Los anticuerpos anti-CD3 biespecíficos se transmitieron por el sobrenadante capturado en una serie de concentración de diluciones dobles de 0,39 a 100 nM. La cinética resultante (figura 13D) se midió y calculó con el software de Biacore 4000 BIAevaluation (código de producto 28-9664-57).

E. Mapeo estructural del lugar de unión de CD3ε

1. Hu38E4.v1 Fab

Se mezcló Hu38E4.v1 Fab, disuelto en NaCl 0,15 M, 25 mM tris, pH 7,5 a 10 mg/ml y un doble exceso molar (1 mg) de péptido CD3ε, QDGNEEMGGITQTPYK (N.° de ID de SEC.: 284) (Figura 14A) y se sometió a ensayos de cristalización. Se realizó la proyección inicial con una matriz rala de precipitados en formato de difusión de vapor por gota sentada. Los cristales optimizados se desarrollaron en una mezcla 1:1 con una solución de depósito con 70% de v/v de metilpentano, y 0,1 m de tampón HEPES a un pH de 7,5. El depósito se utilizó como crioprotector. Los cristales se transferirieron a temperatura criogénica por inmersión súbita en nitrógeno líquido.

Los datos de difracción de co-cristales péptidos hu38E4.v1 y CD3ε se recopilaron en

línea de haz del Advanced Photon Source hu38E4, con un detector CCD v1. Luego, se integraron las defracciones registradas pueden y se ampliaron con el uso del programa HKL2000.

La estructura se escalonó mediante el método de reemplazo molecular (MR) utilizando el programa Phaser. El modelo de búsqueda de MR fue una sub-unidad Fab derivada de una estructura cristalina del complejo HGFA/Fab (código PDB: 2R0L). El péptido de complejo CD3ε se desarrolló en la estructura basada en un mapa Fo-Fc. Como consecuencia, la estructura se refinó con los programas REFMAC5 y PHENIX, implementando las funciones objetivo de probabilidad, el método de refinamiento de factor-B individual anisotrópico y el método de refinamiento TLS, para lograr la convergencia. Las estadísticas de datos y el refinamiento se muestran en la tabla 3A.

TABLA 3A. Recopilación de datos y estadísticas de refinamiento para el complejo hu38E4.v1/CD3ε

Grupo de espacio	P3221
Células unitarias	a=73,2Å, b=73,2Å,c=183,7Å α=90° β=120° γ=90°
Resolución	50,0 - 1,95 Å
Cantidad total de reflejos	42632 (4188)[1]
Integridad (%)	100 (100)
Redundancia	19,7 (8,3)
I/σ	7,1 (3,0)
Rsym[2]	0,112 (0,812)
Rango de resolución	50 - 1,95 Å
Rcryst[3] / Rfree[4]	0,152/0,185
Atomos que no son de hidrógeno	3960
Moléculas de agua	446
Promedio B, General	21,97
Promedio B, Proteína	20,63
Promedio B, Agua	32,27
longitudes de enlace r.m.s.d.	0,009 Å
ángulos r.m.s.d.	1,258°

[1]Los valores entre paréntesis son para la cubierta con resolución más alta, que es 2,02 Å–1,95 Å.

[2]Rsym = $\Sigma|I_{hi} - I_h|/ \Sigma I_{hi,}$ donde I_{hi} es la intensidad aumentada de la observación relacionada con la simetría *i*th del reflejo *h e* I_h es el valor medio.

[3]Rcryst = $\Sigma_h|F_{o,h} - F_{c,h}| / \Sigma_h F_{o,h}$, donde $F_{o,h}$ y $F_{c,h}$ son las amplitudes de factor estructural observadas y calculadas para el reflejo *h*.

[4]El valor de R_{libre} se calcula para el 5% de las reflexiones escogidas de forma aleatoria en el perfeccionamiento.

La estructura cristalina del complejo péptido Fab/CD3ε hu38E4.v1 se determinó a una resolución del 1.9Å. La estructura reveló que el péptido CD3ε hace un pequeño giro y se inserta profundamente en la hendidura entre las cadenas pesadas y ligeras de Fab 38E4.v1 (figuras 14B y 14C). La unión entierra 666 Å2 del área de superficie accesible de solvente entre el péptido y el fragmento Fab y consiste en una intrincada red de enlace interacciones iónicas, hidrofóbicas y de hidrógeno (Figura 14D). El anillo de piroglutamato (pyroglu) N-terminal se empaca contra la cadena pesada Tyr33 y hace un enlace de hidrógeno con la cadena pesada His35 en RHV-H1. La cadena lateral abultada del residuo F100b en HVR-H3 empuja a His35 en una orientación adecuada para su interacción con pyroglu y explica la pérdida de enlace observada cuando F100b muta a alanina, un residuo de la cadena lateral pequeño. Además, en consonancia con los resultados del análisis de alanina, el R96 en CDR-L3 hace una unión hidrógena crítica con el grupo carboxilo en el pyroglu, mientras que Y97 en CDR-H3 hace una unión hidrógena con el Met7 del péptido CD3ε (figura 14E). Curiosamente, mientras que la substitución de alanina en R99 en CDR-H3 tiene un impacto dramático en la unión del antígeno, la estructura revela que esta cadena apunta fuera del péptido CD3ε y no se involucra en las interacciones con el péptido. En cambio, R99 hace amplios contactos con varios residuos en CDR-H3, entre ellos un enlace de hidrógeno con D101 y un empaque hidrofóbico contra Y100a que también impacta en el residuo vernier, Y49 LC (figura 14F). Estas interacciones son, probablemente, importantes para el apoyo y la disposición general de los bucles CDR en el 38E4.v1 Fab organizando la crítica hendidura central entre las cadenas pesadas y ligeras para permitir el enlace de péptido CD3ε.

La Figura 14G identifica todos los residuos de la 38E4.v1 Fab que estaban decididos a residir dentro de 5 Å desde el péptido CD3ε. Estos residuos de contacto antígeno son idénticos entre hu38E4.v1 y hu40G5c, con la excepción que ese residuo G96 de hu38E4.v1 es un residuo de serina (S96) en hu40G5 (ver figura 14 H, que representa la ubicación del residuo de contacto G96 de hu38E4.v1).

Los contactos entre anti-CD3 (38E4.v1) y el péptido $CD3_{\varepsilon\gamma}$ se calculan con base en el análisis de alanina. Los epítopos reconocidos por el 38E4v1 anti-CD3 son contactos con una distancia de 3,5 Angstroms o menos, como en la siguiente tabla 3B. De este análisis, se descubrió que los epítopos CD3 Gln1 (PCA1, ácido piroglutámica), Asp2, Glu6 y Met7 son un contacto importante que forman residuos con la paratopes de la cadena ligera y las regiones variables de la cadena pesada del anticuerpo CD3.

TABLA 3B. Contactos de CD3 para el complejo hu38E4.v1/CD3ε

Cadena de anticuerpos	**Residuos**	**Nombre del átomo**	**Átomo**	**Péptido CD3**	**Residuos**	**Nombre del átomo**	**Átomo**	**Distancia**
/L/	96(ARG)	NH2	N	**/A/**	**1(PCA)**	**O**	**O**	2,76
/H/	35(HIS)	NE2	N	/A/	1(PCA)	OE	O	2,85*
/L/	96(ARG)	NH1	N	**/A/**	**1(PCA)**	**O**	**O**	2,9
/L/	96(ARG)	CZ	C	/A/	1(PCA)	O	O	3,24
/H/	33(TYR)	CG	C	/A/	1(PCA)	OE	O	3,27
/L/	96(ARG)	NH2	N	/A/	1(PCA)	OE	O	3,28
/H/	100(TYR)	CD1	C	/A/	1(PCA)	O	O	3,33
/H/	33(TYR)	CB	C	/A/	1(PCA)	OE	O	3,34
/L/	96(ARG)	NH2	N	/A/	1(PCA)	CD	C	3,35
/H/	33(TYR)	CD2	C	/A/	1(PCA)	OE	O	3,44
/H/	50(TRP)	CH2	C	/A/	1(PCA)	N	N	3,45
/H/	33(TYR)	CD2	C	/A/	1(PCA)	CD	C	3,47
/H/	50(TRP)	CZ3	C	/A/	1(PCA)	N	N	3,48
/L/	**94(LEU)**	**N**	**N**	/A/	2(ASP)	OD1	O	2,71
/H/	50(TRP)	CH2	C	/A/	2(ASP)	OD1	O	3,23
/L/	92(PHE)	O	O	/A/	2(ASP)	CB	C	3,44
/H/	100(TYR)	CE1	C	/A/	2(ASP)	O	O	3,48

/L/	**91(SER)**	**O**	**O**	**/A/**	**3(GLY)**	**N**	**N**	2,88
/L/	27(ASN)d	ND2	N	**/A/**	**3(GLY)**	**O**	**O**	2,96
/L/	**92(PHE)**	**O**	**O**	**/A/**	**3(GLY)**	**N**	**N**	3,22
/L/	32(TYR)	OH	O	/A/	3(GLY)	O	O	3,3
/L/	32(TYR)	CZ	C	/A/	3(GLY)	O	O	3,42
/L/	32(TYR)	CE2	C	/A/	3(GLY)	O	O	3,42
/L/	91(SER)	O	O	/A/	3(GLY)	CA	C	3,49
/L/	**92(PHE)**	**O**	**O**	**/A/**	**4(ASN)**	**N**	**N**	2,81
/L/	27(ARG)f	NH1	N	**/A/**	**4(ASN)**	**O**	**O**	3,06
/L/	92(PHE)	O	O	/A/	4(ASN)	CB	C	3,11
/L/	92(PHE)	CZ	C	/A/	4(ASN)	OD1	O	3,43
/L/	32(TYR)	OH	O	/A/	6(GLU)	OE1	O	2,58*
/L/	30(LYS)	NZ	N	/A/	6(GLU)	OE2	O	2,74*
/L/	27(ARG)f	NH1	N	**/A/**	**6(GLU)**	**O**	**O**	2,77
/L/	27(ASN)d	ND2	N	**/A/**	**6(GLU)**	**O**	**O**	3,04
/L/	30(LYS)	NZ	N	/A/	6(GLU)	OE1	O	3,2
/L/	30(LYS)	CD	C	/A/	6(GLU)	OE1	O	3,35
/L/	30(LYS)	NZ	N	/A/	6(GLU)	CD	C	3,36
/H/	100(TYR)	CE2	C	/A/	6(GLU)	OE1	O	3.4
/H/	98(SER)	CA	C	/A/	6(GLU)	OE2	O	3,42
/H/	100(TYR)	OH	O	/A/	6(GLU)	CB	C	3,44
/L/	32(TYR)	CZ	C	/A/	6(GLU)	OE1	O	3,47
/H/	97(TYR)	OH	O	**/A/**	**7(MET)**	**N**	**N**	2,87
/L/	27(ARG)f	NE	N	**/A/**	**7(MET)**	**O**	**O**	2,95
/H/	97(TYR)	OH	O	/A/	7(MET)	CB	C	3,49
/L/	27(ARG)f	CD	C	/A/	7(MET)	O	O	3,5

*Representa la vinculación de hidrógeno entre dos cadenas laterales.
Las células sombreadas grises representan los contactos de la vinculación de hidrógeno confiables.
Los contactos en negrita son enlaces del hidrógeno formados entre las cadenas laterales y la columna vertebral de la cadena principal.

2. SP34v52 Fab

SP34v52 Fab se disolvió en 0,25 M NaCl, pH de MES 25 mM 5,5 a 10 mg/mL. La proyección de cristalización inicial se realizó con una matriz rala (PEGII, Qiagen) en un formato de difusión de vapor por gota sentada. Se encontró un hit de cristalización en una gota con el depósito que contiene 0,2 M $CaCl_2$; 0,1M HEPES pH 7,5 y 30% w/v PEG 4000. Se desarrollaron cristales optimizados de una mezcla de proteína µL 2 y 2 µL de la solución de depósito que contiene 20-23% w/v PEG 3350; 0,1M, pH HEPES 7,2, 0,1 M de $CaCl_2$. Se utilizó el método de difusión de vapor por gota colgante y la caída final de cristalización se incubó a 18 °C.

Se recolectaron los datos de difracción de SP34v52 Fab en línea de haz de Stanford Synchrotron Light Source 12-2, con un detector de PILATUS. Luego, se integraron las defracciones registradas con un programa XDS y se ampliaron con el uso del programa SCALA. La estructura se escalonó mediante el método de reemplazo molecular (MR) utilizando el programa Phaser. El modelo de búsqueda de MR es una sub-unidad Fab derivada de una estructura cristalina del complejo HGFA/Fab (código PDB: 2R0L). El péptido de complejo CD3ε se desarrolló en la estructura con base en un mapa Fo-Fc. Como consecuencia, la estructura se refinó con los programas REFMAC5 y PHENIX, implementando las funciones objetivo de probabilidad, el método de refinamiento de factor-B individual anisotrópico y el método de refinamiento TLS, para lograr la convergencia. Las estadísticas de datos y el refinamiento se muestran en la tabla 4.

TABLA 4. Recopilación de datos y estadísticas de refinamiento para SP34v52

Grupo de espacio	P622
Células unitarias	a=b=146.3Å, c=80.1Å α=90° β=90° γ=120°
Resolución	50,0 - 2,50 Å
Cantidad total de reflejos	18004 (170)[1]
Integridad (%)	100 (100)
Redundancia	19,3 (19,7)
I/σ	24,0 (3,6)
Rsym[2]	0,127 (0,896)
Rango de resolución	50 - 2,50 Å
Rcryst[3] / Rfree[4]	0,152/0,185
Atomos que no son de hidrógeno	3451
Moléculas de agua	123

Promedio B, General	29,59
Promedio B, Proteína	29,81
Promedio B, Agua	22,47
longitudes de enlace r.m.s.d.	0,007 Å
ángulos r.m.s.d.	1,163°

[1]Los valores entre paréntesis son para la cubierta con resolución más alta, que es 2,51 Å–2,50 Å.

[2]Rsym = $\Sigma|I_{hi} - I_h|/ \Sigma I_{hi,}$ donde I_{hi} es la intensidad aumentada de la observación relacionada con la simetría *i*th del reflejo *h e* I_h es el valor medio.

[3]Rcryst = $\Sigma_h|F_{o,h} - F_{c,h}| / \Sigma_h F_{o,h}$, donde $F_{o,h}$ y $F_{c,h}$ son las amplitudes de factor estructural observadas y calculadas para el reflejo *h*.

[4]El valor de R_{libre} se calcula para las reflexiones de 5% escogidas de forma aleatoria no incluidas en el refinamiento.

En las figuras 14I-14L, las estructuras de cristal de los Fabs hu38E4.v1 y SP34v52 se comparan en la misma orientación. Cuando el péptido CD3ε fue superpuesto en el Fab SP34v52 con la misma orientación que en el hu38E4.v1, se observaron choques evidentes del péptido con SP34v52 (Figura 14L). Los residuos HVR-H2, R50 y R52 de SP34v52, que no estaban presentes en hu38E4.v1 ni en hu40G5c, se hallaron importantes para la unión de CD3 por SP34v52 (Figura 14L). Estos datos demuestran que hu38E4.v1 y hu40G5c se unen con CD3 de una forma distinta que SP34v52.

La estructura de cristal de hu38E4.v1 en el complejo con el péptido N-terminal de CD3Εγ se encuentra ilustrada en las Figuras 14M y 14N. La Figura 14M proporciona una vista ampliada de las interacciones intermoleculares clave involucradas en el contacto del sexto residuo en $CD3_{\varepsilon\gamma}$. Con una vista alejada, la Figura 14N muestra un modelo de llenado de espacio del complejo del péptido Fab/CD3, donde el quinto residuo está apuntando por completo hacia afuera del sitio de interacción. El sexto residuo, como se muestra, está involucrado en las interacciones con Fab y los puntos dentro del sitio activo.

Ejemplo 2. Generación y selección de Anticuerpos biespecíficos dependientes de células T (TBD)

Un método para emplear el alto potencial citotóxico de las células T para erradicar las células tumorales ha sido el uso de los anticuerpos biespecíficos dependientes de linfocitos T (TBD). Se han informado respuestas clínicas alentadoras con moléculas como blinatumomab dirigidas a células B, el anticuerpo BiTE CD19/CD3-biespecífico. Sin embargo, la promesa clínica de muchas modalidades de anticuerpos biespecíficos informadas ha sido limitada por las responsabilidades, que incluyen farmacocinética desfavorable, toxicidad y/o problemas de producción. En consecuencia, inicialmente, hemos generado y caracterizado anticuerpos TBD anti-CD3 con combinaciones variadas de los grupos de antígeno antitumoral y anti-CD3 (p. ej., anti-CD20, anti-FcRH5, anti-HER2, anti-LYPD1, anti-LY6E, anti-LY6G6D, anti-PMEL17, anti-CD19, anti-CD22, anti-CD33, anti-CD79A, anti-CD79B, anti-EDAR, anti-GFRA1, anti-MRP4, anti-RET, anti-Steap1, anti-TenB2), producidos como anticuerpos de cuerpo entero en el formato de botón en el ojal (knob-into-hole). Inesperadamente, observamos que ciertas combinaciones (pares) particulares de grupos de antígeno antitumoral y anti-CD3 resultaron en TDB que presentan una actividad favorable en relación con los otros TDB.

Los anticuerpos TBD se produjeron como anticuerpos de longitud completa en el formato de botón en ojal (knob-into-hole) como IgG1 humana, como se describió previamente (Atwell y otros. *J. Mol. Biol.* 270: 26-35, 1997). La mitad de los anticuerpos se expresaron en *E. coli* o en células de ovarios de hámster chino (CHO), purificados por cromatografía de afinidad de proteínas A, y los pares adecuados de anticuerpos medios se hibridaron *in vitro* como se describió anteriormente (Spiess y otros. *Nat. Biotechnol.* 2013). Si la producción de anticuerpos TDB se llevó a cabo en células CHO, el anticuerpo puede incluir una mutación de glicosilación, por ejemplo, en el residuo N297 (p. ej., N297G), de manera tal que el anticuerpo TDB era una variante sin efector e incapaz de iniciar citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC). La Figura 15 muestra una visión general esquemática de la producción de TDB CD3/CD20.

Luego de la hibridación, los TBD CD3/CD20 se purificaron mediante cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) y se caracterizaron por filtración analítica en gel, espectrometría de masas y electroforesis en gel de poliacrilamida. Los anticuerpos

purificados funcionan como un pico único (>99% de la señal) en la filtración en gel con menos del 0,2% de agregados. No se detectaron homodímeros por medio de la espectometría. Los grupos anti-CD20 analizados en la generación de TDB CD3/CD20 incluyeron 2H7v16, 2H7v114, 2H7v511, y GA101. Los grupos anti-CD3 analizados en la generación de TDB CD3/CD20 incluyeron UCHT1v1, UCHT1v9, UCHT1vM1, 72H6, 13A3, 30A1, 41D9a, SP34v52, 40G5c, 38E4v1-38E4v9, 21B2, 125A1 y 21A9. Los TDB CD3/CD20 se analizaron en relación con la unión con CD3, así como con la actividad, según lo evaluado por los ensayos de destrucción de células B *in vitro* y ensayos de activación de células T.

A. Afinidad de unión

Las afinidades de unión para cada uno de los TDB CD3/CD20 se examinaron por medio de análisis FACS o Biacore, como se describió anteriormente para los anticuerpos anti-CD3. En resumen, para los ensayos de unión de Biacore, se inmobilizó CD3εγ humano en el chip sensor Biacore CM5 Serie S, utilizando el kit de acoplamiento de amino de Biacore y los TDB CD3/CD20 o variantes de Fab presentes estaban en el flujo. Para los ensayos de unión de FACS, se incubaron células Bjab (para antígenos de células B) o células Jurkat (para antígenos CD3) con varias concentraciones de anticuerpos TDB a 4 °C durante 30 minutos. Luego, las células fueron enjuagadas e incubadas con el segundo anticuerpo (anti-huIgG-PE; BD Bioscience) durante otros 15 minutos, antes de ser enjuagadas nuevamente y preparadas para el análisis de FACS. La figura 16 muestra los resultados de ensayos de unión de FACS *in vitro* de los TDB CD3/CD20. Los resultados demuestran que las combinaciones particulares del grupo de anticuerpo anti-CD3 y el grupo del antígeno antitumoral (p. ej., grupo anti-CD20) resultan en anticuerpos TDB con propiedades de unión más favorables. La figura 17 muestra las afinidades de unión monovalentes y bivalentes para estos TDB CD3/CD20 particulares. La combinación particular de 2H7v16 con los grupos anti-CD3 (p.ej., UCHT1v9), por ejemplo, resultó en un TDB CD3/CD20 que mostró una unión sorprendentemente fuerte con las células Bjab y Jurkat en comparación con otros TDB CD3/CD20 analizados con diferentes grupos anti-CD20. La afinidad de unión de otros TDB CD3/CD20 con un grupo anti-CD20 2H7v16 y varios grupos anti-CD3 también fueron analizados (observe las Figuras 18-24).

B. Ensayos in vitro de activación de células T y eliminación de células B.

Los TDB CD3/CD20 generados también se analizaron para determinar su capacidad para soportar la eliminación de células B y la activación del efecto citotóxico de las células T. En estos ensayos, se obtuvieron líneas de células tumorales B (Bjab) a partir de ATCC y se aislaron las PBMC de la sangre completa de los donantes sanos por medio de separación Ficoll. De se necesario, se separaban las células CD8+T y CD4+T con los kits Miltenyi, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células fueron cultivadas en RPMI1640 complementado con 10% FBS (Sigma-Aldrich) a 37 °C en un incubador de cultivos celulares humidificado estándar. Para los ensayos de eliminación de células Bjab,

20.000 células Bjab fueron incubadas con células efectoras ya sea como huPBMCs o células T purificadas, en relaciones indicadas por el ensayo, en presencia de varias concentraciones de anticuerpos TDB durante un período de tiempo indicado por el ensayo. Para los ensayos de eliminación de células B endógenas, se incubaron 200.000 huPBMCs con varias concentraciones de anticuerpos TDB durante la cantidad de horas indicada en el ensayo. Al final de cada ensayo, las células B vivas fueron separadas como células PI-CD19+ o PI-CD20+ B por medio de FACS, se obtuvo un recuento de células absoluto, con perlas FITC agregadas a la mezcla de la reacción como control de recuento interno. El porcentaje de eliminación de células se calculó con base en los controles no tratados con TDB. Las células T activadas fueron detectadas por la expresión de superficie de CD69 y CD25.

Las eficacias variadas de los anticuerpos TDB generados con biespecificidad para CD3 y una segunda molécula biológica (en esta instancia, CD20), enfatizan las contribuciones impredecibles y críticas de ambos grupos de anticuerpos en la generación de un TDB ejemplar de alta eficacia (consulte Figuras 25-49).

Ejemplo 3. Caracterización de TDB CD3/CD20 ejemplares (TDB CD20)

Caracterizamos en más detalle dos de los TDB CD3/CD20 (TDB CD20) ejemplares descritos anteriormente, que mostraron una alta eficacia en los ensayos *in vitro* de eliminación de células B y activación de células T. El grupo CD20 de cada anticuerpo TDB era el clon 2H7.v16 de anti-CD20 (observe la figura 50), mientras que el grupo CD3 era el clon UCHT1v9 (consulte, p-ej, Zhu, et ál *Int. J. Cancer*. <62> 62 319-324, 1995) o el clon 40G5c de macaco de reacción cruzada (consulte, p.ej., Figura 51), que comparte actividades comparables.

Materiales y métodos

A. Producción de anticuerpos

Los anticuerpos biespecíficos dependientes de células T (TDB) se produjeron como anticuerpos de longitud completa en el formato de botón en ojal (knob-into-hole) como IgG1 humana, como se describió previamente (Atwell y otros. *J. Mol. Biol.* 270: 26-35, 1997). La mitad de los anticuerpos se expresaron en *E. coli, y por lo tanto aglicosilados, purificados por cromatografía de afinidad de proteína A, y los pares adecuados de anticuerpos medios se hibridaron* in vitro como se describió anteriormente (Spiess et al. *Nat. Biotechnol.* 2013). Luego de la hibridación, los anticuerpos se purificaron mediante cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) y se caracterizaron por filtración analítica en gel, espectrometría de masas y electroforesis en gel de poliacrilamida. Los anticuerpos purificados funcionan como un único pico (>99% de la señal) en la filtración en gel sin agregados detectados (figura 52A) y no se detectaron homodímeros con la espectrometría de masas (figura 52B).

B. Ensayos in vitro de activación de células T y eliminación de células B.

Se obtienen líneas de células tumorales B a partir de ATCC y se aislaron las PBMC de la sangre completa de los donantes sanos por medio de separación Ficoll. Se separaban las células CD8+T y CD4+T con los kits Miltenyi, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células se cultivaban en RPMI1640 complementado con 10%FBS (Sigma-Aldrich). Para los ensayos de eliminación de células B, las células B vivas fueron separadas como células PI-CD19+ B por medio de FACS, se obtuvo un recuento de células absoluto con perlas FITC agregadas a la mezcla de la reacción como control de recuento interno. Las células T activadas fueron detectadas por la expresión de superficie de CD69 y CD25. La inducción de la granzima B intracelular fue detectada por medio de FACS. La concentración de perforina en el medio se detecta por medio de ELISA (eBioscience). Todos los anticuerpos se adquirieron en BD Bioscience.

C. Estudios de eficacia in vivo en modelos murinos

Los ratones SCID y NSG humanizados fueron adquiridos en Jackson Labs. Los ratones transgénicos con CD20 humano y los ratones transgénicos con CD3 humano fueron producidos como se describe anteriormente (Gong et ál. *J. Immunol.* 174. 817-826, 2005 y de la Here et ál. *J. Exp. Med.* 173: 7-17, 1991), y los ratónes trasgénicos dobles con CD20/CD3 humanos fueron producidos cruzando los dos ratones transgénicos simples. Los modelos de linfoma humano en ratones fueron generados inyectando 5 x 10^6células Bjab-luciferase solas o mezcladas con 10 x 10^6 PBMC de donante humano en HBSS de manera subcutánea en los flancos derechos de 40 ratones hembra. Se trató a los ratones por vía intravenosa con vehículo o TDB CD20 0,5 mg/kg una hora después de la inoculación y una semana después del tratamiento inicial. Los tumores se medían 1-2 veces por semana, y los pesos corporales dos veces por semana después de hasta 7 días a partir del tratamiento final. Si no se observaba pérdida de peso, se dejaba de medir el peso de cierto animal. Si la pérdida de peso era de más del 15% del peso total del cuerpo, los ratones afectados se pesaban a diario, y si excedía el 20%, se sacrificaban (o se dejaban a cargo del personal veterinario). Las observaciones clínicas se realizaron dos veces por semana a lo largo de todo el estudio, para monitorear la salud de los animales, y se sacrificaron todos los animales con tumores de un tamaño o condición que pudiera interferir con la salud o la actividad del mismo. De lo contrario, los animales se sacrificaban 6 meses después del tratamiento inicial o en caso de ulceración del tumor o si el volumen de este excedía 2500 mm^3.

Los modelos de ratones con leucemia linfocítica crónica (CLL) derivada de pacientes se generaron según la descripción anterior (Bagnara et ál. *Blood.* 117 5463-5472, 2011). En resumen, las 5 x 10^5 células T activadas fueron purificadas de PBMC de CLL e inyectadas de manera retro-orbital en los ratones NSG. Después del injerto de la célula T, 2 x 10^7 PBMC CLL se inyectaron de manera retro-orbital. Después de 14 días, la circulación de las células B y T trasplantadas fue confirmada por el análisis FACS. Los animales implantados exitosamente fueron tratados posteriormente, 3,5 semanas después, con

anticuerpos TDB administrados por vía intravenosa, inyectados en la vena de la cola. Los animales fueron sacrificados 6 o 14 días después del tratamiento. Se extrajo la sangre completa por punción del seno retro-orbital utilizando pipetas heparinizadas, y fue trasferida de inmediato a tubos heparinizados, mientras los animales estaban anestesiados, o por punción cardíaca terminal, con una jeringa heparinizada, después de la eutanasia con CO2. Después de la eutanasia con CO2, se recolectaron los bazos. Para todos los estudios, se realizaron observaciones clínicas dos veces por semana para supervisar la salud de los animales. Se medía el peso corporal de los animales al menos una vez por semana. Se aislaron las PBMC después de la lisis celular de glóbulos rojos, y se analizaron por medio de FACS para células B (muCD45+CD19+) y células T (muCD90.2+CD4+, o muCD90.2+CD8+). Todos los anticuerpos utilizados son adquiridos en BD Biosciences o eBiosciences.

D. Estudio PKPD en monos cynomolgus

Todos los estudios en monos cynomolgus se realizaron utilizando monos cynomolgus criados con esa finalidad, no tratados previamente, de origen chino. Para el estudio de PKPD de dosis única, se administró a 3 monos cynomolgus machos una dosis única en bolo lento IV de 1mg/kg de TDB CD20; para la repetición del estudio de dosis, se administró a 4 monos cynomolgus una dosis en bolo lento IV de 1mg/kg de TDB CD20 una vez por semana, por un total de 4 dosis. Se recolectó la sangre completa o los tejidos en los momentos seleccionados para el recuento de células B y células T por medio de FACS. Se recolectó el suero y se almacenó a -70 °C hasta que se analizó por medio de ELISA para determinar la cantidad de artículo de prueba en cada muestra de suero. Se usaron los perfiles de tiempo-concentración sérica de cada animal para estimar los parámetros farmacocinéticos (PK) utilizando el software WinNonlin (Pharsight; Mountain View, CA).

TDB CD20 de alta calidad producido como un IgG de cuerpo completo, humanizado, con propiedad PK de anticuerpo convencional

Para explorar las propiedades objetivo que pueden afectar la potencia de TDB dirigido a células B, que incluyen la identidad del antígeno, tamaño del dominio extracelular y la distancia de epítopo de la membrana, creamos más de 40 TDB dirigidos a epítopes en CD3Ɛ, CD19, CD20, CD22, CD79a y CD79b diferentes. Los resultados representativos se muestran en la Figura 56I. Hallamos que los TDB más potentes fueron aquellos dirigidos a los antígenos para el cáncer con dominios extracelulares pequeños (ECD) y epítopes cercanos a la membrana de la célula objetivo. Entre los mejores objetivos, se encontraron CD20, CD79a y CD79b, con potencias de alrededor de 10 ng/ml o 67 pM para la eliminación de células B de donante normal por parte de las células T autólogas.

TDB anti-CD20/CD3 (CD20-TDB) se describe aquí como una prueba del concepto de molécula, que exhibe la actividad farmacológica de estos TDB dirigidos a células B. Los TDB CD20 fueron producidos como IgG de cuerpo completo, totalmente humanizados,

con arquitectura de anticuerpo natural de bacterias, libres de homodímeros y agregados (Figura 52). La propiedad farmacocinética (PK) de TDB CD20 en ratas, una especie no vinculante, se asemeja a la de otros anticuerpos IgG humanos, con una vida media de cerca de 7 días (Figura 53).

La eliminación de células B con TDB CD20 depende de las células T a lo largo de la vía de granzima-perforina.

Para evaluar TDB CD20 como tratamiento potencial para trastornos proliferativos de células, tales como neoplasias de células CD20 + B, primero investigamos su mecanismo de acción como un anticuerpo biespecífico identificador de células T. A diferencia de la actividad de ADCC, que es el principal mecanismo de acción del tratamiento clásico del anticuerpo monoclonal, TDB CD20 no requiere la región Fc para su actividad. La porción F(ab')2 de TDB CD20 retuvo la misma potencia que el TDB CD20 IgG de cuerpo completo en la eliminación de células B (Figura 54A). TDB CD20 es un agonista condicional, que requiere expresión de objetivo, células T y anticuerpos para la actividad. La actividad de eliminación de células B de TDB CD20 depende de las células T, dado que no se detectó eliminación de células B con PBMC agotadas de células CD3+ T (Figura 54B). Se requiere la expresión del objetivo para la activación de células T, dado que la falta de expresión de CD20 resulta en la ausencia de células T activadas (Figura 54). TDB CD20 es capaz de activar a las células CD4+ y CD8+T, como se mide por la inducción de CD69 y CD25 en las células T (Figura 54D). Se puede lograr una eliminación de células B comparable con células T como efectores, mientras que las células CD8+T parecen más potentes en la eliminación de células BJAB, dado que las células CD8+T resultaron en un mayor rango de eliminación celular que la misma cantidad de células CD4+T (Figura 54C). Sin embargo, la sobreregulación de granzima es más frecuente dentro de las células CD8+T (Figura 54E), así como se detectaron niveles más altos de liberación de perforina y granzimas A y B (no mostradas) asociada con las células CD8+T en el medio, por medio de ELISA (Figura 54F). Las células T activadas son capaces de proliferación (Figura 55). El recuento general de células T, sin embargo, no aumentó de manera significativa después de 24 horas en presencia de TDB CD20 y de células B sin suplemento de citoquinas *in vitro*, probablemente debido a las condiciones del cultivo. De hecho, se observó una expansión robusta de células B *in vivo* en los estudios de eficacia con modelos murinos y en monos cynomolgus (Figuras 58A y 67C).

Potencia de TDB CD20 para la eliminación de las células B de leucemia/linfoma y de las células B autólogas *in vitro*

También se analizó la potencia de TDB CD20 para la eliminación de células B con más de una docena de líneas de células B de leucemia/linfoma *in vitro*. Para evaluar la potencia de CD20-TDB, se seleccionaron 8 líneas que representaran las células con un amplio rango de nivel de expresión de CD20 (Figura 56B). Las curvas de dosis-respuesta de eliminación de células B se muestran con las 8 líneas celulares, con PBMC aisladas, de

donante sano, como células efectoras (figura 56A). Significativamente, CD20-TDB no ha presentado actividad contra las células SU-DHL1, desprovistas de expresión de CD20. La potencia de CD20-TDB se correlacionó con los varios niveles de superficie CD20 detectados mediante la citometría de flujo (56A).. No obstante, TDB CD20 resulta potente en la eliminación de las 8 líneas, de forma dependiente de dosis, con EC50 que oscila entre 0,38 y 11 ng/ml para el ensayo de 24 horas. El alcance de eliminación celular varía entre 60% y 90% con hasta 1000 ng/ml de TDB en un ensayo de 24 horas (Figura 56C). En general, la eliminación completa de células B se logra con una mayor concentración del anticuerpo o un tiempo de ensayo prolongado. Las células SU-DHL-1 se incluyen en el ensayo de eliminación como control negativo de CD20, donde no se observa eliminación celular, lo que demuestra la necesidad de la expresión de objetivo para la actividad de TDB CD20. La actividad de TDB CD20 parece necesitar un nivel muy bajo de expresión de objetivo, como las células Nalm-6 y SC-1 que se muestran aquí tienen muy baja expresión de superficie de CD20 (Figura 56B). La afinidad de unión monovalente de TDB CD20 para CD20 es más débil que la afinidad de unión bivalente del anti-CD20 parental, con un K_D de 54 nM, determinado por Scatchard. Tomados en conjunto, el valor KD y la potencia de eliminación de células B de TDB CD20, la ocupación de receptores necesaria para la actividad de TDB CD20 es solamente menor que 0,1%. Los TDB generados para atacar diferentes antígenos de células B, también son efectivos en la mediación de la eliminación de células B, como se muestra en la figura 56D, donde los TDB dirigidos a 5 antígenos de células B diferentes, entra ellos, un TDB CD20 (TDB A: 2H7v16/UCHT1v9), eliminaron el 75% a 90% de las células B. El TDB CD20 también puede mediar en la eliminación de líneas de linfoma B adicionales con expresión del antígeno de superficie CD20 variable (figura 56E).

El TDB CD20 también resulta muy potente en la eliminación de células B autógenas, comprobado con PBMC humanas aisladas de la sangre periférica, de donantes sanos (figura 56F). En la figura 56F se muestran las curvas de dosis-respuesta de eliminación para 8 donantes aleatorios, así como un resumen de EC50 y el alcance de eliminación de células B (figura 56G) con 1000 ng/ml de anticuerpo en un ensayo de 24 horas, en 30 donantes. De las 30 muestras analizadas, del 57% al 96% de las células B fueron eliminadas con hasta 1000 ng/ml de anticuerpo en el plazo de 24 horas, con EC50 oscilando entre 0,43 y 135 ng/ml, con un valor promedio de menos de 3 ng/ml. El grado de eliminación de células B en el plazo de 24 horas por TDB CD20 es altamente comparable, o aún mayor, que la eliminación de células B por un scFv anti-CD3/anti-CD19 (Figura 56H).

El TDB CD20 resulta potente en provocar el agotamiento de células B *in vivo* en los modelos murinos.

Dado que nuestro TDB CD20 analizado no reconoce los antígenos murinos CD20 y CD3, utilizamos los ratones transgénicos con CD20 humano y CD3 humano (descritos anteriormente) para producir ratones transgénicos dobles con CD3/CD20 humanos para

estudios de eficacia *in vivo* subsiguientes. Como se muestra en la Figura 57A, los ratones transgénicos dobles con CD3/CD20 humanos expresan huCD3$_\varepsilon$ en la superficie de las células CD4+ y CD8+ T, además de huCD20 en la superficie de las células CD19+ B, en niveles detectables, en comparación con las células B y T derivadas humanas. Con ratones transgénicos con CD20 humano, solamente rituximab es capaz provocar el agotamiento de las células B, dado que TDB CD20 no puede captar células T murinas sin expresión de CD3 humano (figura 57B). Mientras que con los ratones transgénicos dobles con CD3/CD20 humanos, TDB CD20 es capaz de captar células T murinas que expresan huCD3 y además resulta potente para provocar el agotamiento de células B murinas que expresan huCD20 (figura 57C). El TDB CD20 parece ser más potente para provocar el agotamiento de las células B *in vivo*, dado que se detectan menos células B en los bazos de ratón 7 días después de una dosis única IV de TDB CD20 de 0,5 mg/kg que después de la administración de una dosis única de rituximab de 10 mg/kg. Aquí se usó como un control del isotipo un TDB HER2, que tiene el mismo grupo de CD3 mientras que con el otro grupo se une a HER2, y no mostró actividad alguna en la disminución celular.

Para explorar la menor dosis eficaz con la cual el TDB CD20 puede agotar las células B en ratones transgénicos dobles con CD3/CD20 de origen humano, los ratones fueron tratados con una dosis única de TDB CD20 que comenzó en 0,5 mg/kg y terminó en 0,00005 mg/kg. Luego, se monitoreó el recuento de células B en la sangre en el D1 (24 horas después de la dosis), el D8 y el D15. Se observó una disminución en el recuento de células B en el D1, y el agotamiento de las células B continuó hasta el D15 luego del tratamiento con TDB CD20 (Figura 58A). De manera coherente con esta observación en el recuento de células B en la sangre, se logró el agotamiento casi completo de las células B en el bazo de ratones en el D7 tras una dosis única de 0,5 mg/kg, mientras que una dosis más baja de 0,05 mg/kg provocó el agotamiento parcial de las células B en el bazo y un nivel aproximado de dosis de ED50 (Figura 58B). Un estudio de evolución temporal realizado con los ratones transgénicos dobles reveló que el agotamiento de las células B es casi completo en el bazo tan solo 3 días después del tratamiento de dosis única de 0,5 mg/kg, sin signos de recuperación significativa de las células B hasta el D14 (Figura 58A). Como se ve en la Figura 58C, el TDB CD20 media el agotamiento de las células B en la periferia de los huCD20/huCD3 transgénicos dobles, lo cual se detecta en la sangre tan solo dos horas después del tratamiento y se mantiene durante hasta siete días después del tratamiento. Además, las células T CD8+ y CD4+ activadas son detectables en la sangre en el plazo de dos horas desde la administración del TDB CD20 y disminuyen dos días después del tratamiento (Figura 58D).

Además, el TDB CD20 agotó las células B de la zona marginal (MZB, por sus siglas en inglés) (Figura 59A y Figura 59B) tan eficientemente como las células B foliculares (FOB, por sus siglas en inglés) (Figura 59A y Figura 59C) en el bazo de ratones, luego de una sola dosis IV de 0,5 mg/kg. Observamos que las células B del bazo disminuyeron ~ 50% con respecto al valor basal hasta el día 1 (24 horas después de la dosis) y continuaron

disminuyendo hasta alcanzar el punto más bajo en el día 3, que se mantuvo durante todo el estudio. Aparentemente, esto difiere de un informe previo con rituximab, donde se piensa que el microambiente cumple una función en la eficacia de rituximab, lo cual sugiere un modo de acción para el TDB CD20 *in vivo* diferente al de rituximab. La activación de las células T murinas suele observarse a los 30 minutos de la administración del tratamiento de TDB CD20 en la sangre, y en el plazo de las primeras 24 horas en el bazo en la mayoría de los casos (Figuras 59D y 59E). Luego de la activación de las células T, se observó un incremento del recuento de las células T en los D2 a D3 aproximadamente (Figura 59D y 59E), como resultado de la proliferación celular. Para el día 2, la mayoría de las células T ya no eran positivas para CD69, aunque los niveles de células CD69+CD8+ siguieron oscilando entre el 10% y el 30% durante el resto del estudio de dos semanas. No obstante, posiblemente debido a la muerte celular inducida por la activación, los recuentos de las células T tienden a disminuir tras la fase de expansión. El recuento de células T finalmente se recuperará luego del tratamiento con TDB, lo cual sugiere que el tratamiento con TDB CD20 no tiene un efecto inhibitorio de la regeneración de las células T murinas.

También se usaron ratones NSG humanizados para continuar con la validación de la potencia del TDB CD20 para el agotamiento de las células B en modelos murinos y en el marco de una dosis repetida. Los ratones reales inscriptos en el estudio que se muestran en las Figuras 60A-60D tenían 35-80% de células CD45+ humanas en la sangre periférica, y los rangos de las células CD4+, CD8+ y CD20+ fueron 12-25, 2,1-8,7 y 32-60% respectivamente (porcentaje informado como fuera de una ventana viable de leucocitos). En la Figura 60E, se muestran ejemplos representativos de este valor inicial. Los niveles de los antígenos objetivo CD3 y CD20 de estos ratones se compararon con los de donantes humanos normales y no se halló que fueran significativamente diferentes (Figura 60F). Los ratones NSG humanizados que se muestran en la Figura 59 fueron tratados con 3 dosis semanales de TDB CD20 de 0,5 mg/kg. Las células B se agotaron en la sangre en el D7, y no se detectó casi ninguna célula B en el D21 (Figura 60A). También se observó un agotamiento sólido de las células B en el bazo de los ratones tratados con TDB en el D21 (Figura 60B). Además, el tratamiento de los ratones NSG humanizados con TDB CD20 estimuló la proliferación de las células T y condujo al agotamiento de las células B, como se muestra en la Figura 60C. El recuento de las células T CD8+ se incrementó hasta 10 veces en la sangre en el D7 y retornó al valor basal o a un valor inferior en el D14 y en el D21 (Figura 60D). Se observó una tendencia similar en las células T CD4+.

CD20 TDB es potente para eliminar las células B de la CLL *in vitro* e *in vivo*

También realizamos pruebas para determinar la potencia del TDB CD20 para eliminar las células B de la leucemia con células T autólogas de pacientes con CLL, donde la carga tumoral B suele ser alta mientras que el recuento de células T es bajo y la función de las células T podría estar potencialmente deprimida (Riches et al. *Semin. Cancer Biol.* 20(6):

431-438, 2010). Las PBMC aisladas de la sangre periférica de nueve pacientes con CLL fueron incubadas con una sola dosis elevada de 1000 ng/mL de TDB CD20 durante hasta 48 horas. Como se muestra en la Figura 61A, TDB CD20 es potente en la eliminación de las células B de la CLL con células T autólogas. Para las 2 muestras que se ven, la carga tumoral de la leucemia de células B es del 70% con el 8,4% de las células T CD8+ en las PBMC para la muestra de paciente n.º 1, y del 80% con el 4,4% de las células T CD8+ para la muestra de paciente n.º 2. TDB CD20 aparentemente puede lograr una eliminación eficiente de células B con relaciones efector/objetivo muy bajas (1:8 y 1:18 con las 2 muestras que se ven aquí). La eliminación de las células B de la CLL con células T autólogas que produce TDB CD20 tiene una alta correlación con el recuento de células T CD8+ (Figura 61B). Descubrimos que el contenido de las células T variaba de manera significativa (entre el 0,4% y el 8% de las células mononucleares), y cabe destacar que observamos que el alcance de la citólisis de las células B en comparación con los valores previos al tratamiento se correlacionaba en gran medida con el contenido de las células T. Al suplementar con las células T CD8+ purificadas a las PBMC de la CLL, donde hay muy pocas células T análogas disponibles, las células B de la leucemia fueron eliminadas eficientemente por TDB CD20 de una forma dependiente de las células T (Figura 61C).

TDB CD20 también es potente para provocar el agotamiento de las células de leucemia CLL injertadas en ratones (Figura 62A). En resumen, se injertaron células de leucemia de pacientes a los ratones NSG luego de injertar células T autólogas activas obtenidas de los pacientes y el tratamiento se inició luego de confirmar que el injerto de leucemia se había establecido. La tinción de IHC de ejemplos representativos de bazos de ratones mostró el injerto exitoso de las células B de leucemia y de células T autólogas de pacientes con CLL en ratones NSG. Luego de una dosis única de 0,1 o 0,5 mg/kg del tratamiento con TDB CD20, se pudieron detectar pocas células B. El agotamiento de las células B también se observó con el tratamiento de rituximab, mientras que no se detectó agotamiento alguno de las células B con el TDB HER2 como control del isotipo. (Figura 62B).

En el contexto de la progresión del tumor, el tratamiento con TDB CD20 es efectivo para prevenir el crecimiento de tumores tipo linfoma de células B en presencia de un donante humano de PBMC. Los ratones SCID (inmunodeficiencia severa combinada) con trasplantes de células Bjab humanas desarrollaron tumores detectables cuando fueron tratados con el vehículo o con TDB CD20 solo para el día 12 luego de la inoculación. Además, el trasplante solo de las PBMC demoró la excrecencia de tumores, aunque estos ratones desarrollaron tumores detectables para el día 25 luego de la inoculación. Por lo tanto, TDB CD20 también es efectivo para prevenir el crecimiento de tumores *in vivo* en presencia de células efectoras PBMC (Figura 63).

La potencia de TDB CD20 requiere un muy bajo nivel de expresión de CD20.

Además del requisito diferente para la región de anticuerpo Fc para la actividad de TDB CD20 comparada con un anti-CD20 convencional, y de la posible dependencia del

microambiente del tumor, TDB CD20 también parece requerir un menor nivel de antígeno para la eliminación eficiente de las células B. Para las células Bjab, que tienen un alto nivel de expresión de CD20 (Figura 64A), se logró una eliminación de células comparable con rituximab y TDB CD20 (Figura 64B). Sin embargo, las células Nalm-6, SC-1 y OCI-Ly19, que tienen un nivel de expresión de CD20 mucho más reducido (Figura 64A) solamente fueron eliminadas con TDB CD20 mientras que no se detectó eliminación de estas células con rituximab (Figura 64C). El número estimado de copias de CD20 para estas líneas celulares bajas de CD20 es menor que 500, en base a los datos de scatchard y de la unión de FACS en comparación con las células BJAB (no se muestran los datos). Además, la afinidad de unión monovalente de TDB CD20 para CD20 es ~50-100 nM, significativamente menor que la afinidad de 1-5 nM de rituximab (ambas medidas con scatchard). En conjunto, la potencia de CD20-TDB es coherente con la noción de que la activación de TCR solamente requiere una ocupación de receptores baja de 10-100 moléculas (Purbhoo, M.A., et al. *Nat Immunol* 5:524-530, 2004; Irvine, D.J.,et al. *Nature* 419:845-849, 2002; Sykulev, Y., et al. *Immunity* 4:565-571, 1996).

TDB CD20 es activo en presencia de rituximab y esteroides

Como rituximab y su combinación con la quimioterapia se utilizan ampliamente para tratar neoplasias de células B en la práctica clínica, es importante explorar cómo se puede utilizar TDB CD20 en este contexto, dado que tanto TDB CD20 como rituximab se enfocan en el mismo antígeno. Aprovechamos al rituximab-DANA, una variante no efectora de rituximab (rituximab con sustituciones de los residuos 265 y 297 a la alanina (mutaciones DANA descritas en las patentes de EE. UU. n.º 7,332,581 y 8,219,149)), la cual solamente se une a CD20 sin actividad de eliminación de células B, según las pruebas realizadas en ratones transgénicos dobles con CD20/CD3 humanos (Figura 64D). El tratamiento previo de células B objetivo de donantes normales con esta molécula inerte de rituximab que compite con la unión de TDB CD20 tuvo un efecto extraordinariamente mínimo en la reducción de la actividad de TDB CD20. En concentraciones de hasta 250 µg/ml rituximab-DANA (5000 veces en exceso sobre el nivel del dosis EC50 de 42 ng/ml), observamos solamente pequeños cambios en las curvas de respuesta a la dosis *in vitro* (un cambio menor a 7 veces en la EC50, 42 en comparación con 320 ng/ml). Cabe destacar que TDB CD20 sigue siendo activo en este marco. Aunque la EC50 para TDB CD20 se incrementó hasta ~7 veces con la concentración más elevada de rituximab-DANA, el grado de eliminación de células B no cambió significativamente (Figura 65A). Esto es coherente con nuestros hallazgos previos, según los cuales, para la potencia de TDB CD20, se requiere un nivel muy bajo de expresión del antígeno, o una ocupación muy baja de receptores. Las observaciones *in vitro* se recapitularon *in vivo* en ratones transgénicos duales CD3/CD20 que fueron tratados previamente con 2 o 10 mg/kg de la proteína rituximab-DANA y posteriormente recibieron TDB CD20. Aquí, mostramos *in vivo* que TDB CD20 sigue provocando el agotamiento de células B en ratones tratados previamente con rituximab-DANA (Figura

66). Estos resultados indican una gran versatilidad en las combinaciones prospectivas de tratamientos para neoplasias de células B.

TDB CD20 es un anticuerpo que recluta células T, y su potencia depende de la activación de las células T. También se realizaron exploraciones para ver si el tratamiento previo con esteroides, que potencialmente podría tener un impacto en la respuesta inmune de las células T, afectaría la actividad de TDB CD20. *In vitro,* TDB CD20 seguía eliminando las células B en presencia de una alta concentración de dexametasona (Figura 65B).

Validación preclínica de TDB CD20 como tratamiento potencial para neoplasias de células B CD20+ en monos cynomolgus

También se realizó un estudio piloto PKPD para TDB CD20 en monos cynomolgus. En un estudio de dosis única, en el cual 3 animales fueron tratados una vez de forma intravenosa con 1mg/kg de TDB CD20, se observó el agotamiento completo de las células B en la sangre (Figura 67A), así como también en el bazo y en los nódulos linfáticos (Figuras 67B y 67C), 7 días después del tratamiento con el anticuerpo. Los controles históricos del vehículo se muestran como la media y la desviación estándar de 4 animales tratados con vehículo (Figura 67D). No se observó una pérdida de células aparente, ya que tanto las células T CD8+ como las células T CD4+ tenían niveles comparables o más elevados que los de los controles, cuando se calcularon como % de linfocitos. Se detectó la activación de las células T en la sangre 4 horas después de la administración de la dosis. No se detectó pérdida de células T, y se detectó un recuento de células T CD8+ aparentemente más elevado en la sangre 7 días después del tratamiento (Figura 67A).

El efecto a largo plazo del tratamiento con TDB CD20 en células inmunes también se examinó en un estudio de dosis repetida de 4 semanas seguido de un período de recuperación de 8 semanas. En la sangre de 4 animales tratados con una dosis semanal de 1mg/kg, los recuentos delas células B y T, así como también la concentración sérica de TDB CD20, se midieron y se graficaron para cada animal individual durante 77 días (Figura 68A). En los 4 animales, las células B no se detectaron en la sangre poco tiempo después del tratamiento y no regresaron mientras la concentración sérica de TDB CD20 permaneció por encima de 100 ng/ml (animal 4502 en comparación con los animales 4001, 4002 y 4503). Los recuentos de células T CD8+, así como también los de las células T CD4+ en menor medida, se incrementaron significativamente luego de la primera dosis y retornaron gradualmente al 25-150% de los valores basales. Si se consideran juntas, TDB CD20 es altamente activo en producir el agotamiento de las células B, sin comprometer a las células T.

La propiedad PK de TDB CD20 también se resumió en la Figura 68B, con las mediciones de la concentración sérica de TDB CD20 de ambos estudios. Como se mostró para el estudio de dosis repetidas, TDB CD20 mantuvo una buena exposición durante todo el estudio, con una eliminación de aproximadamente 17 ml/día/kg durante la primera dosis (D0-D7). La eliminación mediada por el objetivo parece ser más elevada durante la primera dosis (D0-D7), ya que el valor de eliminación disminuyó hasta

aproximadamente 6 ml/día/kg durante la cuarta dosis (D21-28).

Combinación de TDB CD20 con un antagonista de PD-L1 es un modelo tumoral singeneico

También se examinó la eficacia in vivo de un TDB CD20 en combinación con un antagonista de PD-L1 (un anticuerpo anti-PD-L1 isotipo IgG2a murino, 25A1, con mutaciones DANA) en un modelo tumoral singeneico. En este estudio, se utilizaron células de linfoma B A20-huCD20 de ratones que expresan el CD20 humano y un PD-L1 de ratón sobre su superficie celular para generar un modelo tumoral singeneico (consulte, p.ej., la Figura 69A). El TDB CD20 utilizado fue un isotipo IgG2a murino 2H7v16/2C11 TDB producido en formato "botón en ojal" (K&H, consulte, p.ej., Atwell et al., *J Mol Biol.*, 270:26-35, 1997), donde el grupo "botón" es anti-CD20 2H7v16 y el grupo "ojal" es anti-CD3 2C11 (Leo et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 84:1374-8, 1987). El antagonista de PD-L1 utilizado fue un isotipo IgG2a murino anti-PD-L1 con mutaciones Fc DANA (sustitución de los residuos 265 y 297 a la alanina; consulte, p.ej., las patentes de EE. UU. n.º 7,332,581 y 8,219,149).

En el Día -7, 65 ratones Balb/C fueron inoculados simultáneamente en el área torácica unilateral derecha con 2,5 millones de células A20pRK-CD20-GFP en HBSS en un volumen de 100 µl (que no debía exceder los 200 µl). Se permitió que los ratones desarrollaran tumores. Luego, los ratones fueron pesados y medidos de 1 a 2 veces por semana hasta que los tumores alcanzaron un volumen medio tumoral de aproximadamente 100 a 200 mm^3 (aproximadamente 7 días después de la inoculación). Los animales luego fueron divididos en los siguientes grupos de tratamiento: Grupo 1: 2,5 millones de A20/CD20, Vehículo, qwx3, IV, n=9; Grupo 2: 2,5 millones de A20/CD20, anti-CD20xCD3 K&H TDB (2H7v16-2C11 IgG2 murino), 0,5 mg/kg, qwx3, IV, n=9; Grupo 3: 2,5 millones de A20/CD20, aPDL1 (25A1, mIgG2a DANA), 10 mg/kg, tiwx3, IP, n=9; y Grupo 4: 2,5 millones de A20/CD20, aPDL1 (25A1, mIgG2a DANA), 10 mg/kg, tiwx3, IP + anti-CD20xCD3 K&H TDB (2H7-2C11 IgG2 murino), 0,5 mg/kg, qwx3, IV, n=9. A los ratones que no se reunieron en uno de los grupos de tratamientos mencionados debido a tumores disimilares, se les practicó la eutanasia. El tratamiento comenzó el Día 0, y todas las dosis de anticuerpos se administraron por vía intravenosa en un volumen de 100 ml como se describió más anteriormente.

Los tumores se midieron de 1 a 2 veces por semana. El peso corporal de los animales se midió dos veces por semanas hasta 7 días después del tratamiento final. Si no se observaba pérdida de peso, se dejaba de medir el peso. Si se observaba que la pérdida de peso era >15%, los ratones afectados se pesaban diariamente y se les practicaba la eutanasia si la pérdida de peso era mayor o igual al 20%. Durante todo el estudio, las observaciones clínicas se realizaron dos veces por semana para monitorear la salud de los animales, y se le practicó la eutanasia a todo animal que tuviera un tumor de un tamaño o condición que pudiera interferir con su salud o actividad.

Como se muestra en la Figura 69B, el tratamiento combinado de TDB CD20 con el

anticuerpo anti-PD-L1 (Grupo 4) exhibió un efecto sinérgico inesperado en la inhibición del crecimiento tumoral cuando se comparó con el tratamiento con TDB CD20, anticuerpo anti-PD-L1 o vehículo solos.

Combinación de TDB CD20 con un antagonista de PD-1 es un modelo tumoral singeneico

Adicionalmente, se probó también la eficacia *in vivo* de un CD20 TDB en combinación con un antagonista de PD-1 (un anticuerpo anti-PD1 con isotipo IgG2 murino, 8F11, con mutaciones DANA) en el modelo sinérgico de ratón B con linfoma A20/huCD20. En este estudio, el CD20 TDB usado fue un isotipo isotype 2H7v16/2C11 TDB IgG2a murino y el antagonista PD-1 usado fue un anticuerpo anti-PD-1 con isotipo IgG2 con mutaciones DANA Fc.

Se transfectaron células B de los ratones A20 para expresar CD20 y GFP humano y posteriormente se clasificó una única célula para determinar la selección clonal y la expansión para la implementación. Ratones Balb/c hembra (Charles River; Hollister, CA) de 8-10 semanas fueron inoculados subcuténeamente en la región torácica unilateral derecha con 2,5 millones de células A20.hCD20-GFPCuando los tumores alcanzaron un volumen medio de 100-200 mm^3, los ratones se seleccionaron y colocaron aleatoriamente en los siguientes cuatro grupos de tratamiento n=9 ratones/grupo) y el tratamiento con anticuerpo comenzó al día siguiente 1: Grupo 1 2,5 millones A20/CD20, vehículo, qwx3, IV); Grupo 2 (2,5 millones A20/CD20, anti-CD20xCD3 K&H TDB (2H7v16-2C11 IgG2 murino), 0,5 mg/kg, qwx3, IV); Grupo 3 (2,5 millones A20/CD20, anti-PD1 (8F11, mIgG2a DANA), 10 mg/kg, tiwx3, IP) y Grupo 4 (2,5 millones A20/CD20, anti-PD1 (8F11, mIgG2a DANA), 10 mg/kg, tiwx3, IP + anti-CD20xCD3 K&H TDB (2H7v16-2C11 IgG2 murino), 0,5 mg/kg, qwx3, IV).

Los ratones se trataron con vehículo o CD20 TDB a 0,5mg/kg semanalmente IV durante 3 semanas, y/o anticuerpo anti-PD-1 a 10mg/kg IV para la primera dosis, seguido de dosificación IP 3 veces por semana durante 3 semanas. (N=9 ratones/grupo)

Como se muestra en las Figuras 108A y 108B, el tratamiento combinado de CD20 TDB con anticuerpo anti-PD-1 (Grupo 4) mostró un efecto inesperado y sinergístico al mostrar el crecimiento del tumor al compararlo con el tratamiento con el anticuerpo CD20 TDB, anti-PD-1 o con vehículo solamente.

Ejemplo 4. Generación y caracterización de los TDB CD3/FcRH5 ejemplares. (TDB FcRH5)

Además, exploramos la capacidad de anticuerpos de TDB para reclutar las actividades citotóxicas de las células T de extirpación de las células tumorales mediante el reconocimiento de un antígeno de superficie celular diferente, FcRH5. Para ello, generamos y caracterizamos anticuerpos anti CD3 que tienen un brazo anti-CD3 y un brazo anti-FcRH5 (TDB de FcRH5). Como se describió anteriormente, los TBD FcRH5 se

produjeron como anticuerpos de longitud completa en el formato de botón en ojal (knob-into-hole) como IgG1 humana, como se describió previamente (Atwell et al. *J. Mol. Biol.* 270: 26-35, 1997). La mitad de los anticuerpos se expresaron en *E. coli*, purificados por cromatografía de afinidad de proteínas A, y los pares adecuados de anticuerpos medios se hibridaron *in vitro* como se describió anteriormente (Spiess et al. *Nat. Biotechnol.* 2013). Luego de la hibridación, los TBD FcRH5 se purificaron mediante cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC, por sus siglas en inglés) y se caracterizaron por filtración analítica en gel, espectrometría de masas y electroforesis en gel de poliacrilamida, como se describió anteriormente. Un grupo anti-FcRH5 utilizado en la generación de los TDB FcRH5 fue el del anticuerpo anti-FcRH5 1G7, que comprende: (a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos con n.° de ID de SEC.: 268 y (b) un dominio de VL que comprende una secuencia de aminoácidos con n.º de ID de SEC.: 269. Los grupos anti-CD3 examinados en la generación de los TDB FcRH5 incluían a UCHT1v9, 40G5c, 38E4v1 y 38E4v1.

Los TDB FcRH5 específicos se examinaron para detectar la unión de células T CD8+ (unión CD3), así como también la actividad, según lo evaluado por ensayos de citotoxicidad *in vitro* y ensayos de activación de células T.

A. Afinidad de unión

Las afinidades de unión para cada uno de los TDB FcRH5 se examinaron mediante análisis FACS, como se describió anteriormente para los TDB CD20. Brevemente, para ensayos de unión FACS, se incubaron células T CD8+ con distintas concentraciones de anticuerpos de TDB FcRH5 a 4 °C durante 30 minutos, luego las células se lavaron e incubaron con el segundo anticuerpo (anti-huIgG-PE, BD Bioscience) durante otros 15 minutos, antes de que las células fueran lavadas nuevamente y estuvieran listas para el análisis FACS. La figura 70 muestra los resultados de ensayos de unión de FACS *in vitro* de los TDB FcRH5. Los resultados demuestran que la combinación particular del grupo del anticuerpo anti-CD3, 38E4v1, emparejado con el grupo del anti-FcRH5, 1G7, da como resultado un anticuerpo FcRH5 con una afinidad de unión mayor con las células efectoras.

B. Ensayos in vitro de activación de células T y eliminación de células diana MOLP-2

Los TDB FcRH5 también se examinaron para determinar su capacidad para respaldar la eliminación de las células diana MOLP-2 que expresan FcRH5 y la activación del efecto citotóxico de las células T. *La citotoxicidad* in vitro se monitoreó mediante citometría de flujo. Las células diana se marcaron con CFSE de acuerdo con el protocolo del fabricante (Invitrogen, n.º C34554). Las células diana marcadas con el éster de succinimidilo de carboxifluorescenía (CFSE) y las células T CD8+ purificadas de PBMC humanas se mezclaron en una relación 3:1, con o sin TDB durante 48 horas. Las células se resuspendieron en un volumen igual de PBS + 2% FBS + 1 mM EDTA + yoduro de propidio (PI). El análisis de citometría de flujo se realizó en un FACSCalibur en formato

de automatización. El número de células diana vivas se contó mediante la apertura o cierre de las células negativas CFSE+/PI. El porcentaje de citotoxicidad se calculó de la siguiente manera: % de citotoxicidad (número de células diana vivas sin TDB, número de células diana vivas con TDB) / (número de células diana vivas sin TDB) x 100. Como se representa en las Figuras 71A y 71B, los TDB FcRH5 con UCHT1v9 o 38E4v1 para su grupo anti-CD3 mostraron una eliminación de células diana MOLP-2 sólida *in vitro* en comparación con el TDB FcRH5 que tiene 40G5c como su grupo anti-CD3.

Al realizar las pruebas para los ensayos de activación de las células T, las Figuras 72A a 72D, muestran que los TDB FcRH5 con UCHT1v9 o 38E4v1 para su grupo anti-CD3 eran capaces de inducir fuertemente la actividad de las células T *in vitro*, en comparación con el TDB FcRH5 que tiene 40G5c como su brazo anti-CD3. En estos ensayos, las células diana y las células T CD8+ purificadas se mezclaron en presencia o ausencia de TDB y se analizó la activación de las células T mediante la citometría de flujo. Al final de la incubación, las células se tiñeron con CD8-FITC (BD Bioscience, 555634) CD69-PE (BD Bioscience, 555531) y CD107a-Alexa-Fluor647 (eBioscience, 51-1079). Opcionalmente, después de que la superficie se tiñó con CD8-FITC y CD69-PE, las células se fijaron y se permeabilizaron con una solución de Cytofix/Cytoperm (BD Bioscience, 554722) y se tiñeron de forma intracelular con anti-granzima B-Alexa-Fluor647 (BD Bioscience, 560212). La activación de las células T se evaluó a través del porcentaje de células CD8+CD69+, CD8+CD107a+ y CD8+CD69+GranzymaB+.

Ejemplo 5. Generación y caracterización de los TDB CD3/HER2 ejemplares. (TDB HER2)

Además, exploramos la capacidad de anticuerpos de TDB para reclutar las actividades citotóxicas de las células T de extirpación de las células tumorales mediante el reconocimiento de un antígeno de superficie celular diferente, HER2. Para ello, generamos y caracterizamos anticuerpos anti CD3 que tienen un brazo anti-CD3 y un brazo anti-HER2 (TDB HER2). Como se describió anteriormente, los TDB HER2 se produjeron como anticuerpos de longitud completa en el formato de botón en ojal como IgG1 humana, como se describió previamente (Atwell et al. *J. Mol. Biol.* 270: 26-35, 1997). La mitad de los anticuerpos se expresaron en *E. coli* o en células de ovarios de hámster chino (CHO), purificados por cromatografía de afinidad de proteínas A, y los pares adecuados de anticuerpos medios se hibridaron *in vitro* como se describió anteriormente (Spiess et al. *Nat. Biotechnol.* 2013). Si la producción de anticuerpos TDB se llevó a cabo en células CHO, el anticuerpo incluyó una mutación de glicosilación, por ejemplo, en el residuo N297 (p. ej., N297G), de manera tal que el anticuerpo TDB era una variante sin efector e incapaz de iniciar citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés). Luego de la hibridación, los TBD HER2 se purificaron mediante cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC, por sus siglas en inglés) y se caracterizaron por filtración analítica en gel, espectrometría de masas y electroforesis en gel de poliacrilamida, como se describió anteriormente. Un grupo anti-

HER2 utilizado en la generación de los TDB HER2 fue el del anticuerpo anti-HER2 hu4D5, que comprende: (a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 270 y (b) un dominio de VL que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 271. Los TDB HER2 adicionales se generaron para dirigirse a diferentes regiones del dominio extracelular (ECD, por sus siglas en inglés) de HER2. Un anticuerpo anti-HER2, 2C4, se utilizó como un grupo anti-Her2 que consta de: (a) un dominio de VH que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 593 y (b) un dominio de VL que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 594. Otro anticuerpo anti-HER2 utilizado como un grupo anti-HER2 fue el del anticuerpo anti-HER2, 7C2, que consta de: (a) un dominio de VH que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 595 y (b) un dominio de VL que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 596. Otros grupos anti-HER2 utilizados en la generación de los TDB HER2 incluyeron variantes de afinidad hu4D5, hu4D5.91A y hu4D5.Y100A (descrito en US 7,435,797).

Los TDB HER2 específicos se examinaron para la unión de células T CD8+ (unión CD3) y células SKBR3 (unión Her2), así como para la actividad, según lo evaluado por ensayos de toxicidad *in vitro* y ensayos de activación de células T.

A. Afinidad de unión

Las afinidades de unión para cada uno de los TDB HER2 se examinaron mediante análisis FACS, como se describe anteriormente para los TDB CD20. Brevemente, para ensayos de unión FACS, se incubaron células Jurkat (para el antígeno CD3), células CD8+ humanas (para el antígeno CD3) o SKBR3 (para el antígeno Her2) con distintas concentraciones de anticuerpos de TDB HER2 a 4 °C durante 30 minutos, luego las células se lavaron e incubaron con el segundo anticuerpo (anti-huIgG-PE, BD Bioscience; o anti-huIgG-AlexaFluor647, Southern Biotech) durante otros 15 minutos, antes de que las células se lavaran nuevamnte y estuvieran listas para el análisis FACS. La media geométrica de fluorescencia se leyó mediante citometría de flujo. Las Figuras 73, 76A, 78A-78C, 79A y 80A-80B muestran los resultados de los ensayos de unión FACS *in vitro* de los TDB HER2.

Los múltiples grupos HER2 que se unen a diferentes regiones de HER2 se examinaron en combinación con múltiples grupos CD3 que se unen a distintas regiones de CD3ε para caracterizar las propiedades de unión de cada combinación. La Figura 76A proporciona la estructura cristalina del ECD HER2 y la del $CD3_{\varepsilon}$ y resalta las regiones a las que se unen los diferentes grupos HER2 y CD3. El anticuerpo HER2 hu4D5 se conoce como trastuzumab y se une a un epítopo en el dominio IV de HER2 que es la región proteica que está más cerca de la membrana celular. El anticuerpo monoclonal recombinante humanizado 2C4 (rhuMAb 2C4) también se conoce como pertuzumab, que se une a un epítopo en el dominio II de HER2 que está a 50 angstromios del lugar donde se une hu4D5. Pertuzumab (PERJETA®, Genentech, Inc, South San Francisco) representa el primero de una nueva clase de agentes conocidos como inhibidores de la dimerización de HER (HDI, por sus siglas en inglés) y de funciones para inhibir la capacidad de HER2

de formar heterodímeros u homodímeros activos con otros receptores HER (tales como EGFR/HER1, HER2, HER3 y HER4) (Harari and Yarden. *Oncogene* 19:6102-6114, 2000; Yarden and Sliwkowski. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2:127-137, 2001; Sliwkowski. *Nat. Struct. Biol.*

10:158-159, 2003; Cho et al. *Nature* 421:756-60, 2003; and Malik et al. *Pro. Am. Soc. Cancer Res.* 44:176-177, 2003). El anticuerpo murino anti-HER2 7C2 se une a un epítopo en el dominio I de HER2 (publicación de PCT N.° WO 98/17797) que está a 100 angstromios de la región de HER2 unido por hu4D5 (Figura 76A).

Además, la afinidad de unión del TDB HER2 se probó con múltiples grupos anti-CD3. Uno de los grupos anti-HER2 proporcionados se combinó con grupos de alta afinidad dirigidos a CD3 humanos, tales como SP34 y 38E4v1. Otras combinaciones de TDB HER2 incluyó los grupos de baja afinidad dirigidos a CD3 humanos 40G5c o el grupo de 2C11 dirigido al CD3 murino. UCHT1v9 por su grupo anti-CD3 y hu4D5 por su grupo anti-HER2, referido en este documento como TDB HER2 (UCHT1v9/hu4D5) o TDB HER2, se comparó con el anticuerpo anti-HER2, trastuzumab y los fragmentos trastuzumab Fab en un ensayo de Scatchard competitivo (Ramirez-Carrozzi et al. *Nature Immunology*. 12: 1159-1166, 2011). En este ensayo, la unión a SKBR-3 se determinó por la competencia de unión de ^{125}I-trastuzumab Fab con trastuzumab, trastuzumab Fab o TDB HER2 bioespecíficos. La Figura 74A muestra los resultados del competitivo ensayo de Scatchard *in vitro* de TBD HER2.

B. Ensayos in vitro sobre la eliminación de células diana SKBR3 y MCF7 y la activación de células T

Las combinaciones de TDB HER2 de uno de los tres grupos anti-HER2 (hu4D5, 2C4 y 7C2) con el grupo anti-CD3 de alta afinidad 38E4v1 o con el grupo de baja afinidad 40G5c se examinaron *in vitro* por su capacidad de mediar en la eliminación de células diana de células SKBR3 o MCF7 que expresan HER2 (Figura 77). La actividad *in vitro* de los TDB hu4D5 con cualquier grupo anti-CD3 demostró ser más eficaz que los TDB 2C4 y 7C2 en la mediación de la eliminación celular máxima de las células SKBR3 y MCF7 como se mide por su EC50 (Figura 78). Esta actividad de eliminación también dependía del grupo CD3 utilizado. La combinación del grupo anti-CD 3 38E4v1 con cualquiera de los grupos anti-HER2 hu4D5, 2C4 o 7C2 fue más eficaz que las combinaciones de TDB HER2 40G5c (Figura 79). La prueba adicional de las 6 combinaciones de TDB HER2 reveló que su actividad de eliminación de células diana no depende del nivel de la expresión de HER2 en las células diana. La figura 80 muestra que los TDB HER2 no eran selectivos para los altos HER2 que expresan las células diana SKBR3 sobre los bajos HER2 que expresan las células diana MCF7. La actividad del TDB HER2 era, en cambio, dependiente de la afinidad del grupo anti-HER2 de HER2 (Figura 81). Los TDB de baja afinidad HER2 retuvieron la actividad en células MCF7 que expresan HER2 bajos y no pudieron matar selectivamente a las células SKBR3 amplificadas de HER 2 (Figura 82).

Los TDB HER2 también se ensayaron para determinar la especificidad del grupo anti-HER2 para sus respectivos epítopos HER2. La actividad de eliminación del TDB HER2

hu4D5-40G5c se limitó cuando se combinó con concentraciones crecientes de Trastuzumab (hu4D5). Sin embargo, la eficacia de trastuzumab no se ve afectada por la combinación del TDB hu4D5 con el anticuerpo hu4D5 (Figura 83). Por el contrario, la eliminación de las células diana mediada por 2C4-40G5c o 7C2 38E4v1 bloqueada por la coadministración de los anticuerpos monoespecíficos bivalentes pertuzumab (2C4) o 7C2, respectivamente (Figura 83). Cuando los grupos anti-HER2 se probaron en múltiples ensayos de afinidad, todos los clones que demostraban actividad alta o media de TDB HER2 competían con trastuzumab o pertuzumab (Figura 84). Para la identificación de los TDB candidatos para el ensayo *in vivo*, los grupos CD3 de alta (38E4v1, 38E4 y SP34) y baja (40G5c y 2C11) afinidad se probaron *in vitro* con células T CD3+ humanizadas derivadas de ratones en combinación con los grupos anti-HER2 hu4D5, 2C4 y 7C2 (Figuras 85-86). A partir de este ensayo, se seleccionaron tres TDB candidatos según su actividad de eliminación para una mayor caracterización *in vivo*: hu4D5-SP34, hu4D5-2C11 y 2C4-38E4. El tratamiento de animales con tumores con expresión HER2 con el TDB HER2 hu4D5-2C11 resultó en un aumento en las células CD45+ y CD8+ en el tumor tan pronto como a las 4 horas luego del tratamiento. Tras un análisis adicional, los tumores tratados TDB HER2 revelaron un aumento en las células T IFNγ+ y PD1+ CD8+ y un aumento en presencia de células T reguladoras (Treg) (Figura 87B). La detección de un aumento de infiltrados inmunes en tumores también se relacionó con una disminución del volumen del tumor de los animales tratados TDB HER2, en comparación con el tratamiento de control del vehículo (Figura 87A). En la figura 88A, el grupo anti-HER2 hu4D5 se combinó con el grupo anti-CD3 de baja afinidad, 2C11 o con el grupo anti-CD3 de alta afinidad, SP34, y ambos resultaron en la regresión del tumor en ratones HER2 transgénicos. Sin embargo, esta respuesta no se observó con el grupo anti-GER2 2C4 de baja afinidad combinado con el grupo anti-CD3 de alta afinidad 38E4 (Figuras 88A-88B).

El TDB HER2 también se comparó con fragmentos de trastuzumab y trastuzumab Fab bivalentes por su capacidad de inhibir directamente la proliferación de SKBR3. Las células dianas que expresan HER2 se incubaron en placas de 96 pocillos a una densidad de 5×10^3 células/posillo y se incubaron durante la noche para la fijación celular antes del tratamiento con el anticuerpo o fragmento de anticuerpo designado. Se analizó la proliferación/viabilidad celular después de 6 días de tratamiento mediante el Ensayo de viabilidad celular luminiscente CELLTITERGLO® (Promega, Madison, WI). En la Figura 74B se muestran los resultados de este ensayo. Además, se realizó un ensayo *in vitro* de toxicidad con trastuzumab, trastuzumab producida en *E. coli* y TDB HER2 para medir su capacidad para inducir la citotoxicidad NK mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC) (Jefferis *Trends in Pharmacological sciences.* 30: 356-362, 2009; Simmons et al. *Journal of Immunological Methods*. 263: 133-147, 2002). Los anticuerpos producidos en E. *coli* no están glicosilados, lo que resulta en deterioro de la unión FcyR, que se necesita para mediar la ADCC. El ensayo de citotoxicidad se realizó como en Junttila et al. (*Cancer Research.* 70: 4481-4489, 2010) con un a kit de detección de

citotoxicidad; LDH (Roche, Mannheim, Alemania). Brevemente, las células lisadas se detectaron mediante la liberación de la deshidrogenasa láctica (LDH, por sus siglas en inglés) después de 4 horas de tratamiento con el anticuerpo especificado. Los resultados se muestran en la Figura 74C.

Los TDB HER2 también se probaron para determinar su capacidad para soportar la eliminación de las células diana SKBR3 que expresan HER2 y la activación del efecto citotóxico de las células T. *La citotoxicidad* in vitro se controló mediante citometría de flujo. Las células dianas se marcaron con éster de succinimidilo de carboxifluoresceína (CFSE, por sus siglas en inglés) de acuerdo con el protocolo del fabricante (Invitrogen, # C34554). Las células diana marcadas con CFSE y las células T CD8+ purificadas de PBMC humanos se mezclaron en cierta proporción E:T (como se indica en las leyendas de la figura), con o sin TDB por 24 horas. Al final de la incubación, las células se levantaron con tripsina y se juntaron de la placa. Las células se resuspendieron en un volumen igual de PBS + 2% FBS + 1 mM EDTA + yoduro de propidio (PI). El análisis de citometría de flujo se realizó en un FACSCalibur en formato de automatización. El número de células diana vivas se contó mediante la apertura o cierre de las células negativas CFSE+/PI. El porcentaje de citotoxicidad se calculó de la siguiente manera: % de citotoxicidad (número de células diana vivas w/o TDB, número de células diana vivas w/TDB) / (número de células diana vivas w/o TDB) x 100. Como se muestra en la Figura 75, el TDB HER2 mostró una eliminación de células diana SKBR3 *in vitro* fuerte comparada con el TDB HER2 que tenía una variante de afinidad hu4D5 91A o Y100A como su grupo anti-HER2 (EC50 de hu4D5/ UCHT1v9 TDB = 0,1 ng/ml; hu4D5.91A/ UCHT1v9 TDB = 25,5 ng/ml; hu4D5.Y100A/ UCHT1v9 TDB = no se puede determinar).

Además, la afinidad de unión de la variante hu4D5 de anti-HER2 (0,4 nM) al dominio extracelular de HER2 (ECD) es mayor que los grupos HER2 2C4 (2,0 nM) y 7C2 (1,7 nM), que se muestra en la Figura 76B. Además, la Figura 76C muestra que el TDB HER2 hu4D5 es un mediador más potente de la eliminación de las células diana MCF7 que el TDB HER2 2C4 y el TDB HER2 7C2. La cinética de la eliminación inducida por el TDB HER2 se ensayó adicionalmente. Como se observa en la Figura 94A, no se detectó actividad de eliminación significativa a las 4-12 horas. La eliminación fuerte se detectó a las 24 horas y la eliminación aumentó con el paso del tiempo. Como se muestra en las figuras 90A, 90C y 92C, la comparación adicional de los grupos anti-CD3 del TDB HER2 hu4D5 demostró la eficacia de los diferentes clones en la mediación de la eliminación de células SKBR3 que expresan HER2. En particular, dos TDB Her2, hu4D5/38E4c y hu4D5/40G5c, fueron sorprendentemente tan o más eficaces en la mediación de la eliminación de las células dianas que el TDB HER2 hu4D5/SP34 (Figuras 90B y 90C).

Cuando se probó para ensayos de activación de células T, la Figura 89 muestra que el TDB HER2 fue capaz de inducir sólidamente la actividad de la células T *in vitro*, en comparación con el TDB HER2 que tiene variante de afinidad hu4D5 91A o Y100A como su grupo anti-HER2. Tres grupos anti-CD3 (SP34, 38E4c y 40G5c) del TDB HER2 hu4D5 ensayados mostraron diferentes afinidades de unión para el antígeno CD3 en células T

CD8+ humanas, como se observa en la Figura 91A. No obstante, los tres TDB HER2 pudieron mediar la activación de células T CD8+ (Figura 91B). En la Figura 92D, se muestra un análisis adicional de la capacidad de los grupos anti-CD3 38E4 y 38E4c del TDB HER2 hu4D5 para mediar la activación de células T CD8+. Se ensayó aún más la cinética de la activación de células T mediante TDB HER2. Aparecieron signos tempranos de activación de células T (CD69) 4 horas después del inicio del tratamiento de TDB HER2. Sin embargo, los marcadores de activación tardía (CD107a extracelular) se detectaron más tarde en el punto temporal de 24 horas (Figura 94A). Además, la activación de células T no se detectó después de 48 horas cuando las células CD8+ se incubaron con TDB HER2 o células diana que no expresan HER2 humana (células BJAB). Se observó una sólida activación de células T cuando las células HER2+ SKBR3 se utilizaron como dianas acompañadas por la liberación de gránulos citotóxicos (Figura 93A).

También probamos la capacidad de TDB HER2 para inducir la eliminación de células diana BT474 y se ensayó la activación de células T para las siguientes cinco relaciones de células T CD8+ efectoras a las células diana: 1:5, 1:2, 1:1, 3:1, y 5:1. Este experimento revela que la citotoxicidad medida por la liberación de LDH se redujo significativamente mediante la titulación de células efectoras. Sin embargo, incluso con una relación E: T de 1: 1, se detectó una señal de LDH débil y la sólida activación de las células T (Figura 94B).

En estos ensayos, las células diana y las células T CD8+ purificadas se mezclaron en presencia o ausencia de TDB y se analizó la activación de células T mediante la citometría de flujo. Al final de la incubación, las células se tiñeron con CD8-FITC (BD Bioscience, 555634) CD69-PE (BD Bioscience, 555531) y CD107a-Alexa-Fluor647 (eBioscience, 51-1079). Opcionalmente, las células se tiñeron con CD8-FITC y CD69-PE, donde la activación de células T se evaluó por el porcentaje de CD8+CD69+ en las células CD8+. Alternativamente, después de que la superficie se tiñó con CD8-FITC y CD69-PE, las células se fijaron y se permeabilizaron con una solución de Cytofix/Cytoperm (BD Bioscience, 554722) y se tiñeron de forma intracelular con anti-granzima B-Alexa-Fluor647 (BD Bioscience, 560212). La activación de células T se evaluó por el porcentaje de células CD8+CD107a+.

Otro índice para la citotoxicidad mediada por células T para TDB HER2 (UCHT1v9 / hu4D5) medido es un ensayo de exocitosis de los gránulos. La Figura 93B muestra los resultados para la perforina soluble (Cell Sciences), granzima A y granzima B (eBioscience) detectados a partir del medio de crecimiento por el método ELISA de acuerdo con los protocolos del fabricante. En este ensayo, se utilizó un TDB control (10 ng/ml), uno que comparte el mismo grupo AD3 como TDB HER2 pero que tiene un grupo para la diana irrelevante, o TDB HER2 (10 ng/ml). Los anticuerpos se incubaron de manera individual por 18 horas con células diana SKBR3 y células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés) efectoras, que se separaron de la sangre de voluntarios sanos a través del medio de separación de linfocitos (MP

Biomedicals, Solon, OH). *La citotoxicidad* in vitro se midió mediante la liberación de LDH, como se describe anteriormente. Se realizó una serie de ensayos de apoptosis con TDB HER2 (1 ng/ml), PBMC efectoras y células diana SKBR3. Después de 24 horas de tratamiento, la exocitosis de gránulos coincidió con una significativa elevación inducida de TDB HER2 de la actividad de la caspasa 3/7 (CASPASE-GLO® ensayo 3/7, Promega), apoptosis (ensayo Cell Death Detection ELISAplus, Roche) y citotoxicidad tal como se midió por la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH), como se describe anteriormente (Figura 93C).

La capacidad de TDB HER2 para inducir la eliminación de HER2 o células 3T3 transfectadas con el vector se midió mediante el ensayo de citotoxicidad de LDH antes mencionado, donde no se detectó ninguna eliminación de células 3T3 transfectadas con el vector después de 19 horas. En cambio, las células 3T3 transfectadas HER2 se eliminaron de manera muy eficiente (Figura 93D). El ensayo de eliminación se modificó para bloquear la unión del grupo HER2 mediante trastuzumab Fab (1µg/ml) o el dominio extracelular HER2 soluble (HER2 ECD) (1 mg/ml) y dio lugar a la inhibición eficaz de la actividad de eliminación después de 24 horas (Figura 93E). Para confirmar que las células T dependen de la eliminación, se mermaron las células CD3+ del OPBMC mediante microperlas CD3+ de Miltenyi (# 130-050-101). La Figura 93F muestra la disminución que resultó en la pérdida de la actividad de eliminación de células diana después de 19 horas, tal como se evaluó mediante análisis de FACS en presencia de TDB HER2.

TDB HER2 induce la proliferación de células T

Para investigar si TDB HER2 induce la proliferación de células T, se co-cultivaron células T CD8 +, células diana (SKBR3) y TDB HER2 de 0,1 µg/ml, seguido por el cultivo de células T en ausencia de células diana y TDB HER2. La proliferación de células T se midió en el día 3 mediante citometría de flujo como una dilución de CFSE en las células CD8+/PI con divisiones celulares. Después de 3 días, el 75% de las células T pulsadas con TDB HER2 y las células diana se habían sometido a una división celular como se muestra en la Figura 95A. El número de células T inducidas TDB HER2 se ensayó mediante el etiquetado de células T CD8+ purificadas con CFSE de acuerdo con el protocolo del fabricante (Invitrogen, # C34554). Las células T CD8+ marcadas con CFSE se incubaron con células dianas en presencia o ausencia de TDB por 19 horas. Las células T se recogieron, lavaron y cultivaron de 2 a 7 días (RPMI+10% FBS). El número de células CD8+ vivas (CD8+/PI-) y el porcentaje de células dim CFSE se detectaron mediante FACS. En la Figura 95B, el número de células no aumentó. Complementar aún más el medio de crecimiento con IL-2 (20 ng/ml) proporcionó una señal de supervivencia para las células CD8 + y se detectó una sólida proliferación de células T en las células T, pero sólo si estaban expuestas al TDB HER2 y a las células diana (Figura 95C). Es importante destacar que no se detectó ningún efecto espectador en las células de expresión no dianas en condiciones donde la mayoría de las células HER2+ en la misma cultura

resultaron eliminadas. TDB HER2 indujo la proliferación y la expansión policlonal de células T, lo que puede ser crítico para la amplificación de los linfocitos infiltrantes de tumor.

La actividad TDB HER2 se relaciona con el nivel de expresión HER de la célula diana

Para investigar la relación entre el número de copias de la diana y la actividad TDB, se seleccionó un panel de líneas celulares de cáncer con un número predeterminado de HER2-receptores en la membrana celular (Aguilar et al. *Oncogene*. 18:6050-62, 1999). Se detectaron niveles de expresión de proteínas HER2 en una línea celular negativa HER2 (BJAB LUC), 3 líneas de células bajas 3 HER2 (MDA435, MDA231, MCF7) y 3 líneas celulares amplificadas/de sobreexpresión HER2 (MD453, SKBR3, BT474) mediante Western blot (Figura 96A). Las líneas celulares de HER2 negativos, HER2 bajos y sobreexpresión de HER2 se incubaron con TDB HER2 y con PBMC efectoras en una relación E:T 25:1 durante 26 horas. En este punto de tiempo, la citotoxicidad se detectó a través del ensayo de liberación de LDH. La Figura 96B muestra que las células amplificadas/de sobreexpresión HER2 fueron significativamente más sensibles a la eliminación mediada por TDB (p = 0,015, t-test) y se lisaron eficientemente a femtomolar a bajas concentraciones picomolares (EC50 = 0,8-3 pM). Las líneas celulares que expresan niveles bajos de HER2 fueron significativamente menos sensibles al anticuerpo TDB HER2 (EC50=33-51 pM). Una cantidad de <1000 copias de antígeno diana fue suficiente para apoyar la eliminación de células T.

Para los estudios realizados en las Figuras 96C-96D, la línea celular MCF7 o la línea celular BJAB estaba co-dirigida con células SKBR3 en presencia de TDB HER2 en el mismo ensayo de eliminación. En este ensayo, las células MCF7 o BJAB se marcaron con CFSE y se mezclaron con SKBR3 y PBMC (E:T 20:1), seguido de 19 horas de tratamiento con TDB HER2. Las células se tiñeron con APC y PI anti-HER2. La Figura 96C muestra el porcentaje de las células vivas SKBR3 (HER2 alto, PI-) y MCF7 (CFSE+. PI-) detectado mediante FACS y normalizado a perlas fluorescentes. No se detectó la eliminación de las células MCF7 en el EC50 para la eliminación de SKBR3. Se muestra el porcentaje de células vivas de SKBR3 (HER2 elevado, PI-) y BJAB (CFSE+ PI-) detectadas por FACS y normalizadas por perlas fluorescentes. No se detectó ninguna muerte importante de células de BJAB en cualquier concentración de TDB HER2 (Figura 96D).

La ocupación objetivo baja es suficiente para la actividad de TDB

Luego, se calculó la ocupación de HER2 en EC50 para TDB HER2 mediante la utilización de la fórmula [D]/[D]+K_D (donde D = medicamento y K_D para TDB HER2 era 5,4 nM). Se informó el número de copia de HER2 (Aguilar et ál. Oncogene. 18: 6050-6062, 1999). Los valores de EC50 se calcularon de los datos de respuesta de la dosis en la Figura 97B. La Figura 96E muestra que en todas las líneas celulares probadas inferiores al 1 % de la ocupación diana era suficiente para una eliminación eficiente. En caso del

HER2 elevado que expresa líneas celulares, la ocupación requerida era incluso inferior (0,01-0,05 %). El número absoluto calculado de TBD HER2 ligado a HER2 en el EC50 era tan solo 10-150 en las líneas celulares bajas expresadas. Estos resultados muestran la extrema potencia de TDB HER2 y son coherentes con los estudios del desencadenante de TCR, que sugiere tan solo 1-15 TCR que deben involucrarse para desencadenar las respuestas a las células T (Irvine et ál. *Nature*. 419: 845-849, 2002; Purbhoo et ál. *Nature Immunology*. 5: 524-530, 2004; Sykulev et ál. *Immunity*. 4: 565-571, 1996). La potencia de TDB HER2 era coherente en el rango bajo de picomolar a femtomolar. Además, tan solo 10-500 TDB ligados a HER2 eran suficientes para inducir una citotoxicidad importante *in vitro*. Tan solo ~1000 copias de HER2 en la membrana plasmática eran suficientes para inducir la muerte. Estos estudios también demostraron una correlación entre los niveles de expresión objetivo y la sensibilidad *in vitro* a los TDB HER2.

El TDB HER2 es eficiente en la muerte de las células cancerígenas de HER2+ resistentes a los tratamientos anti-HER2.

Luego, se examinaron las líneas celulares que se han mostrado previamente para expresar niveles elevados de HER2 pero que son insensibles a los efectos celulares directos de trastuzumab y lapatinib *in vitro* (Junttila et ál., *Cancer Cell*, 15:429-40, 2009; Junttila et ál. *Breast Cancer Res Treat*, 2010). Para algunas líneas celulares, la activación de la vía de PI3K debido a las mutaciones de activación adquiridas en la subunidad catalítica de PI3K (KPL4, HCC202) o por la pérdida de PTEN (HCC1596) puede provocar resistencia. Un panel de seis líneas celulares (5 mamas, 1 pulmón) se analizó para la liberación de LDH como medición de citotoxicidad en presencia de PBMC efectores en una proporción de 10:1 y TDB HER2 durante 19 horas. El EC50 para la muerte mediada de TDB HER2 estaba en el rango femtomolar o picomolar bajo (Figura 97A). Los clones BT474-M1 resistentes a T-DMI1 y parentales se trataron con T-DMI1 durante 3 días. En este punto temporal, se midió la viabilidad celular con CELLTITERGLO® (Figura 97B). Se ha informado con anterioridad la sensibilidad de las líneas celulares a T-DM1 (Junttila et ál. *Breast Cancer Res Treat*. 2010; Lewis Phillips et ál. *Cancer Research.* 68: 9280-9290, 2008). En comparación, los clones de BT474-M1 resistentes a T-DM1 y parentales se trataron con TDB HER2 en presencia de las células CD8+ T efectoras en una proporción de 3:1 durante 24 horas. Se detectó citotoxicidad con el ensayo FACS (Figura 97C). Además, TDB HER2 era eficaz en la muerte de las células cancerígenas del pulmón HER2+. Con dos modelos de líneas celulares independientes KPL4 y BT474, (Figura 97B-97C), la resistencia adquirida a T-DM1 no afectó la sensibilidad a TDB HER2.

La identificación de la actividad de eliminación de células T con TDB HER2 depende de la expresión HER2, pero es independiente de la vía de señalización de HER2, que sugiere que TDB HER2 pueda ser eficiente en el tratamiento de tumores que son resistentes a los tratamientos actuales anti-HER2. Además, los datos demostraron actividad igual en el tratamiento de las líneas celulares resistentes a trastuzumab/lapatinib múltiples en comparación con las células sensibles. La resistencia

en estas células se genera mediante diversos mecanismos que afectan la vía de HER2. Los datos presentados aquí sugieren que el cambio al mecanismo alternativo de acción mediante la utilización de TDB HER2 puede permitir ampliamente superar la resistencia a los conjugados del medicamento del anticuerpo (p. ej., T-DM1), inhibidores de moléculas pequeñas objetivo (p. ej., lapatinib) y anticuerpos monoclonales clínicos que bloquean la señalización de la vía (p. ej. trastuzumab).

Farmacocinética de TDB HER2 en la rata

Para evaluar el perfil de la farmacocinética (PK) de TDB HER2, se utilizaron ratas Sprague Dawley. Los animales se separaron en los dos grupos mencionados a continuación: Grupo 1: TDB HER2 (10 mg/kg, IV única, n = 4); Grupo 2: trastuzumab (10 mg/kg, IV única, n = 4). Las muestras se tomaron de 4 ratas por grupo en puntos temporales durante 35 días posteriores a la dosis. Aproximadamente se recolectó 0,2 ml de sangre completa a través de la vena yugular (bajo anestesia de CO_2/O_2). Se dejaron coagular y centrifugar las muestras bajo refrigeración (5 °C durante 10 minutos a 2000 x g) a fin de obtener suero. Las muestras de suero se analizaron para IgG humano mediante ELISA, donde se utilizó un burro anti-huFc recubierto con placa de microtitulación para capturar los anticuerpos anti-HER2 humanizados en circulación y una cabra anti-huFc-HRP (adsorbida por el ratón) para la detección. Los parámetros de PK se determinaron con un método de 2 compartimientos (Modelo 7) con WINNONLIN®, versión 5.2.1 (Pharsight Corp., Mountain View, CA). El TDB HER2 no reacciona con CD3 de ratas o HER2 de ratas y mostró una disposición bifásica típica de un IgG1 con una fase de distribución corta y una fase de eliminación lenta (Figura 98). Tanto la depuración como la vida media de TDB HER2 eran similares para trastuzumab, y dentro del rango esperado de un IgG1 típico en ratas.

TDB HER2 inhibe el crecimiento del tumor *in vivo* en ratones inmunodeprimidos

La eficacia in vivo de TDB HER2 se probó en ratones NOD-SCID, que carecen de células T y B funcionales endógenas y han reducido los niveles de tipos celulares de NK, DC y macrófagos. En este experimento, los ratones NOD/SCID (NOD.CB17-*Prkdcscid*/J, Jackson Labs West) se implantaron con 0,36 mg, gránulos de estrógenos de liberación sostenida por 60 días (Innovative Research of America) 1 a 3 días antes de la inoculación celular, de manera subcutánea sobre el costado opuesto de la inoculación tumoral. En el Día 0, las células MCF7-neo/HER2 5 x 10^6 se inyectaron solas o juntas con PBMC humano no estimulado 10×10^6 de uno de dos donantes sanos (PBMC 1, 2) en HBSS-matrigel en la almohadilla de grasa mamaria derecha de 2/3. Los ratones inoculados se dividieron en los siguientes cinco grupos: Grupo 1: Vehículo (TDB de control, 0,5 mg/kg, qwk x 3, IV, comenzando el día 0, n=5-10); Grupo 2: PBMC(1) (PBMC (1) + TDB de control, 0,5 mg/kg, qwk x 3, IV, comenzando el día 0, n=5-10); Grupo 3: PBMC (1) + TDB HER2 (PBMC (1) + TDB HER2, 0,5 mg/kg, qwk x 3, IV, comenzando el día 0, n=5-10); Grupo 4: PBMC(2) (PBMC (2) + TDB de control, 0,5 mg/kg, qwk x 3, IV, comenzando el día 0, n=5-

10); Grupo 5: PBMC (2) + TDB HER2 (PBMC (2) + TDB HER2, 0,5 mg/kg, qwk x 3, IV, comenzando el día 0, n=5-10). Los primeros tratamientos se administraron 2 horas después de la inoculación. Los volúmenes de los tumores de ratones individuales y los volúmenes de los tumores adaptados de los grupos terapéuticos se presentan en la Figura 99A, donde TDB HER2 evitó el crecimiento de los tumores que expresan HER2.

La dependencia de TDB HR2 en los PBMC humanos además se probó en un modelo de ratones inmunodeprimidos similares. Nuevamente, las células MCF7-neo/HER2 5 x 10^6 se inyectaron solas o juntas con PBMC humano no estimulado 10×10^6 de un donante sano (PBMC 3) en HBSS-matrigel en la almohadilla de grasa mamaria derecha de 2/3, y los primeros tratamientos se administraron 2 horas después de la inoculación. En la Figura 100A, los ratones inoculados se dividieron en los siguientes dos grupos: Grupo 1: Sin tratar (n=7); Grupo 2: TDB HER2 (TDB HER2, 0,5 mg/kg, qwk x 3, IV, comenzando el día 0, n=7). En la Figura 100B, los ratones inoculados se dividieron en los siguientes tres grupos: Grupo 1: Sin tratar (n=7); Grupo 2: PBMC(3) (PBMC (3) + vehículo, 0,5 mg/kg, qwk x 3, IV, comenzando el día 0, n=7); Grupo 3: PBMC(3) + TDB de control (PBMC(3) + TDB-2C11 de control, 0,5 mg/kg, qwk x 3, IV, comenzando el día 0, n=7). Las mediciones del volumen del tumor resultante no revelan ningún efecto en el crecimiento del tumor en animales tratados con TDB de control.

El TDB HER2 provoca regresión de los tumores mamarios grandes en ratones transgénicos huHER2

Para modelar la actividad de TDB HER2 en ratones inmunocompetentes, se utilizaron ratones transgénicos MMTV-huHER2 humanos (Finkle et ál. *Clinical Cancer Research*. 10: 2499-2511; 2004), y un TDB HER2 sustituto que comprende un clon del anticuerpo del reactivo CD3 IgG2A murino 2C11 (Leo et ál. *Proc Natl Acad Sci USA*. 84: 1374-1378, 1987) se generó para evitar una respuesta inmunitaria hacia el TDB. Para la expresión como mulgG2a, las mutaciones equivalentes del botón en ojal (Atwell et ál. *J Mol Biol.* 270: 26-35, 1997) se introdujeron en la región Fc, así como D265A y N297G (numeración UE) para eliminar la función efectora. En TDB HER2 mulG2a el brazo "botón" es hu4D5 anti-HER2 murino y el "ojal" es CD3 2C11 anti-murino quimérico (Leo et ál. *Proc Natl Acad Sci USA*. 84: 1374-1378, 1987) (TDB 2C11/hu4D5) o CD3 SP34 anti-hu del ratón (Pessano et ál. *La Publicación de EMBO.* 4: 337-344, 1985) (TDB SP34/hu4D5). Los anticuerpos biespecíficos DE mulG2a se expresaron en células CHO y se ensamblaron mediante un ensamble *in vitro*. Los anticuerpos biespecíficos se purificaron de contaminantes mediante cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) como se describe en otro lugar (Speiss et ál. *Nat Biotechnology.* 31: 753-758, 2013). El material resultante se analizó para los niveles de endotoxinas con un sistema de prueba portátil ENDOSAFE® (Charles River, EE.UU.) y cuando sea necesario, el contenido de la endotoxina se redujo mediante el lavado de la proteína con 0,1 % de TRITON™ X-114. La actividad *in vitro* de TDB hu4D5/2C11 era similar a TDB HER2 reactivo de CD3 humano (Figura 101).

En la Figura 99B-99D, los animales transgénicos MMTV-99D con tumores mamarios establecidos se dividieron en los siguientes dos grupos: Grupo 1: Vehículo (0,5 mg/kg, qwk x 5, IV, comenzando el día 0, n=7); y el Grupo 2: TDB HER2 (TDB HER2 (2C11/hu4D5), 0,5 mg/kg, qwk x 5, IV, comenzando el día 0, n=7). La figura 99B muestra una regresión detectada en 57 % de los ratones y el 43 % de los ratones no tenían ningún tumor detectable tras el tratamiento. La figura 99C muestra que TDB HER2 (2C11/hu4D5) dio lugar a más de 50 % de regresión tumoral, salvo un tumor. Los participantes incluían tumores que eran >1000 mm^3 al comienzo del tratamiento como se observa en la Figura 99D. En un experimento similar dos TDB de control se utilizaron donde uno es un TDB de control del brazo de CD3 con el brazo de CD3 específico murino cambiado al brazo de CD3 específico humano (TDB HER2 (SP34/hu4D5)), y uno es un TDB de control, uno que comparte el mismo brazo de CD3 que el TDB HER2 (2C11/hu4D5) pero tiene un brazo diana irrelevante (CTRL TDB-2C11). En la Figura 99E, los animales transgénicos MMTV-huHER2 con tumores mamarios establecidos se dividieron en los siguientes dos grupos: Grupo 1: TDB de control del brazo de CD3 (TDB HER2 (SP34/hu4D5), 0,5 mg/kg, qwk x 5, IV, comenzando el día 0, n=5); y el Grupo 2: TDB de control (TDB-2C11 de control, 0,5 mg/kg, qwk x 5, IV, comenzando el día 0, n=5). El crecimiento de los tumores transgénicos MMTV-huHER2 no se vio afectado por los TDB de control.

El TDB HER2 además se probó para la eficacia *in vivo* en ratones transgéncios huCD3. Los ratones transgénicos humanos CD3ε se han descrito anteriormente ((huCD3 transgénico), de la Hera et ál. *J Exp Med.* 173: 7-17, 1991). En este estudio, 0,1 millones de células de CT26-HER2 se inyectaron subcutáneamente en ratones transgénicos huCD3. Una vez que se establezcan los tumores CT26-HER2, los animales se dividieron en los siguientes dos grupos: Grupo 1: Vehículo (0,5 mg/kg, qwk x 3, IV, comenzando el día 0, n=7); Grupo 2: TDB HER2 (TDB HER2 (SP34/hu4D5), 0,5 mg/kg, qwk x 3, IV, comenzando el día 0, n=7). TDB HER2 inhibió el crecimiento de los tumores establecidos, pero el efecto fue transitorio y no se observaron respuestas completas (Figura 99F). El estudio demostró la actividad *in vivo potente* de TDB HER2, incluyendo las respuestas dramáticas en ratones transgénicos MMTV-huHER2.

En un experimento similar, la eficacia *in vivo* del TDB HER2 reactivo del ratón (2C11/hu4D5) se probó en ratones Balb/c. Nuevamente, los tumores singénicos se establecieron en ratones Balb/c inyectando células CT26-HER2 $1x10^5$ subcutáneamente. Los animales que tenían tumores se dividieron en uno de los siguientes cuatro grupos: Grupo 1: Vehículo (0,5 mg/kg, qwk x 3, IV, comenzando el día 0, n=10); Grupo 2: TDB HER2 (TDB HER2 (2C11/hu4D5), 0,5 mg/kg, qwk x 3, IV, comenzando el día 0, n=10); Grupo 3: TDB de control (CTRL TDB (2C11/hu4D5), 0,5 mg/kg, qwk x 3, IV, comenzando el día 0, n=10); y el Grupo 4: TDM-1 (TDM-1, 15 mg/kg, qwk x 3, IV, comenzando el día 0, n=10). La figura 99G muestra que a pesar de las respuestas incompletas, el TDB HER2 prolongó el tiempo de manera significativa a la evolución del tumor (valor p de rango logarítmico <0,0001). Por contraste, el TDB de control con un brazo tumoral irrelevante

no tuvo efecto en el crecimiento tumoral. Además, los tumores no eran sensibles a TDM-1.

TDB HER2 inhibe el crecimiento de tumores establecidos en ratones inmunocompetentes

Los ratones transgénicos humanos CD3ε (de la Hera et ál. *J Exp Med.* 173: 7-17, 1991) se utilizaron para modelar la actividad de TDB HER2 en ratones inmunocompetentes. En este experimento, las células T transgénicas huCD3 fueron extraídas de bazos de ratones transgénicos y BALB/c huCD3 o de la sangre periférica de donantes humanos sanos. Las células se tiñeron con CD8 de ratón o humano y CD3 humano (UCHT1 clon) en la Figura 101A o el CD3 del ratón (2C11 clon) en la Figura 101B. Las células CD8+ se detectaron mediante citometría de flujo. La Figura 101A muestra el CD3 humano expreso de las células T transgénicas huCD3 a aproximadamente 50 % del nivel de las células T humanas, y la Figura 101B muestra CD3 murino expreso de las células T transgénicas huCD3 a aproximadamente 50 % del nivel de ratones BALB/c.

Luego, las células T transgénicas huCD3 se analizaron por su capacidad de matar células objetivo de CT26 que expresan HER2 *in vitro.* En este estudio, las células T fueron extraídas de bazos de ratones transgénicos huCD3, ratones BALB/c huCD3 o de sangre periférica proveniente de donantes humanos sanos. *La actividad de matar* in vitro de las células CT26-HER2 se probó con TDB HER2 específico de CD3 humano (UCHT1v9/hu4D5) en la Figura 102A o TDB HER2 específico del ratón (2C11/hu4D5) en la Figura 102B. Las células T efectoras se agregaron en una proporción de 20:1 a las células objetivo en presencia de TDB HER2 diseñado durante 40 horas. *La citotoxicidad* in vitro se controló mediante citometría de flujo. Si bien la actividad de eliminación de las células T esplénicas del ratón (EC50 = 2,4 ng/ml) fue inferior de manera coherente en comparación con las células T periféricas humanas (EC50 = 0,4 ng/ml), las células T transgénicas huCD3 eliminaron las células diana que expresan HER2 humano *in vitro* como se observa en la Figura 102A. El TDB HER2 específico del ratón (2C11/hu4D5) indujo matar las células objetivos mediante células T provenientes de ratones transgénicos huCD3 (EC50 = 11 ng/ml) y BALB/c (EC50 = 10 ng/ml) como se observa en la Figura 102B.

La dependencia de las células T de la actividad antitumoral de TDB HER2 además se analizó en un modelo tumoral singénico. Como se describe anteriormente, las células CT26-HER2 1x105 se inyectaron en ratones BALB/c. Los ratones con tumores establecidos se dividieron en uno de los siguientes dos grupos: Grupo 1: Vehículo (n=10); Grupo 2: TDB HER2 (SP34/hu4D5) (TDB HER2 (SP34/hu4D5), 0,5 mg/kg, qwx3, IV, n=10). La figura 103 muestra que la actividad de TDB HER2 dependía de las células T, dado que el TDB HER2 no tuvo efecto alguno en ratones transgénicos sin huCD3. El presente estudio demostró ratones transgénicos huCD3 que se pueden utilizar como modelo de eficacia novedosa para las moléculas objetivo de huCD3.

Ejemplo 6. Generación y caracterización de los TDB de CD3/LYPD1 ejemplares.

Además, exploramos la capacidad de anticuerpos de TDB para identificar las actividades citotóxicas de las células T en extirpar las células tumorales mediante el reconocimiento de un antígeno de superficie celular diferente, LYPD1. Para ello, generamos y caracterizamos anticuerpos anti-CD3 que tienen un brazo anti-CD3 y un brazo anti-LYPD1 (TDB de LYPD1). Como se describió anteriormente, los TBD de LYPD1 se produjeron como anticuerpos de longitud completa en el formato de botón en ojal (knob-into-hole) como IgG1 humana, como se describió previamente (Atwell et ál. *J. Mol. Biol.* 270: 26-35, 1997). La mitad de los anticuerpos se expresaron en *E. coli* o en células de ovarios de hámster chino (CHO), purificados por cromatografía de afinidad de proteínas A, y los pares adecuados de anticuerpos medios se hibridaron *in vitro* como se describió anteriormente (Spiess y otros. *Nat. Biotechnol.* 2013). Si la producción de anticuerpos TDB se llevó a cabo en células CHO, el anticuerpo incluyó una mutación de glicosilación, por ejemplo, en el residuo N297 (p. ej., N297G), de manera tal que el anticuerpo TDB era una variante sin efector e incapaz de iniciar citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés). Luego de la hibridación, los TBD LYPD1 se purificaron mediante cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC, por sus siglas en inglés) y se caracterizaron por filtración analítica en gel, espectrometría de masas y electroforesis en gel de poliacrilamida, como se describió anteriormente. Un grupo anti-LYPD1 utilizado en la generación de los TDB LYPD1 fue el del anticuerpo anti-LYPD1 YWO.49.H6, que comprende: (a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos con N.° de ID de SEC.: 272 y (b) un dominio de VL que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 273. Los brazos anti-CD3 probados en la generación de los TDB LYPD1 incluían UCHT1v9, 40G5, SP34, y 38E4v1

Los TDB HER2 específicos se examinaron para la unión de células CD8+ T (unión CD3), así como la actividad, según lo evaluado por ensayos de toxicidad *in vitro* y ensayos de activación de células T.

A. Afinidad de unión

Las afinidades de unión para cada uno de los TDB LYPD1 se examinaron mediante análisis FACS, como se describió anteriormente para los TDB CD20. Brevemente, para ensayos de unión FACS, se incubaron células T CD8+ T con distintas concentraciones de anticuerpos de TDB LYPD1 a 4 °C durante 30 minutos, luego las células se lavaron e incubaron con el segundo anticuerpo (anti-huIgG-PE, BD Bioscience; o anti-huIgG-AlexaFluor647, Southern Biotech) durante otros 15 minutos, antes de que las células se lavaran nuevamente y estuvieran listas para el análisis FACS. La figura 104 muestra los resultados de ensayos de unión FACS *in vitro* de TDB LYPD1. Los estudios de unión mostraron que los TDB LYPD1 que tienen UCHT1v9 o 38E4v1 como su brazo anti-CD3 demostraron una afinidad de unión más elevada para las células efectoras resultantes.

B. Ensayos in vitro sobre la muerte de células OVCAR3.Luc y la activación de células T

Los TDB LYPD1 también se probaron para determinar su capacidad para soportar la eliminación de las células diana OVCAR3 que expresan LYPD1 y la activación del efecto citotóxico de las células T. *La citotoxicidad* in vitro se controló mediante citometría de flujo. Las células dianas se marcaron con CFSE de acuerdo con el protocolo del fabricante (Invitrogen, # C34554). Las células diana marcadas con el éster de succinimidilo de carboxifluoresceína (CFSE) y las células T de CD8+ purificadas de PBMC humanos se mezclaron en una proporción 3:1, con o sin TDB durante 48 horas. Las células se resuspendieron en un volumen igual de PBS + 2% FBS + 1 mM EDTA + yoduro de propidio (PI). El análisis de citometría de flujo se realizó en un FACSCalibur en formato de automatización. El número de células diana vivas se contó mediante la apertura o cierre de las células negativas CFSE+/PI. El porcentaje de citotoxicidad se calculó de la siguiente manera: % de citotoxicidad (número de células diana vivas sin TDB, número de células diana vivas c/TDB) / (número de células diana vivas sin TDB) x 100. Como se representa en la Figura 105, los TDB LYPD1 con UCHT1v9, 38E4v1, o SP34 para su brazo anti-CD3 mostraron una eliminación de células diana OVCAR3.Luc *in vitro* en comparación con el TDB LYPD1 que tiene 40G5 como su brazo anti-CD3.

Cuando se prueba para los ensayos de activación de las células T, la Figura 106 muestra que los TDB LYPD1 con 38E4v1, en menor medida, UCHT1v9 y SP34, para su brazo anti-CD3 eran capaces de inducir fuertemente la actividad de las células T *in vitro*, en comparación con el TDB LYPD1 que tiene 40G5c como su brazo anti-CD3. En estos ensayos, las células diana y las células T CD8+ purificadas se mezclaron en presencia o ausencia de TDB y se analizó la activación de las células T mediante la citometría de flujo. Al final de la incubación, las células se tiñeron con CD8-FITC (BD Bioscience, 555634) CD69-PE (BD Bioscience, 555531) y CD107a-Alexa-Fluor647 (eBioscience, 51-1079). Opcionalmente, después de que la superficie se tiñó con CD8-FITC y CD69-PE, las células se fijaron y se permeabilizaron con una solución de Cytofix/Cytoperm (BD Bioscience, 554722) y se tiñeron de forma intracelular con anti-granzima B-Alexa-Fluor647 (BD Bioscience, 560212). La activación de las células T se evaluó mediante el porcentaje de las células CD8+CD69+ y CD8+CD25+.

Otras modalidades

Si bien la invención antes mencionada se ha descrito con detalle mediante la ilustración y ejemplo a efectos de mayor esclarecimiento, las descripciones y ejemplos no se deben interpretar como limitación del alcance de la invención. Las descripciones de toda la patente y la bibliografía científica citada en la presente descripción se incorporan expresamente en su integridad como referencia.

ANTI-CD3 ANTIBODIES AND METHODS OF USE

FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to anti-cluster of differentiation 3 (CD3) antibodies and methods of using the same.

BACKGROUND

Cell proliferative disorders, such as cancer, are characterized by the uncontrolled growth of cell subpopulations. They are the leading cause of death in the developed world and the second leading cause of death in developing countries, with over 12 million new cancer cases diagnosed and 7 million cancer deaths occurring each year. The National Cancer Institute estimates that greater than half a million Americans will die of cancer in 2013, accounting for nearly one out of every four deaths in the country. As the elderly population has grown, the incidence of cancer has concurrently risen, as the probability of developing cancer is more than two-fold higher after the age of seventy. Cancer care thus represents a significant and ever-increasing societal burden.

Longstanding approaches to cancer treatment include chemotherapy, radiation therapy, and surgery to remove solid tumors. Recently, bispecific antibody-based immunotherapies have been developed. Such bispecific antibodies are capable of simultaneously binding cell surface antigens on cytotoxic cells and tumor cells, with the intent that the bound cytotoxic cell will destroy the bound tumor cell. Existing bispecific antibodies currently undergoing clinical trials for treating cancer are limited by their short half-lives and/or variable efficacy. Thus, there is an unmet need in the field for the development of effective bispecific antibodies for use in cancer treatment.

SUMMARY

The present invention relates to anti-cluster of differentiation 3 (CD3) antibodies and methods of using the same.

In one aspect, the invention features an anti-CD3 antibody, wherein the anti-CD3 antibody comprises a binding domain comprising the following six hypervariable regions (HVRs): (a) an HVR-H1 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1; (b) an HVR-H2 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2; (c) an HVR-H3 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3; (d) an HVR-L1 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 4; (e) an HVR-L2 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 5; and (f) an HVR-L3 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 6. In some embodiments, the binding domain comprises (a) a heavy chain variable (VH) domain comprising an amino acid sequence having at least 95% sequence identity to the amino acid sequence of SEQ ID NO: 184; (b) a light chain variable (VL) domain comprising an amino acid sequence having at least 95% sequence identity to the amino acid sequence of SEQ ID NO: 185; or (c) a VH domain as in (a) and a VL domain as in (b). In some embodiments, the VH domain comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 184. In some embodiments, the VL domain comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 185. In some

embodiments, the binding domain comprises (a) a heavy chain variable (VH) domain comprising an amino acid sequence having at least 95% sequence identity to the amino acid sequence of SEQ ID NO: 186; (b) a light chain variable (VL) domain comprising an amino acid sequence having at least 95% sequence identity to the amino acid sequence of SEQ ID NO: 187; or (c) a VH domain as in (a) and a VL domain as in (b). In some embodiments, the VH domain comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 186. In some embodiments, the VL domain comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 187.

In another aspect, the invention features an anti-CD3 antibody, wherein the anti-CD3 antibody binds to an epitope on CD3 comprising amino acid residue Glu6 of CD3. In certain aspects, the invention features an anti-CD3 antibody, wherein the epitope further comprises one or more additional amino acid residues selected from the group consisting of Gln1, Asp2, and Met7 of CD3. In a further aspect, the invention features an anti-CD3 antibody, wherein the epitope comprises amino acid residues Gln1, Asp2, and Glu6 of CD3. In certain aspects, the invention features an anti-CD3 antibody, wherein the epitope comprises amino acid residues Gln1, Asp2, Glu6, and Met7 of CD3. In another aspect, the invention features an anti-CD3 antibody, wherein the epitope does not comprise amino acid residue Glu5 of CD3. In a further aspect, the invention features an anti-CD3 antibody, wherein the epitope does not comprise amino acid residues Gly3 and Glu5 of CD3. In certain aspects, the invention features an anti-CD3 antibody, wherein the epitope consists of amino acid residues Gln1, Asp2, Glu6, and Met7 of CD3.

In related aspects, the invention features an anti-CD3 antibody that binds such an epitope and that is a multispecific antibody. In some embodiments, the multispecific antibody is a bispecific antibody. In some embodiments, the bispecific antibody comprises a second binding domain that binds to a second biological molecule, wherein the second biological molecule is a cell surface antigen. In some embodiments, the cell surface antigen is a tumor antigen. In some embodiments, the tumor antigen is selected from the group consisting of CD20; FcRH5 (Fc Receptor-like 5); HER2; LYPD1; Ly6G6D (lymphocyte antigen 6 complex, locus G61); Ly6-D, MEGT1); PMEL17 (silver homolog; SILV; D12S53E; PMEL17; (SI); (SIL); ME20; gp100); Ly6E (lymphocyte antigen 6 complex, locus E; Ly67, RIG-E, SCA-2, TSA-1); CD19; CD33; CD22 (B-cell receptor CD22-B isoform); CD79a (CD79A, CD79a, immunoglobulin-associated alpha; BMPR1B (bone morphogenetic protein receptor-type IB); CD79b (CD79B, CD79β, 1 Gb (immunoglobulin-associated beta), B29); EDAR (Ectodysplasin A Receptor); GFRA1 (GDNF-Ra1); MRP4 (Multidrug Resistance Protein 4); RET; STEAP1 (six transmembrane epithelial antigen of prostate); TENB2 (putative transmembrane proteoglycan); E16 (LAT1, SLC7A5); 0772P (CA125, MUC16); MPF (MPF, MSLN, SMR, megakaryocyte potentiating factor, mesothelin); Napi2b (NAPI-2B, NPTIIb, SLC34A2, solute carrier family 34 (sodium phosphate), member 2, type II sodium-dependent phosphate transporter 3b); Sema 5b; PSCA hlg (2700050C12Rik, C530008O16Rik, RIKEN cDNA 2700050C12, RIKEN cDNA 2700050C12 gene); ETBR (Endothelin type B receptor); MSG783 (RNF124, hypothetical protein FLJ20315); STEAP2; TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 4); CRIPTO (CR, CR1, CRGF, CRIPTO, TDGF1, teratocarcinoma-derived growth factor); CD21 (CR2 (Complement receptor 2) or C3DR (C3d/Epstein Barr virus receptor) or Hs.73792); FcRH2 (IFGP4, IRTA4, SPAP1A (SH2 domain containing phosphatase anchor protein 1a), SPAP1B, SPAP1C); NCA; MDP; IL20Rα; Brevican; EphB2R;

ASLG659; PSCA; GEDA; BAFF-R (B cell-activating factor receptor, BLyS receptor 3, BR3); CXCR5 (Burkitt's lymphoma receptor 1; HLA-DOB (Beta subunit of MHC class II molecule); P2X5 (Purinergic receptor P2X ligand-gated ion channel 5; CD72 (B-cell differentiation antigen CD72, Lyb-2); LY64 (Lymphocyte antigen 64 (RP105), type I membrane protein of the leucine rich repeat (LRR) family); FcRH1 (Fc receptor-like protein 1); IRTA2 (Immunoglobulin superfamily receptor translocation associated 2); TMEFF1; TMEM46 (shisa homolog 2 (Xenopus laevis); SHISA2); LGR5 (leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5; GPR49, GPR67); LY6K (lymphocyte antigen 6 complex, locus K; LY6K; HSJ001348; FLJ35226); GPR19 (G protein-coupled receptor 19; Mm 4787); GPR54 (KISS1 receptor; KISS1R; GPR54; HOT7T175; AXOR12); ASPHD1 (aspartate beta-hydroxylase domain containing 1; LOC253982); Tyrosinase (TYR; OCAIA; OCA1A; tyrosinase; SHEP3); TMEM118 (ring finger protein, transmembrane 2; RNFT2; FLJ14627); GPR172A (G protein-coupled receptor 172A; GPCR41; FLJ11856; D15Ertd747e); GPC3 (Glypican 3); CLL1 (C-Type Lectin-like molecule 1); B7-H4 (B7x; B7S1); RNF43 (Ring finger protein 43); CD70; CXORF61 (Chromosome X open reading frame 61); HAVCR1; Epiregulin; Amphiregulin; EGFR ; EGFR-L858R; EGFR-L861Q; EGFR-G719A; EGFR-G719S; EGFR-G719C; EGFR-T790M; EGFR-S768I; adipophilin; AIM-2; ALDH1A1; alpha-actinin-4; alpha-foetoprotein; ARTC1; B-RAF; BAGE-1; BCLX (L); BCR-ABL fusion protein (b3a2); beta-catenin; BING-4; CALCA; CASP-5; CASP-8; CD45; Cdc27; CDK4; CDKN2A; CEA; CLPP; COA-1; CPSF; Cw6; cyclin D1; Cyclin-A1; dek-can fusion protein; DKK1; DR1; DR13; EFTUD2; Elongation factor 2; ENAH (hMena); EpCAM; EphA3; ETV6-AML1 fusion protein; EZH2; FLT3-ITD; FN1; G250; MN; CAIX; GAGE-1;2;8; GAGE-3;4;5;6;7; glypican-3; GnTVf; gp100 / Pmel17; GPNMB; HERV-K-MEL; hsp70-2; IDO1; IGF2B3; IL13Ralpha2; Intestinal carboxyl esterase; K-ras; Kallikrein 4; KIF20A; KK-LC-1; KM-HN-1; LAGE-1; LDLR-fucosyltransferaseASfusion protein; Lengsin; M-CSF; MAGE-A1; MAGE-A10; MAGE-A12; MAGE-A2; MAGE-A3; MAGE-A4; MAGE-A6; MAGE-A9; MAGE-C1; MAGE-C2; mammaglobin-A; MART2; MCSP; mdm-2; ME1; Melan-A / MART-1; Meloe; MMP-2; MMP-7; MUC1; MUC5AC; mucin; MUM-1f; MUM-2; MUM-3; Myosin class I; N-ras; NA88-A; neo-PAP; NFYC; NY-BR-1; NY-ESO-1/LAGE-2; OA1; OGT; OS-9; p53; PAP; PAX5; PBF; pml-RARalpha fusion protein; PRAME; PRDX5; PSMA; PTPRK; RAB38 / NY-MEL-1; RAGE-1; RBAF600; RGS5; RhoC; RNF43; RU2AS; SAGE; secernin 1; SIRT2; SNRPD1; SOX10; Sp17; SSX-2; SSX-4; STEAP1; survivin; SYT-SSX1 or -SSX2 fusion protein; TAG-1; TAG-2; Telomerase; TGF-betaRII; TRAG-3; Triosephosphate isomerase; TRP-1 / gp75; TRP-2; TRP2-INT2; tyrosinase; VEGF; WT1; XAGE-1b/GAGED2a; and SLC53SLC35D3. In some embodiments, the tumor antigen is selected from the group consisting of CD20, FcRH5, HER2, LYPD1, LY6G6D, PMEL17, LY6E, CD19, CD33, CD22, CD79A, CD79B, EDAR, GFRA1, MRP4, RET, Steap1, and TenB2. In preferred embodiments, the tumor antigen is selected from the group consisting of CD20, HER2, FcRH5, and LYPD1.

In some embodiments, the binding domain of any one of the preceding anti-CD3 antibodies binds to a human CD3 polypeptide or a cynomolgus monkey (cyno) CD3 polypeptide. In some embodiments, the human CD3 polypeptide or the cyno CD3 polypeptide is a human CD3ε polypeptide or a cyno CD3ε polypeptide, respectively. In some embodiments, the human CD3 polypeptide or the cyno CD3 polypeptide is a human CD3γ polypeptide or a cyno CD3γ polypeptide, respectively.

In some embodiments, any one of the preceding anti-CD3 antibodies binds the human CD3ε polypeptide with a Kd of 250 nM or lower. In some embodiments, the anti-CD3 antibody binds the human CD3ε polypeptide with a Kd of 100 nM or lower. In some embodiments, the anti-CD3 antibody binds the human CD3ε polypeptide with a Kd of 15 nM or lower. In some embodiments, the anti-CD3 antibody binds the human CD3ε polypeptide with a Kd of 10 nM or lower. In some embodiments, the anti-CD3 antibody binds the human CD3ε polypeptide with a Kd of 5 nM or lower.

In some embodiments, any one of the preceding anti-CD3 antibodies may comprise an aglycosylation site mutation. In some embodiments, the aglycosylation site mutation is a substitution mutation. In some embodiments, the substitution mutation is at amino acid residue N297, L234, L235, and/or D265 (EU numbering). In some embodiments, the substitution mutation is selected from the group consisting of N297G, N297A, L234A, L235A, and D265A. In some embodiments, the substitution mutation is an N297G mutation. In some embodiments, the aglycosylation site mutation reduces effector function of the anti-CD3 antibody. In some embodiments, the aglycosylation site mutation reduces effector function of the anti-CD3 antibody. In some embodiments, an anti-CD3 antibody comprises a substitution mutation in the Fc region that reduces effector function.

In some embodiments, any one of the preceding anti-CD3 antibodies can be monoclonal, human, humanized, or chimeric. In some embodiments, any one of the preceding anti-CD3 antibodies can be an antibody fragment that binds CD3. In some embodiments, the antibody fragment is selected from the group consisting of Fab, Fab'-SH, Fv, scFv, and $(Fab')_2$ fragments. In other embodiments, the anti-CD3 antibody is a full-length antibody. In some embodiments, the anti-CD3 antibody is an IgG antibody (e.g., an IgG1, IgG2, or IgG3 antibody). In some embodiments, the anti-CD3 antibody is a monospecific antibody. In some embodiments, the anti-CD3 antibody is a Bispecific T-Cell Engager (BiTE®) antibody).

In some embodiments, the anti-CD3 antibody is a multispecific antibody. In some embodiments, the multispecific antibody is a bispecific antibody. In some embodiments, the bispecific antibody comprises a second binding domain that binds to a second biological molecule, wherein the second biological molecule is a cell surface antigen. In some embodiments, the cell surface antigen is a tumor antigen. In some embodiments, the tumor antigen is selected from the group consisting of CD20; FcRH5 (Fc Receptor-like 5); HER2; LYPD1; Ly6G6D (lymphocyte antigen 6 complex, locus G61); Ly6-D, MEGT1); PMEL17 (silver homolog; SILV; D12S53E; PMEL17; (SI); (SIL); ME20; gp100); Ly6E (lymphocyte antigen 6 complex, locus E; Ly67, RIG-E, SCA-2, TSA-1); CD19; CD33; CD22 (B-cell receptor CD22-B isoform); CD79a (CD79A, CD79a, immunoglobulin-associated alpha; BMPR1B (bone morphogenetic protein receptor-type IB); CD79b (CD79B, CD79β, 1 Gb (immunoglobulin-associated beta), B29); EDAR (Ectodysplasin A Receptor); GFRA1 (GDNF-Ra1); MRP4 (Multidrug Resistance Protein 4); RET; STEAP1 (six transmembrane epithelial antigen of prostate); TENB2 (putative transmembrane proteoglycan); E16 (LAT1, SLC7A5); 0772P (CA125, MUC16); MPF (MPF, MSLN, SMR, megakaryocyte potentiating factor, mesothelin); Napi2b (NAPI-2B, NPTIIb, SLC34A2, solute carrier family 34 (sodium phosphate), member 2, type II sodium-dependent phosphate transporter 3b); Sema 5b; PSCA hlg (2700050C12Rik, C530008O16Rik, RIKEN cDNA 2700050C12, RIKEN

cDNA 2700050C12 gene); ETBR (Endothelin type B receptor); MSG783 (RNF124, hypothetical protein FLJ20315); STEAP2; TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 4); CRIPTO (CR, CR1, CRGF, CRIPTO, TDGF1, teratocarcinoma-derived growth factor); CD21 (CR2 (Complement receptor 2) or C3DR (C3d/Epstein Barr virus receptor) or Hs.73792); FcRH2 (IFGP4, IRTA4, SPAP1A (SH2 domain containing phosphatase anchor protein 1a), SPAP1B, SPAP1C); NCA; MDP; IL20Rα; Brevican; EphB2R; ASLG659; PSCA; GEDA; BAFF-R (B cell-activating factor receptor, BLyS receptor 3, BR3); CXCR5 (Burkitt's lymphoma receptor 1; HLA-DOB (Beta subunit of MHC class II molecule); P2X5 (Purinergic receptor P2X ligand-gated ion channel 5; CD72 (B-cell differentiation antigen CD72, Lyb-2); LY64 (Lymphocyte antigen 64 (RP105), type I membrane protein of the leucine rich repeat (LRR) family); FcRH1 (Fc receptor-like protein 1); IRTA2 (Immunoglobulin superfamily receptor translocation associated 2); TMEFF1; TMEM46 (shisa homolog 2 (Xenopus laevis); SHISA2); LGR5 (leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5; GPR49, GPR67); LY6K (lymphocyte antigen 6 complex, locus K; LY6K; HSJ001348; FLJ35226); GPR19 (G protein-coupled receptor 19; Mm 4787); GPR54 (KISS1 receptor; KISS1R; GPR54; HOT7T175; AXOR12); ASPHD1 (aspartate beta-hydroxylase domain containing 1; LOC253982); Tyrosinase (TYR; OCAIA; OCA1A; tyrosinase; SHEP3); TMEM118 (ring finger protein, transmembrane 2; RNFT2; FLJ14627); GPR172A (G protein-coupled receptor 172A; GPCR41; FLJ11856; D15Ertd747e); GPC3 (Glypican 3); CLL1 (C-Type Lectin-like molecule 1); B7-H4 (B7x; B7S1); RNF43 (Ring finger protein 43); CD70; CXORF61 (Chromosome X open reading frame 61); HAVCR1; Epiregulin; Amphiregulin; EGFR ; EGFR-L858R; EGFR-L861Q; EGFR-G719A; EGFR-G719S; EGFR-G719C; EGFR-T790M; EGFR-S768I; adipophilin; AIM-2; ALDH1A1; alpha-actinin-4; alpha-foetoprotein; ARTC1; B-RAF; BAGE-1; BCLX (L); BCR-ABL fusion protein (b3a2); beta-catenin; BING-4; CALCA; CASP-5; CASP-8; CD45; Cdc27; CDK4; CDKN2A; CEA; CLPP; COA-1; CPSF; Cw6; cyclin D1; Cyclin-A1; dek-can fusion protein; DKK1; DR1; DR13; EFTUD2; Elongation factor 2; ENAH (hMena); EpCAM; EphA3; ETV6-AML1 fusion protein; EZH2; FLT3-ITD; FN1; G250; MN; CAIX; GAGE-1;2;8; GAGE-3;4;5;6;7; glypican-3; GnTVf; gp100 / Pmel17; GPNMB; HERV-K-MEL; hsp70-2; IDO1; IGF2B3; IL13Ralpha2; Intestinal carboxyl esterase; K-ras; Kallikrein 4; KIF20A; KK-LC-1; KM-HN-1; LAGE-1; LDLR-fucosyltransferaseASfusion protein; Lengsin; M-CSF; MAGE-A1; MAGE-A10; MAGE-A12; MAGE-A2; MAGE-A3; MAGE-A4; MAGE-A6; MAGE-A9; MAGE-C1; MAGE-C2; mammaglobin-A; MART2; MCSP; mdm-2; ME1; Melan-A / MART-1; Meloe; MMP-2; MMP-7; MUC1; MUC5AC; mucin; MUM-1f; MUM-2; MUM-3; Myosin class I; N-ras; NA88-A; neo-PAP; NFYC; NY-BR-1; NY-ESO-1/LAGE-2; OA1; OGT; OS-9; p53; PAP; PAX5; PBF; pml-RARalpha fusion protein; PRAME; PRDX5; PSMA; PTPRK; RAB38 / NY-MEL-1; RAGE-1; RBAF600; RGS5; RhoC; RNF43; RU2AS; SAGE; secernin 1; SIRT2; SNRPD1; SOX10; Sp17; SSX-2; SSX-4; STEAP1; survivin; SYT-SSX1 or -SSX2 fusion protein; TAG-1; TAG-2; Telomerase; TGF-betaRII; TRAG-3; Triosephosphate isomerase; TRP-1 / gp75; TRP-2; TRP2-INT2; tyrosinase; VEGF; WT1; XAGE-1b/GAGED2a; and SLC35D3. In some embodiments, the tumor antigen is selected from the group consisting of CD20, FcRH5, HER2, LYPD1, LY6G6D, PMEL17, LY6E, CD19, CD33, CD22, CD79A, CD79B, EDAR, GFRA1, MRP4, RET, Steap1, and TenB2.

In some embodiments, the tumor antigen is HER2 and the second binding domain comprises the following six HVRs: (a) an HVR-H1 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 169; (b) an HVR-H2 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 170; (c) an HVR-H3 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 171; (d) an HVR-L1 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 172; (e) an HVR-L2 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 173; and (f) an HVR-L3 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 174. In some embodiments, the second binding domain comprises (a) a VH domain comprising an amino acid sequence having at least 95% sequence identity to the amino acid sequence of SEQ ID NO: 270; (b) a VL domain comprising an amino acid sequence having at least 95% sequence identity to the amino acid sequence of SEQ ID NO: 271; or (c) a VH domain as in (a) and a VL domain as in (b). In some embodiments, the VH domain comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 270. In some embodiments, the VL domain comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 271.

In some aspects, the invention features an anti-CD3 antibody, wherein the anti-CD3 antibody comprises a second binding domain comprising: (a) a VH domain comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 270 and (b) a VL domain comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 271.

In another aspect, the invention features an anti-CD3 antibody, wherein the anti-CD3 antibody comprises an anti-CD3 arm comprising a first binding domain comprising (a) a VH domain comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 184 and (b) a VL domain comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 185, and an anti-CD20 arm comprising a second binding domain comprising (a) a VH domain comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 266 and (b) a VL domain comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 267.

In another aspect, the invention features an anti-CD3 antibody, wherein the anti-CD3 antibody comprises an anti-CD3 arm comprising a first binding domain comprising (a) a VH domain comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 184 and (b) a VL domain comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 185, and an anti-CD20 arm comprising a second binding domain comprising (a) a VH domain comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 266 and (b) a VL domain comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 267, wherein the anti-CD3 antibody comprises an N297G substitution mutation.

In another aspect, the invention features an anti-CD3 antibody, wherein the anti-CD3 antibody comprises an anti-CD3 arm comprising a first binding domain comprising (a) a VH domain comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 184 and (b) a VL domain comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 185, and an anti-CD20 arm comprising a second binding domain comprising (a) a VH domain comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 266 and (b) a VL domain comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 267, wherein (a) the anti-CD3 arm comprises T366S, L368A, Y407V, and N297G substitution mutations and (b) the anti-CD20 arm comprises T366W and N297G substitution mutations.

In some embodiments, any one of the preceding anti-CD3 antibodies can comprise one or more heavy chain constant domains, wherein the one or more heavy chain constant domains are selected from a first CH1 ($CH1_1$) domain, a first CH2 ($CH2_1$) domain, a first CH3 ($CH3_1$) domain, a second CH1 ($CH1_2$) domain, second CH2 ($CH2_2$) domain, and a second CH3 ($CH3_2$) domain. In some embodiments, at least one of the one or more heavy chain constant domains is paired with another heavy chain constant domain. In

some embodiments, the $CH3_1$ and $CH3_2$ domains each comprise a protuberance or cavity, and wherein the protuberance or cavity in the $CH3_1$ domain is positionable in the cavity or protuberance, respectively, in the $CH3_2$ domain. In some embodiments, the $CH3_1$ and $CH3_2$ domains meet at an interface between said protuberance and cavity. In some embodiments, the $CH2_1$ and $CH2_2$ domains each comprise a protuberance or cavity, and wherein the protuberance or cavity in the $CH2_1$ domain is positionable in the cavity or protuberance, respectively, in the $CH2_2$ domain. In some embodiments, the $CH2_1$ and $CH2_2$ domains meet at an interface between said protuberance and cavity.

In some embodiments, the half-life of any one of the preceding anti-CD3 antibodies may be about 7 days.

In some embodiments, the invention features an immunoconjugate comprising any one of the preceding anti-CD3 antibodies conjugated to a cytotoxic agent. Also provided is a composition comprising any one of the preceding anti-CD3 antibodies. In some embodiments, the composition further comprises a pharmaceutically acceptable carrier, excipient, or diluent. In some embodiments, the composition is a pharmaceutical composition. In some embodiments, the composition further comprises a PD-1 axis binding antagonist or an additional therapeutic agent. In another aspect, the invention features an isolated nucleic acid that encodes any of the anti-CD3 antibodies disclosed herein, comprising a vector (e.g., an expression vector) for expressing the antibody.

In another aspect, the invention features host cells comprising the preceding nucleic acids and/or vectors. In some embodiments, the host cell is a mammalian cell (e.g., a Chinese hamster ovary (CHO) cell). In other embodiments, the host cell is a prokaryotic cell (e.g., an *E. coli* cell). A method of producing any one of the preceding anti-CD3 antibodies is also provided, the method comprising culturing the host cell that produces the anti-CD3 antibody and recovering the anti-CD3 antibody from the host cell or the culture medium.

In some aspects, any one of the preceding anti-CD3 antibodies can be for use as a medicament. In some embodiments, any one of the preceding anti-CD3 antibodies can be for use in treating or delaying progression of a cell proliferative disorder or an autoimmune disorder in a subject in need thereof. In some embodiments, any one of the preceding anti-CD3 antibodies can be for use in enhancing immune function in a subject having a cell proliferative disorder or an autoimmune disorder.

In some aspects, the invention features the use of any one of the preceding anti-CD3 antibodies in the manufacture of a medicament for treating or delaying progression of a cell proliferative disorder or an autoimmune disorder. In some aspects, the invention features the use of any one of the preceding anti-CD3 antibodies in the manufacture of a medicament for enhancing immune function in a subject having a cell proliferative disorder or an autoimmune disorder.

A further aspect of the invention is a method of treating or delaying the progression of a cell proliferative disorder or an autoimmune disorder in a subject in need thereof, the method comprising administering to the subject an effective amount any one of the preceding anti-CD3 antibodies. In another aspect, the invention features a method of enhancing immune function in a subject having a cell proliferative disorder or an autoimmune disorder, the method comprising administering to the subject any one of the

preceding anti-CD3 antibodies. In some embodiments, the anti-CD3 antibody binds to (a) a CD3 molecule located on an immune effector cell and (b) a second biological molecule located on a target cell other than the immune effector cell. In some embodiments, the anti-CD3 antibody activates the immune effector cell following binding to (a) and (b). In some embodiments, the activated immune effector cell is capable of exerting a cytotoxic effect and/or an apoptotic effect on the target cell. In some embodiments, the anti-CD3 antibody is administered to the subject in a dosage of about 0.01 mg/kg to about 10 mg/kg. In some embodiments, the anti-CD3 antibody is administered to the subject in a dosage of about 0.1 mg/kg to about 10 mg/kg. In some embodiments, the anti-CD3 antibody is administered to the subject in a dosage of about 1 mg/kg. In some embodiments, the anti-CD3 antibody is administered subcutaneously, intravenously, intramuscularly, topically, orally, transdermally, intraperitoneally, intraorbitally, by implantation, by inhalation, intrathecally, intraventricularly, or intranasally. In some embodiments, the anti-CD3 antibody is administered subcutaneously. In some embodiments, the anti-CD3 antibody is administered intravenously.

In some embodiments, the anti-CD3 antibody comprises an anti-HER2 arm comprising a N297G substitution mutation. In some embodiments, the anti-CD3 antibody comprises an anti-CD3 arm comprising T366S, L368A, Y407V, and/or N297G substitution mutation(s) and an anti-HER2 arm comprising N297G, N297A, L234A, L235A, and/or D265A substitution mutation(s). In some embodiments, the anti-CD3 antibody comprises an anti-CD3 arm comprising a N297G substitution mutation. In some embodiments, the anti-CD3 antibody comprises an anti-HER2 arm comprising T366S, L368A, Y407V, and/or N297G substitution mutation(s) and an anti-CD3 arm comprising N297G, N297A, L234A, L235A, and/or D265A substitution mutation(s).

In some embodiments, the method further comprises administering to the subject a glucocorticoid. In some embodiments, the glucocorticoid is selected from the group consisting of dexamethasone, hydrocortisone, cortisone, prednisolone, prednisone, methylprednisone, triamcinolone, paramethasone, betamethasone, fludrocortisone, and pharmaceutically acceptable esters, salts, and complexes thereof. In some embodiments, the glucocorticoid is dexamethasone. In some embodiments, the glucocorticoid is a pharmaceutically acceptable ester, salt, or complex of dexamethasone.

In some embodiments, the method further comprises administering to the subject rituximab.

In some embodiments, the method further comprises administering to the subject obinutuzumab.

In some embodiments, the method further comprises administering to the subject an antibody-drug conjugate (ADC).

In any of the preceding uses or methods, the cell proliferative disorder can be cancer. In some embodiments, the cancer is selected from the group consisting of breast cancer, colorectal cancer, non-small cell lung cancer, non-Hodgkin's lymphoma (NHL), B cell lymphoma, B cell leukemia, multiple myeloma, renal cancer, prostate cancer, liver cancer, head and neck cancer, melanoma, ovarian cancer, mesothelioma, glioblastoma, germinal-center B-cell-like (GCB) DLBCL, activated B-cell-like (ABC) DLBCL, follicular lymphoma (FL), mantle cell lymphoma (MCL), acute myeloid leukemia (AML), chronic lymphoid leukemia (CLL), marginal zone lymphoma (MZL), small lymphocytic leukemia (SLL), lymphoplasmacytic lymphoma (LL), Waldenstrom macroglobulinemia (WM), central nervous system lymphoma (CNSL), Burkitt's lymphoma

(BL), B-cell prolymphocytic leukemia, Splenic marginal zone lymphoma, Hairy cell leukemia, Splenic lymphoma/leukemia, unclassifiable, Splenic diffuse red pulp small B-cell lymphoma, Hairy cell leukemia variant, Waldenström macroglobulinemia, Heavy chain diseases, α Heavy chain disease, γ Heavy chain disease, μ Heavy chain disease, Plasma cell myeloma, Solitary plasmacytoma of bone, Extraosseous plasmacytoma, Extranodal marginal zone lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma), Nodal marginal zone lymphoma, Pediatric nodal marginal zone lymphoma, Pediatric follicular lymphoma, Primary cutaneous follicle centre lymphoma, T-cell/histiocyte rich large B-cell lymphoma, Primary DLBCL of the CNS, Primary cutaneous DLBCL, leg type, EBV-positive DLBCL of the elderly, DLBCL associated with chronic inflammation, Lymphomatoid granulomatosis, Primary mediastinal (thymic) large B-cell lymphoma, Intravascular large B-cell lymphoma, ALK-positive large B-cell lymphoma, Plasmablastic lymphoma, Large B-cell lymphoma arising in HHV8-associated multicentric Castleman disease, Primary effusion lymphoma: B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and Burkitt lymphoma, and B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and classical Hodgkin lymphoma. In some embodiments, the preferred cancer is germinal-center B-cell-like (GCB) DLBCL, activated B-cell-like (ABC) DLBCL, follicular lymphoma (FL), mantle cell lymphoma (MCL), acute myeloid leukemia (AML), chronic lymphoid leukemia (CLL), marginal zone lymphoma (MZL), small lymphocytic leukemia (SLL), lymphoplasmacytic lymphoma (LL), Waldenstrom macroglobulinemia (WM), central nervous system lymphoma (CNSL), or Burkitt's lymphoma (BL)

In any of the preceding uses or methods, the autoimmune disorder can be selected from the group consisting of rheumatoid arthritis, juvenile rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus (SLE), Wegener's disease, inflammatory bowel disease, idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP), thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP), autoimmune thrombocytopenia, multiple sclerosis, psoriasis, IgA nephropathy, IgM polyneuropathies, myasthenia gravis, vasculitis, diabetes mellitus, Reynaud's syndrome, Sjorgen's syndrome, glomerulonephritis, Neuromyelitis Optica (NMO) and IgG neuropathy.

In another aspect, the invention features a kit comprising: (a) a composition comprising any one of the preceding anti-CD3 antibodies and (b) a package insert comprising instructions for administering the composition to a subject to treat or delay progression of a cell proliferative disorder.

In any of the preceding uses or methods, the subject can be a human.

Brief Description of the Drawings

FIGURE 1 shows the amino acid sequence of single-chain human CD3εγ with a 26-mer linker sequence used in CD3 epitope mapping experiments (SEQ ID NO: 282).

FIGURE 2A is a table summarizing the characterization of select hybridoma clones. The table summarizes the results of ELISA CD3 binding experiments using human and cyno $CD3\varepsilon^{1-27}$-Fc; FACS binding experiments using human Jurkat T cells, human PBMCs, and cyno PBMCs; T cell activation experiments using FACS analysis; and isotype determination experiments.

FIGURE 2B is a table summarizing the binding affinities (Kd values) of select hybridoma clones for a commercial human CD3εγ antigen.

FIGURE 3A is a table summarizing the characterization of select hybridoma. The table summarizes the results of ELISA CD3 binding experiments using human and cyno $CD3\varepsilon^{1-27}$-Fc; FACS binding experiments using human Jurkat T cells, human PBMCs, and cyno PBMCs; T cell activation experiments using FACS analysis; and isotype determination experiments.

FIGURES 3B and 3C are tables summarizing the binding affinities (Kd values) of select hybridoma clones.

FIGURE 4A shows the amino acid sequences of the light chain variable domains of the anti-CD3 antibodies. HVR sequences are delimited by the denoted boxes for each of the antibodies.

FIGURE 4B shows the amino acid sequences of the light chain variable domains of the anti-CD3 antibodies.

FIGURE 4C shows the amino acid sequences of the heavy chain variable domains of the anti-CD3 antibodies.

FIGURE 5A shows the amino acid sequences of the light chain variable domains of the anti-CD3 antibodies.

FIGURE 5B shows the amino acid sequences of the heavy chain variable domains of the anti-CD3 antibodies.

FIGURE 6A shows the amino acid sequences of the light chain variable domains of anti-CD3 antibody 21A9, and Rab17.

FIGURE 6B shows the amino acid sequences of the heavy chain variable domain of anti-CD3 antibody 21A9,and Rab17.

FIGURE 7 is a sequence alignment of light chain variable domain (top) and heavy chain variable domain (bottom) amino acid sequences of anti-CD3 antibodies showing the consensus sequence, 40G5c, derived from the related clonal antibodies.

FIGURE 8A is a sequence alignment of light chain variable domain (top) and heavy chain variable domain (bottom) amino acid sequences of anti-CD3 antibody 13A3 and a humanized variant thereof (hu13A3).

FIGURE 8B is a sequence alignment of light chain variable domain (top) and heavy chain variable domain (bottom) amino acid sequences of anti-CD3 antibody 30A1 and a humanized variant thereof (hu30A1).

FIGURE 8C is a sequence alignment of light chain variable domain (top) and heavy chain variable domain (bottom) amino acid sequences of anti-CD3 antibody 41D9a and a humanized variant thereof (hu41D9a).

FIGURE 8D is a sequence alignment of light chain variable domain (top) and heavy chain variable domain (bottom) amino acid sequences of anti-CD3 antibody SP34 and a humanized variant thereof (huSP34).

FIGURE 8E is a sequence alignment of light chain variable domain (top) and heavy chain variable domain (bottom) amino acid sequences of anti-CD3 antibody 38E4 and a humanized variant thereof (hu38E4).

FIGURE 8F is a sequence alignment of light chain variable domain (top) and heavy chain variable domain (bottom) amino acid sequences of anti-CD3 antibody 40G5 and a humanized variant thereof (hu40G5).

FIGURE 9A is a table summarizing selected humanized variants of anti-CD3 antibody 13A3 and their binding affinities, assayed using commericial CD3ε (Creative Biomart, Shirley, NY; Catalog Number CD3E-2194H).

FIGURE 9B is a table summarizing selected humanized variants of anti-CD3 antibody 30A1 and their binding affinities, assayed using commericial CD3ε (Creative Biomart, Shirley, NY; Catalog Number CD3E-2194H).

FIGURE 9C is a table summarizing selected humanized variants of anti-CD3 antibody 41D9a and their binding affinities, assayed using commericial CD3ε (Creative Biomart, Shirley, NY; Catalog Number CD3E-2194H).

FIGURE 9D is a table summarizing selected humanized variants of anti-CD3 antibody SP34 and their binding affinities, assayed using commericial CD3ε (Creative Biomart, Shirley, NY; Catalog Number CD3E-2194H).

FIGURE 9E is a table summarizing selected humanized variants of anti-CD3 antibody 38E4 and their binding affinities, assayed using commericial CD3ε (Creative Biomart, Shirley, NY; Catalog Number CD3E-2194H).

FIGURE 9F is a table summarizing selected humanized variants of anti-CD3 antibody 40G5c and their binding affinities, assayed using commericial CD3ε (Creative Biomart, Shirley, NY; Catalog Number CD3E-2194H).

FIGURE 10 is a table summarizing the binding affinity of humanized anti-CD3 antibodies for various CD3ε antigens.

FIGURE 11 is a table summarizing the binding affinity of humanized anti-CD3 antibodies 38E4v1 through 38E4v9 and 40G5c, as measured by Biacore with human CD3$\varepsilon\gamma$ on chip and anti-CD3 antibodies in flow through.

FIGURE 12A is a table summarizing the relative binding affinities for single alanine, serine, threonine, or glutamate mutants of the humanized anti-CD3 antibody 38E4v1 having a single mutation in either HVR-L3 or HVR-H3, as compared to 38E4v1 using single-cycle or conventional multi-cycle kinetic Biacore analysis.

FIGURE 12B shows the HVR-L3 (top) and HVR-H3 (bottom) amino acid sequences of the humanized anti-CD3 antibody 38E4v1.

FIGURE 13A is a series of graphs showing the relative binding of the denoted anti-CD3 antibody to alanine variants of CD3$\varepsilon^{1\text{-}27}$-Fc.

FIGURE 13B is a graph showing the relative fraction of CD3εγ alanine scanning phagemid mutants bound to anti-CD3 antibodies 38E4.v1, 40G5c, and SP34.v52, as compared to wild-type CD3εγ phage binding.

FIGURE 13C is a series of graphs showing the relative binding of anti-CD3 antibodies 38E4.v1, 40G5c, and SP34.v52 to selected CD3εγ alanine scanning phagemid mutants as a function of phage concentration.

FIGURE 13D is a set of tables showing the relative binding affinities of anti-CD3 antibodies SP34.v52 and 38E4v1 to selected CD3εγ alanine scanning mutants, as assessed by Biacore. NB = no detectable binding.

FIGURE 14A shows the sequence of the 16-mer CD3ε polypeptide used in co-crystallization trials with 38E4.v1 Fab.

FIGURES 14B-14F is a series of renderings of the crystal structure showing different views of the hu38E4.v1 Fab/CD3ε peptide complex.

FIGURE 14G is a sequence alignment of light chain variable domain (top) and heavy chain variable domain (bottom) amino acid sequences of anti-CD3 antibodies hu40G5c and hu38E4.v1, with residues of each antibody that are important for binding CD3 (contact residues) circled in the alignment. The circled residues were found to be within 5 Å of the CD3 peptide, as determined by crystallographic analysis. Δ denotes vernier positions (for reference, see, e.g., Foote and Winter. *JMB.* 224: 487, 1992); * denotes FW-HVR interactions (for reference, see, e.g., Padlan et al. *Mol. Immunol*. 31: 169, 1994); and ● denotes VH-VL interactions (for reference, see, e.g., Padlan et al. *Mol. Immunol*. 31: 169, 1994).

FIGURE 14H is a rendering of the crystal structure of CD3ε polypeptide bound by hu38E4.v1 Fab. All antigen contact residues are depicted in yellow. All contact residues are identical between hu38E4.v1 and hu40G5, except G96 (depicted in orange) is S96 in hu40G5.

FIGURES 14I and 14J are ribbon diagram renderings of the crystal structures of hu38E4.v1 Fab and SP34v52 Fab, respectively, in the same orientation, overlaid with VL region with a RMS = 2.24.

FIGURE 14K is a space-filling model rendering of the hu38E4.v1 Fab complexed with the CD3ε N-terminal peptide bound in the cleft between the heavy (cyan) and light (purple) chains.

FIGURE 14L is a space-filling model rendering of the SP34v52 Fab with the CD3ε N-terminal peptide superimposed in the same orientation as in the CD3ε/hu38E4.v1 Fab complex depicted in Figure 14K. Residues R50 and R52 (in orange) of HVR-H2 of the SP34v52 Fab are important for binding CD3. Clear clashes of the CD3 peptide with SP34v52 Fab are indicated by arrows.

FIGURE 14M is a crystal structure rendering of the hu38E4.v1 complexed with the N-terminal peptide of CD3εγ and illustrates the key intermolecular interactions involved in the first pyroglutamine residue and the sixth residue (E6) in CD3εγ. The potential hydrogen bonds are shown as dashed lines.

FIGURE 14N is a space-filling model rendering of the hu38E4.v1 Fab complexed with the CD3εγ N-terminal peptide bound in the cleft between the heavy (cyan) and light (purple) chains. The fifth residue (E5)

as illustrated, points away from the interactive site that contains the sixth residue (E6) of CD3εγ N-terminal peptide and Fab complex.

FIGURE 15 depicts a schematic generalization of TDB antibody formation. The particular TDB depicted is shown as a full-length TDB in knob-in-hole (KIH) format, which can possess an aglycosylation mutation, if produced by a eukaryotic cell (e.g., a CHO cell). In an alternative format, the knob may be present on the anti-CD3 arm, and the hole may be present on the anti-tumor antigen arm. This format may also possess an aglycosylation mutation, if produced by a eukaryotic cell (e.g., a CHO cell).

FIGURE 16 are graphs showing the results of FACS *in vitro* binding assays of various CD3/CD20 TDBs having different combinations of UCHT1 series anti-CD3 arms and 2H7 series anti-CD20 arms. Bjab B tumor cell line binding (CD20 binding), left. Jurkat cell binding (CD3 binding), right.

FIGURE 17 is a set of tables summarizing the monovalent (top) and (bivalent) binding affinities as Kd values for various CD3/CD20 TDBs having different combinations of UCHT1 series anti-CD3 arms and 2H7 series anti-CD20 arms.

FIGURE 18 is a graph showing the results of *in vitro* Jurkat cell binding (CD3 binding) FACS assays of various CD3/CD20 TDBs having different combinations of anti-CD3 arms with the anti-CD20 arm of 2H7v16.

FIGURE 19 is a graph showing the results of *in vitro* Jurkat cell binding (CD3 binding) FACS assays of various CD3/CD20 TDBs having different combinations of anti-CD3 arms with the anti-CD20 arm of 2H7v16.

FIGURE 20 is a graph showing the results of *in vitro* Bjab cell binding (CD20 binding) FACS assays of various CD3/CD20 TDBs having different combinations of anti-CD3 arms with the anti-CD20 arm of 2H7v16.

FIGURES 21A and 21B are graphs showing the results of *in vitro* Jurkat cell binding (CD3 binding) FACS assays of various CD3/CD20 TDBs having different combinations of anti-CD3 arms with the anti-CD20 arm of 2H7v16.

FIGURE 21C is a table summarizing the EC50 (μg/ml) for each CD3/CD20 TDB tested in Figures 21A and 21B.

FIGURES 22A and 22B are graphs showing the results of *in vitro* Bjab cell binding (CD20 binding) FACS assays of various CD3/CD20 TDBs having different combinations of anti-CD3 arms with the anti-CD20 arm of 2H7v16.

FIGURE 23 is a graph showing the results of *in vitro* Jurkat cell binding (CD3 binding) FACS assays of various CD3/CD20 TDBs having different combinations of anti-CD3 arms with the anti-CD20 arm of 2H7v16.

FIGURE 24 is a table summarizing the binding affinities for various CD3/CD20 TDBs and Fabs, as measured by Biacore analysis with human CD3εγ on chip and CD3/CD20 TDB or Fab in flow through.

FIGURE 25A is a graph showing the percentage of T cell activation, as measured by CD69 and CD25 surface expression, after 24 hours of incubation of specified CD3/CD20 TDB (2H7 series) with 20,000 Bjab cells and 5x purified hu CD8+ T cells.

FIGURE 25B is a graph showing the percentage of Bjab killing relative to a non-TDB treated control, after 24 hours of incubation of specified CD3/CD20 TDB (2H7 series) with 20,000 Bjab cells and 5x purified huCD8+ T cells, as measured by FACS analysis.

FIGURE 26A is a graph showing the percentage of T cell activation, as measured by CD69 and CD25 surface expression, after 24 hours of incubation of specified CD3/CD20 TDB (2H7 series) with 200,000 human PBMCs per well.

FIGURE 26B is a graph showing the percentage of endogenous (endo) B cell killing relative to a non-TDB treated control, after 24 hours of incubation of specified CD3/CD20 TDB (2H7 series) with 200,000 human PBMCs per well, as measured by FACS analysis.

FIGURE 27A is a graph showing the percentage of T cell activation, as measured by CD69 and CD25 surface expression, after 24 hours of incubation of specified CD3/CD20 TDB (UCHT1 series) with 20,000 Bjab cells and 5x purified hu CD8+ T cells.

FIGURE 27B is a graph showing the percentage of Bjab killing relative to a non-TDB treated control, after 24 hours of incubation of specified CD3/CD20 TDB (UCHT1 series) with 20,000 Bjab cells and 5x purified huCD8+ T cells, as measured by FACS analysis.

FIGURE 28A is a graph showing the percentage of T cell activation, as measured by CD69 and CD25 surface expression, after 24 hours of incubation of specified CD3/CD20 TDB (UCHT1 series) with 200,000 human PBMCs per well.

FIGURE 28B is a graph showing the percentage of endo B cell killing relative to a non-TDB treated control, after 24 hours of incubation of specified CD3/CD20 TDB (UCHT1 series) with 200,000 human PBMCs per well, as measured by FACS analysis.

FIGURE 29A is a graph showing the percentage of endo B cell killing relative to a non-TDB treated control, after 24 hours of incubation of various CD3/CD20 TDBs having different combinations of anti-CD3 arms with the anti-CD20 arm of 2H7v16, with 200,000 human PBMCs (isolated from Donor #3) per well, as measured by FACS analysis.

FIGURE 29B is a graph showing the percentage of T cell activation, as measured by CD69 and CD25 surface expression, after 24 hours of incubation of various CD3/CD20 TDBs having different combinations of anti-CD3 arms with the anti-CD20 arm of 2H7v16, with 200,000 human PBMCs (isolated from Donor #3) per well, as measured by FACS analysis.

FIGURE 30A is a graph showing the percentage of endo B cell killing relative to a non-TDB treated control, after 24 hours of incubation of various CD3/CD20 TDBs having different combinations of anti-CD3 arms with the anti-CD20 arm of 2H7v16, with 200,000 human PBMCs (isolated from Donor #4) per well, as measured by FACS analysis.

FIGURE 30B is a graph showing the percentage of T cell activation, as measured by CD69 and CD25 surface expression, after 24 hours of incubation of various CD3/CD20 TDBs having different

combinations of anti-CD3 arms with the anti-CD20 arm of 2H7v16, with 200,000 human PBMCs (isolated from Donor #4) per well, as measured by FACS analysis.

FIGURE 31A is a graph showing the percentage of endo B cell killing relative to a non-TDB treated control, after 24 hours of incubation of various CD3/CD20 TDBs having different combinations of anti-CD3 arms with the anti-CD20 arm of 2H7v16, with 200,000 cyno PBMCs (isolated from Donor #2) per well, as measured by FACS analysis.

FIGURE 31B is a graph showing the percentage of T cell activation, as measured by CD69 and CD25 surface expression, after 24 hours of incubation of various CD3/CD20 TDBs having different combinations of anti-CD3 arms with the anti-CD20 arm of 2H7v16, with 200,000 cyno PBMCs (isolated from Donor #2) per well, as measured by FACS analysis.

FIGURE 32A is a graph showing the percentage of endo B cell killing relative to a non-TDB treated control, after 24 hours of incubation of various CD3/CD20 TDBs having different combinations of anti-CD3 arms with the anti-CD20 arm of 2H7v16, with 200,000 cyno PBMCs (isolated from Donor #3) per well, as measured by FACS analysis.

FIGURE 32B is a graph showing the percentage of T cell activation, as measured by CD69 and CD25 surface expression, after 24 hours of incubation of various CD3/CD20 TDBs having different combinations of anti-CD3 arms with the anti-CD20 arm of 2H7v16, with 200,000 cyno PBMCs (isolated from Donor #3) per well, as measured by FACS analysis.

FIGURE 33A is a graph showing the percentage of Bjab cell killing relative to a non-TDB treated control, after 24 hours of incubation of various CD3/CD20 TDBs having different combinations of anti-CD3 arms with the anti-CD20 arm of 2H7v16, with 200,000 cyno PBMCs per well, as measured by FACS analysis.

FIGURE 33B is a graph showing the percentage of T cell activation, as measured by CD69 and CD25 surface expression, after 24 hours of incubation of various CD3/CD20 TDBs having different combinations of anti-CD3 arms with the anti-CD20 arm of 2H7v16, with 200,000 cyno PBMCs per well, as measured by FACS analysis.

FIGURE 34A is a graph showing the percentage of endo B cell killing relative to a non-TDB treated control, after 24 hours of incubation of various CD3/CD20 TDBs having different combinations of anti-CD3 arms with the anti-CD20 arm of 2H7v16, with 200,000 human PBMCs (isolated from Donor #2) per well, as measured by FACS analysis.

FIGURE 34B is a graph showing the percentage of T cell activation, as measured by CD69 and CD25 surface expression, after 24 hours of incubation of various CD3/CD20 TDBs having different combinations of anti-CD3 arms with the anti-CD20 arm of 2H7v16, with 200,000 human PBMCs (isolated from Donor #2) per well, as measured by FACS analysis.

FIGURE 35A is a graph showing the percentage of endo B cell killing relative to a non-TDB treated control, after 24 hours of incubation of various CD3/CD20 TDBs having different combinations of anti-CD3 arms with the anti-CD20 arm of 2H7v16, with 200,000 human PBMCs (isolated from Donor #3) per well, as measured by FACS analysis.

FIGURE 35B is a graph showing the percentage of T cell activation, as measured by CD69 and CD25 surface expression, after 24 hours of incubation of various CD3/CD20 TDBs having different combinations of anti-CD3 arms with the anti-CD20 arm of 2H7v16, with 200,000 human PBMCs (isolated from Donor #3) per well, as measured by FACS analysis.

FIGURE 36A is a graph showing the percentage of endo B cell killing relative to a non-TDB treated control, after 24 hours of incubation of various CD3/CD20 TDBs having different combinations of anti-CD3 arms with the anti-CD20 arm of 2H7v16, with 200,000 human PBMCs (isolated from Donor #4) per well, as measured by FACS analysis.

FIGURE 36B is a graph showing the percentage of T cell activation, as measured by CD69 and CD25 surface expression, after 24 hours of incubation of various CD3/CD20 TDBs having different combinations of anti-CD3 arms with the anti-CD20 arm of 2H7v16, with 200,000 human PBMCs (isolated from Donor #4) per well, as measured by FACS analysis.

FIGURES 37A and 37B are graphs showing the percentage of T cell activation, as measured by CD69 and CD25 surface expression, after 24 hours of incubation of various CD3/CD20 TDBs having different combinations of anti-CD3 arms with the anti-CD20 arm of 2H7v16, with 200,000 human PBMCs (isolated from Donor #1) per well, as measured by FACS analysis.

FIGURE 37C is a table summarizing the CD8+ T cell activation EC50 (ng/ml) for each CD3/CD20 TDB tested in Figures 37A and 37B.

FIGURES 38A and 38B are graphs showing the percentage of endo B cell killing relative to a non-TDB treated control, after 24 hours of incubation of various CD3/CD20 TDBs having different combinations of anti-CD3 arms with the anti-CD20 arm of 2H7v16, with 200,000 human PBMCs (isolated from Donor #1) per well, as measured by FACS analysis.

FIGURE 38C is a table summarizing the endo B cell killing EC50 (ng/ml) for each CD3/CD20 TDB tested in Figures 38A and 38B.

FIGURES 39A and 39B are graphs showing the percentage of T cell activation, as measured by CD69 and CD25 surface expression, after 48 hours of incubation of various CD3/CD20 TDBs having different combinations of anti-CD3 arms with the anti-CD20 arm of 2H7v16, with 200,000 human PBMCs (isolated from Donor #1) per well, as measured by FACS analysis.

FIGURE 39C is a table summarizing the CD8+ T cell activation EC50 (ng/ml) for each CD3/CD20 TDB tested in Figures 39A and 39B.

FIGURES 40A and 40B are graphs showing the percentage of endo B cell killing relative to a non-TDB treated control, after 48 hours of incubation of various CD3/CD20 TDBs having different combinations of anti-CD3 arms with the anti-CD20 arm of 2H7v16, with 200,000 human PBMCs (isolated from Donor #1) per well, as measured by FACS analysis.

FIGURE 40C is a table summarizing the endo B cell killing EC50 (ng/ml) for each CD3/CD20 TDB tested in Figures 40A and 40B.

FIGURES 41A and 41B are graphs showing the percentage of T cell activation, as measured by CD69 and CD25 surface expression, after 24 hours of incubation of various CD3/CD20 TDBs having different

combinations of anti-CD3 arms with the anti-CD20 arm of 2H7v16, with 200,000 human PBMCs (isolated from Donor #2) per well, as measured by FACS analysis.

FIGURE 41C is a table summarizing the CD8+ T cell activation EC50 (ng/ml) for each CD3/CD20 TDB tested in Figures 41A and 41B.

FIGURES 42A and 42B are graphs showing the percentage of endo B cell killing relative to a non-TDB treated control, after 24 hours of incubation of various CD3/CD20 TDBs having different combinations of anti-CD3 arms with the anti-CD20 arm of 2H7v16, with 200,000 human PBMCs (isolated from Donor #2) per well, as measured by FACS analysis.

FIGURE 42C is a table summarizing the endo B cell killing EC50 (ng/ml) for each CD3/CD20 TDB tested in Figures 42A and 42B.

FIGURES 43A and 43B are graphs showing the percentage of T cell activation, as measured by CD69 and CD25 surface expression, after 48 hours of incubation of various CD3/CD20 TDBs having different combinations of anti-CD3 arms with the anti-CD20 arm of 2H7v16, with 200,000 human PBMCs (isolated from Donor #2) per well, as measured by FACS analysis.

FIGURE 43C is a table summarizing the CD8+ T cell activation EC50 (ng/ml) for each CD3/CD20 TDB tested in Figures 43A and 43B.

FIGURES 44A and 44B are graphs showing the percentage of endo B cell killing relative to a non-TDB treated control, after 48 hours of incubation of various CD3/CD20 TDBs having different combinations of anti-CD3 arms with the anti-CD20 arm of 2H7v16, with 200,000 human PBMCs (isolated from Donor #2) per well, as measured by FACS analysis.

FIGURE 44C is a table summarizing the endo B cell killing EC50 (ng/ml) for each CD3/CD20 TDB tested in Figures 44A and 44B.

FIGURE 45A is a graph showing that certain CD3/CD20 TDBs, such as one having an anti-CD20 arm of 2H7v16 and an anti-CD3 arm of 72H6, do not exhibit *in vitro* potency, as assessed by Bjab killing assays.

FIGURES 45B and 45C are graphs showing that certain CD3/CD20 TDBs, such as one having an anti-CD20 arm of 2H7v16 and an anti-CD3 arm of 72H6, do not exhibit *in vitro* potency, as assessed by endo B cell killing (B) and T cell activation (C) assays.

FIGURE 46A is a graph showing that certain CD3/CD20 TDBs, such as one having an anti-CD20 arm of 2H7v16 and an anti-CD3 arm of 13A3, exhibit low *in vitro* potency, as assessed by Bjab killing assays.

FIGURE 46B is a graph showing that certain CD3/CD20 TDBs, such as one having an anti-CD20 arm of 2H7v16 and an anti-CD3 arm of 30A1, exhibit low *in vitro* potency, as assessed by Bjab killing assays.

FIGURE 46C is a graph showing that certain CD3/CD20 TDBs, such as one having an anti-CD20 arm of 2H7v16 and an anti-CD3 arm of 41D9a, exhibit low *in vitro* potency, as assessed by Bjab killing assays. Bjab cell killing EC50 (ng/ml) values for each CD3/CD20 TDB tested are shown.

FIGURE 46D is a graph showing that certain CD3/CD20 TDBs, such as one having an anti-CD20 arm of 2H7v16 and an anti-CD3 arm of 41D9a, exhibit low *in vitro* potency, as assessed by endo B cell killing assays. Endo B cell killing EC50 (ng/ml) values for each CD3/CD20 TDB tested are shown.

FIGURE 46E is a graph showing that certain CD3/CD20 TDBs, such as one having an anti-CD20 arm of 2H7v16 and an anti-CD3 arm of 41D9a, exhibit low *in vitro* potency, as assessed by T cell activation assays.

FIGURE 47A is a graph showing that certain CD3/CD20 TDBs, such as TDBs having an anti-CD20 arm of 2H7v16 and an anti-CD3 arm of UCHT1v9, 21A9, and 40G5c, exhibit high *in vitro* potency, as assessed by endo B cell killing assays using 200,000 human PBMCs (isolated from Donor #1) per well, as measured by FACS analysis.

FIGURE 47B is a graph showing that certain CD3/CD20 TDBs, such as TDBs having an anti-CD20 arm of 2H7v16 and an anti-CD3 arm of UCHT1v9, 21A9, and 40G5c, exhibit high *in vitro* potency, as assessed by T cell activation assays using 200,000 human PBMCs (isolated from Donor #1) per well, as measured by FACS analysis.

FIGURE 48A is a graph showing that certain CD3/CD20 TDBs, such as TDBs having an anti-CD20 arm of 2H7v16 and an anti-CD3 arm of UCHT1v9, 21A9, and 40G5c, exhibit high *in vitro* potency, as assessed by endo B cell killing assays using 200,000 human PBMCs (isolated from Donor #2) per well, as measured by FACS analysis.

FIGURE 48B is a graph showing that certain CD3/CD20 TDBs, such as TDBs having an anti-CD20 arm of 2H7v16 and an anti-CD3 arm of UCHT1v9, 21A9, and 40G5c, exhibit high *in vitro* potency, as assessed by T cell activation assays using 200,000 human PBMCs (isolated from Donor #2) per well, as measured by FACS analysis.

FIGURE 49 is a table summarizing the *in vitro* potencies of various CD3/CD20 TDBs having different combinations of anti-CD3 arms with the anti-CD20 arm of 2H7v16.

FIGURE 50 shows the amino acid sequences of the light chain variable domain (top) and heavy chain variable domain (bottom) of anti-CD20 antibody 2H7.v16.

FIGURE 51 shows the amino acid sequences of the light chain variable domain (top) and heavy chain variable domain (bottom) of anti-CD3 antibody hu40G5c.

FIGURES 52A and 52B show that purified CD3/CD20 TDB (40G5c/2H7v16) has no detectable aggregate formation as determined by size-exclusion chromatography (SEC) (A) and no detectable homodimer formation (i.e., CD3/CD3 or CD20/CD20 antibody formation) as assessed by mass spectrometry (B).

FIGURE 53A is a graph showing the pharmacokinetics of serum concentrations of CD3/CD20 TDBs at varying doses in Sprague Dawley (SD) rats over time (in days), as assessed by generic immunoglobulin pharmacokinetic (GRIP) or specific assay.

FIGURE 53B is a table summarizing the quantified clearance (ml/day/kg) values of the tested CD3/CD20 TDB antibodies at each dosage tested in Figure 53A.

FIGURE 54A is a graph showing that $F(ab')_2$ portion of CD20 TDB retained the same potency as the full-length IgG CD20 TDB in B cell killing (Bjab killing) *in vitro*. 20,000 Bjab cells and 200,000 PBMCs isolated from healthy donor were incubated with various concentration of full length CD20 TDB or F(ab')2 CD20 TDB for 24 hours.

FIGURE 54B is a graph showing that B cell killing activity of CD20 TDB is T cell-dependent, as no B cell killing was detected with PBMCs depleted of CD3+ T cells. 20,000 Bjab cells and 200,000 PBMCs isolated from healthy donor, or 200,000 PBMCs depleted of CD3+T cells, were incubated with various concentration of CD20 TDB for 24 hours.

FIGURE 54C is a graph showing that comparable B cell killing can be achieved with either CD4+ or CD8+T cells as effectors. 20,000 Bjab cells and 100,000 purified CD8+T cells or CD4+T cells were incubated with various concentration of CD20 TDB for 24 hours. Cell killing and T cell activation marked as CD69+CD25+ were measured and calculated as described below.

FIGURE 54D is a graph showing that CD20 TDB is capable of activating both CD4+ and CD8+T cells. 20,000 Bjab cells and 100,000 purified CD8+T cells or CD4+T cells were incubated with various concentration of CD20 TDB for 24 hours. Cell killing and T cell activation marked as CD69+CD25+ were measured and calculated as described below.

FIGURE 54E is a graph showing that Granzyme upregulation is more prevalent within CD8+T cells upon CD20 TDB addition. 20,000 Bjab cells and 100,000 purified CD8+T cells or CD4+T cells were incubated with various concentration of CD20 TDB for 24 hours. Granzyme B induction was also detected by FACS.

FIGURE 54F is a graph showing that a higher level of perforin release is associated with CD8+T cells upon CD20 TDB addition. 20,000 Bjab cells and 100,000 purified CD8+T cells or CD4+T cells were incubated with various concentration of CD20 TDB for 24 hours. Perforin concentration in media was measured by ELISA

FIGURE 55 is a series of flow cytometry graphs showing that activated T cells are capable of proliferation in the presence of CD20 TDB and Bjab cells.

FIGURE 56A is a series of graphs showing the dose-response B cell killing curves of 8 B leukemia/lymphoma tumor cell lines (left) and the CD20 expression levels for the given B cell lines with an isotype control in grey, as measured by FACS. B cells were cultured in RPMI 1640 media supplemented with 10% FBS. For the killing assay, 20,000 B cells were incubated with 200,000 PBMCs isolated from healthy donor with various concentration of CD20 TDB for 24 hours.

FIGURE 56B is a graph showing a wide range in the mean CD20 expression on the 8 B cell lines tested in Figure 56A. CD4+T or CD8+T cells, purified from healthy donor whole blood and CFSE-labeled, were incubated alone, with Bjab only, with CD20 TDB only, or with Bjab and CD20 TDB for 24 hours first, then cells were washed and put in fresh media for another 48 hours. CFSE intensity of T cells was detected by FACS, showing proliferation of T cells only in presence of Bjab and CD20 TDB.

FIGURE 56C is a set of graphs showing that CD20 TDB is potent in killing all 8 lines in a dose-dependent manner, with EC50 values of B cell killing (ng/ml) (top) and the percentage of B cell killing (bottom) represented as a function of CD20 expression on the target B cell.

FIGURE 56D is a graph showing that TDBs targeting 5 different B cell antigens are comparable in mediating T cell killing of Bjab cells. B cells were cultured in RPMI 1640 media supplemented with 10% FBS. For the killing assay, 20,000 Bjab cells were incubated with 100,000 purified CD8+T cells from healthy donor

with a CD20 TDB (TDB A: 2H7v16/UCHT1v9) or a TDB targeting a different B cell antigen (i.e., TDBs B-E, each targeting a different B cell antigen) at a concentration of 1000ng/ml for 24 hours.

FIGURE 56E is a graph showing the extent of B cell killing for 10 B leukemia/lymphoma tumor cell lines. B cells were cultured in RPMI 1640 media supplemented with 10% FBS. For the killing assay, 20,000 B cells were incubated with 100,000 purified CD8+T cells from healthy donor and 1000ng/ml CD20 TDB (2H7v16/UCHT1v9) for 24 hours.

FIGURE 56F is a graph showing the dose-responsive killing curves for 8 random donors.

FIGURE 56G is a summary plot graph for EC50 (left) and extent of B cell killing (right) with 1000ng/ml antibody in a 24 hour assay for 30 donors.

FIGURE 56H is a set of graphs showing that the extent of B cell killing within 24 hours by CD20 TDB is very comparable or higher than B cell killing by CD19 scFv. For autologous B cell killing, 200,000 PBMCs isolated from healthy donor were incubated for 24 hours with CD20 TDB at indicated concentration. Reported cell killing was calculated as described below.

FIGURE 56I is a set of graphs showing that the extent of B cell killing within 24 hours by CD20 TDB is comparable or higher than B cell killing by CD19-TDB or CD22-TDB (top panel) or CD79a or CD79b (bottom panel). For autologous B cell killing, 200,000 PBMCs isolated from healthy donor were incubated with 40,000 BJAB cells for 24 hours with CD20, CD19, CD22, CD79a, or CD 79b TDB at the indicated concentration. Reported cell killing was calculated as described below.

FIGURE 57A is a series of graphs showing the relative expression values for human $CD3_{\varepsilon}$ detected in CD4+ T cells (left panel) and CD8+ T cells (center panel); and human CD20 in CD19+ B cells (right panel) detected in mouse (mu) or human (hu) PBMCs as measured by FACS. Mouse PBMCs were derived from blood of double transgenic huCD3/huCD20 mice; human PBMCs were derived from healthy donor blood.

FIGURE 57B is a graph showing that CD20 TDB cannot engage murine T cells to deplete B cells without human CD3 expression in human CD20 transgenic mice. huCD20 transgenic mice or huCD20/CD3 double transgenic mice were treated once intravenously with antibodies as indicated (10mg/kg for rituximab, 0.5 mg/kg for CD20 TDB and HER2 TDB). Mouse spleens were collected at D7 (7 days after antibody treatment). Anti-human CD20 antibody rituximab is used as a positive control. CD3/HER2 TDB used as negative, isotype control.

FIGURE 57C is a graph showing that CD20 TDB is able to engage murine T cells expressing huCD3 in human CD3/CD20 double transgenic mice to potently deplete murine B cells expressing huCD20. huCD20 transgenic mice or huCD20/CD3 double transgenic mice were treated once intravenously with antibodies as indicated (10mg/kg for rituximab, 0.5 mg/kg for CD20 TDB and HER2 TDB). Mouse spleens were collected at D7 (7 days after antibody treatment). CD3/HER2 TDB used as negative, isotype control.

FIGURE 58A is a series of graphs of a time-course study showing that treatment with CD20 TDB resulted in sustained B cell depletion up to D15 (15 days after dosing). huCD20/huCD3 double transgenic mice were treated once intravenously with various doses of CD20 TDB. Mouse blood (D1, D8, and D15) was collected.

FIGURE 58B is a graph showing that near complete B cell depletion in mouse spleens was only achieved at D7 after a single dose of 0.5mg/kg, while a lower dose of 0.05mg/kg only resulted in spleen B cell depletion partially. huCD20/CD3 double transgenic mice were treated once intravenously with various dose of CD20 TDB. Spleens (D7) were collected.

FIGURE 58C is a graph showing that robust B cell depletion at D7 is observed in circulation of double transgenic huCD3/huCD20 mice treated with CD20 TDB. huCD20/huCD3 double transgenic mice were treated once intravenously with 0.5mg/kg of CD20 TDB. Blood was collected at D0-5 min (5 minutes after treatment), D0-2h, D0-8h, D1, D2, D3, and D7. B cells expressing huCD20 were measured by FACS.

FIGURE 58D is a series of graphs showing T cell activation in double transgenic huCD3/huCD20 mice treated with a CD20 TDB. Treated double transgenic huCD3/huCD20 mice exhibited up to an 80% increase in human $CD3\varepsilon$ expressing CD8+T cell count at 2 hours post-CD20 TDB treatment, which returned to baseline level by D2 and D7 (top panel). Similarly, human $CD3\varepsilon$ expressing CD4+ T cells increased by 80% 2 hours after treatment with CD20 TDB and subsequently returned to baseline level by D2. Double transgenic huCD3/huCD20 mice were treated once intravenously with 0.5mg/kg of CD20 TDB. Blood was collected at D0-5 min (5 minutes after treatment), D0-2h, D0-8h, D1, D2, D3, and D7. CD4+ and CD8+ T cells expressing $CD3\varepsilon$ were measured by FACS.

FIGURE 59A is a series of flow cytometry graphs showing that CD20 TDB depletes marginal zone B cells (MZB) as efficiently as follicular B cells (FOB) after administration of TDB to double transgenic huCD3/huCD20 mice. Two double transgenic animals (left and right panels, respectively) were treated with vehicle (top panels) or a single intravenous dose of 0.5mg/kg TDB (bottom panels). Mouse spleens were collected at D7 and analyzed by FACS.

FIGURE 59B-59E is a series of graphs showing that CD20 TDB depletes marginal zone B cells (MZB) (B) as efficiently as follicular B cells (FOB) (C) after a single intravenous dose of 0.5 mg/kg TDB, along with activation of CD8+ T cells (D) and proliferation of CD8+ T cells (E) in the spleen at the indicated time points. Mouse spleens were collected at D1, D2, D3, D5, D7, and D14.

FIGURE 60A is a graph showing that humanized NSG mice treated with 3 weekly doses of CD20 TDB at 0.5mg/kg (repeat dose setting) exhibited depleted B cell levels in blood at D7, with almost no B cells detected at D21. Humanized NSG mice were treated with 3 doses of 0.5mg/kg CD20 TDB weekly intravenously. Blood was collected at D-5 (5 days before treatment), D7, D14, and D21. Murine B cell counts in blood were measured by FACS.

FIGURE 60B is a graph showing that robust B cell depletion at D21 is observed in spleens of humanized NSG mice treated with CD20 TDB. Humanized NSG mice were treated with 3 doses of 0.5mg/kg CD20 TDB weekly via intravenously. Spleens were collected at D21. Murine B cell counts in spleen were measured by FACS.

FIGURE 60C is a series of flow cytometry graphs showing that huCD8+ T cells proliferate and huCD19+ B cells are depleted 7 days following treatment (D7) of humanized NSG mice with CD20 TDB. Humanized NSG mice were treated with vehicle or 0.5mg/kg CD20 TDB (2H7v16/UCHT1v9). The spleens of

control and CD20 TDB treated humanized NSG mice were collected on D7. B cells expressing huCD19 and T cells expressing huCD8 were measured by FACS.

FIGURE 60D is a graph showing that humanized NSG mice treated with 3 weekly doses of CD20 TDB at 0.5mg/kg (repeat dose setting) exhibited an up to 10-fold increase in CD8+T cell count at D7, which returned to baseline level or lower by D14 and D21. Humanized NSG mice were treated with 3 doses of 0.5mg/kg CD20 TDB weekly via iv. Blood was collected at D-5 (5 days before treatment), D7, D14, and D21. Murine CD8+T cell counts in blood, and T cell activation was measured by FACS.

FIGURE 60E is a series of flow cytometry graphs showing the baseline levels of huCD20+ B cells (center panels) and huCD8+ and huCD4+ T cells (right panels) from 2 humanized NSG mice as measured by FACS.

FIGURE 60F is a series of graphs showing the levels of cell surface expression of huCD3ε and CD20 expression on CD19+ B cells (left), CD8+ T cells (center), and CD4+ T cells (right) as detected by FACS.

FIGURE 61A is a graph showing that CD20 TDB is potent in killing CLL B cells with autologous T cells. 200,000 PBMCs were incubated with various concentration of CD20 TDB for 48 hours in RPMI media supplemented with 10% FBS. FIGURE 61B is a graph showing that CD20 TDB is potent in inducing activation of autologous T cells in the presence of CLL B cells. 200,000 PBMCs were incubated with various concentration of CD20 TDB for 48 hours in RPMI media supplemented with 10% FBS.

FIGURE 61C is a set of graphs showing that T cell count is highly correlative with killing of CLL B cells *ex vivo*. 200,000 PBMCs were incubated with 1000ng/ml CD20 TDB for 48 hours, either alone or with added CD8+T cells purified from healthy donor. The percentage of CD19+CD5+B cells and CD8+T cells in CLL PBMCs are 90/0.55 for sample A1645, 76/3.5 for A1957, 87/0.63 for A1978, 69/1.3 for A1980. Cell killing, Granzyme B induction, and T cell activation were measured by FACS as described below.

FIGURE 62A is a set of graphs showing that T cell activation (left) following 0.1 mg/kg or 0.5 mg/kg dosages of CD20 TDB to NSG mice with engrafted CLL leukemia cells correlated with the potent depletion of engrafted CLL B cells (right).

FIGURE 62B is a set of immunohistochemistry images of spleen sections from NSG mice with engrafted CLL leukemia cells, showing that few B cells are detectable following CD20 TDB treatment. B cells and T cells were engrafted in NSG mice as described below. Mice were treated once intravenously with HER2 TDB, and rituximab at 0.5mg/kg, CD20 TDB at 0.1 and 0.5 mg/kg, and spleens were collected for FACS analysis 14 days after treatment.

FIGURE 63 is a graph showing the fitted tumor volume over time of Bjab engrafted tumors of SCID mice for Group 1 (vehicle: 20 mM Histidine/acetate pH 5.5, 240 mM Sucrose, 0.02% Tween 20); Group 2 (CD20 TDB: 2H7v114/UCHT1.v9; 0.5 mg/kg); Group 3 (vehicle: 20 mM Histidine/acetate pH 5.5, 240 mM Sucrose, 0.02% Tween 20, PBMC); and Group 4 (CD20 TDB: CD20 2H7v114/CD3 UCHT1.v9; 0.5 mg/kg, PBMC). Effector cells were PBMCs derived from healthy human donor. Mice were treated once per week for two weeks.

FIGURE 64A is a graph showing the relative level of CD20 expression on Bjab, NALM-6, SC-1, and OCI-LY 19 cells. B cells and T cells were engrafted in NSG mice as described below. Mice were treated

once intravenously with HER2 TDB, and rituximab at 0.5mg/kg, CD20 TDB at 0.1 and 0.5 mg/kg, and spleens were collected for IHC analysis 14 days after treatment.

FIGURE 64B is a graph showing that rituximab and CD20 TDB are comparable in their efficacy for killing Bjab cells *in vitro*, which express a high level of CD20 on their cell surface. PBMCs isolated from healthy donor were depleted of B cells, and used as effector cells in the in vitro cell killing assay. 20,000 B cells and 200,000 effector cells were incubated with various concentration of CD20 TDB or rituximab for 24 hours. CD20 TDB expression was detected by FACS.

FIGURE 64C is a graph showing that CD20 TDB, but not rituximab, is capable of killing NALM-6, SC-1, and OCI-LY 19 cells, which have relatively low levels of CD20 on their cell surface. PBMCs isolated from healthy donor were depleted of B cells, and used as effector cells in the in vitro cell killing assay. 20,000 B cells and 200,000 effector cells were incubated with various concentration of CD20 TDB or rituximab for 24 hours. CD20 TDB expression was detected by FACS.

FIGURE 64D is a graph showing B cell surface expression levels of unblocked CD20 antigen as a function of the concentration of Rituximab-DANA as measured by FACS. CD20/CD3 double transgenic mice were treated with a single dose of vehicle or Rituximab-DANA (10 mg/kg). Spleens were harvested 5 days post-treatment.

FIGURES 65A and 65B are graphs showing that CD20 TDB is active in killing B cells *in vitro* in the presence of high levels of rituximab (A) or dexamethasone (B). 200,000 PBMCs isolated from healthy donor were first incubated with rituximab-DANA at indicated concentration for 1 hour, CD20 TDB were then added and incubated for 24 hours. For dexamethasone assay, cells were pre-treated with 1μM dexamethasone overnight prior to adding CD20 TDB. Cell killing were calculated as described below.

FIGURE 66 is a set of graphs showing that CD20 TDB is active in depleting B cells in blood (left) and spleen (right) in mice pre-treated with rituximab-DANA. For single agent treatment, huCD20/CD3 double transgenic mice were treated once intravenously at the dose indicated; for combination treatment, mice were first treated intravenously with rituximab-DANA, and CD20 TDB were injected intravenously 30 minutes later. Blood were collected at D-7, D0-2h (2 hours after TDB treatment), and D7; spleens were collected at D7. B cell counts were measured by FACS as described below.

FIGURE 67A is a set of graphs showing the B cell (left), CD4+ T cell (middle), and CD8+ T cell (right) count in blood samples from 3 cynomolgus monkeys before and 7 days after treatment with a single intravenous dose of 1 mg/kg CD20 TDB. Three cynomolgus monkeys were treated once intravenously with 1mg/kg CD20 TDB. Blood were collected at D-7 (7 days prior to dosing), D0-4hr (4 hours right after dosing), and D7.

FIGURE 67B is a set of graphs showing B cell, CD4+ T cell, and CD8+ T cell levels in the spleen (left), mandibular lymph nodes (middle), and mesenteric lymph nodes (right) of 3 cynomolgus monkeys 7 days after treatment with a single intravenous dose of 1 mg/kg CD20 TDB. Three cynomolgus monkeys were treated once intravenously with 1mg/kg CD20 TDB. Blood were collected at D-7 (7 days prior to dosing), D0-4hr (4 hours right after dosing), and D7.

FIGURE 67C is a set of graphs showing B cell, CD4+ T cell, and CD8+ T cell levels in the spleen (left), mandibular lymph nodes (middle), and mesenteric lymph nodes (right) of 3 cynomolgus monkeys prior to treatment with a single intravenous dose of 1 mg/kg CD20 TDB. Three cynomolgus monkeys were treated once intravenously with 1mg/kg CD20 TDB. Blood were collected at D-7 (7 days prior to dosing), D0-4hr (4 hours right after dosing), and D7.

FIGURE 67D is a set of graphs showing the baseline levels of B cells and CD4+ and CD8+ T cells as a percentage of total lymphocytes detected in the spleen (left) and the mandibular lymph nodes (right) in vehicle control -treated animals.

FIGURE 68A is a set of graphs showing the CD20 TDB serum concentration from collected blood and serum samples from four cynomolgus monkeys were treated 4-times weekly with 1mg/kg CD20 TDB via intraveneous administration.

FIGURE 68B is a set of graphs showing the CD20 TDB concentration from serum samples collected from animals described in Figures 65 and 66A. Mean ± s.d. were plotted.

FIGURE 69A is histogram showing the expression of PD-L1 expression on A20-huCD20 cells from A20-huCD20 syngeneic Balb/C mice, as assessed by flow cytometry.

FIGURE 69B is a graph showing the relative tumor volume over time for Group 1 (vehicle); Group 2 (CD20 TDB at 0.5 mg/kg); Group 3 (anti-PD-L1 antibody at 10 mg/kg); and Group 4 (CD20 TDB at 0.5 mg/kg + anti-PD-L1 antibody).

FIGURE 70 is a graph showing the binding curves for each of the three tested FcRH5 TDBs tested for *in vitro* binding to CD8+ CD3-expressing T cells.

FIGURE 71A is a graph showing the percentage of MOLP-2 target cell killing as a function of FcRH5 TDB concentration, with CD8+ T cells purified from human PBMCs from Donor #1.

FIGURE 71B is a graph showing the percentage of MOLP-2 target cell killing as a function of FcRH5 TDB concentration, with CD8+ T cells purified from human PBMCs from Donor #2.

FIGURE 72A is a graph showing the percentage of CD8+CD69+ T cells as a function of FcRH5 TDB concentration, as assessed by FACS analysis. Target cells were MOLP-2, and CD8+ T cells were purified from Donor #1.

FIGURE 72B is a graph showing the percentage of CD8+CD107a+ T cells as a function of FcRH5 TDB concentration, as assessed by FACS analysis. Target cells were MOLP-2, and CD8+ T cells were purified from Donor #1.

FIGURE 72C is a graph showing the percentage of CD8+CD69+ T cells as a function of FcRH5 TDB concentration, as assessed by FACS analysis. Target cells were MOLP-2, and CD8+ T cells were purified from Donor #2.

FIGURE 72D is a graph showing the percentage of CD8+CD107a+ T cells as a function of FcRH5 TDB concentration, as assessed by FACS analysis. Target cells were MOLP-2, and CD8+ T cells were purified from Donor #2.

FIGURE 73 is a set of graphs showing the binding curves for each of the three HER2 TDBs tested for *in vitro* binding to Her2-expressing SKBR3 cells (top) and CD8+ CD3-expressing T cells (bottom).

FIGURE 74A is a graph showing the binding curves for trastuzumab (bivalent), trastuzumab (Fab), and HER2 TDB (UCHT1v9/hu4D5) (bispecific) for *in vitro* binding to Her2-expressing SKBR3 cells.

FIGURE 74B is a graph showing the percentage of viable SKBR3 cells as a function of for trastuzumab (bivalent), trastuzumab (Fab), and HER2 TDB (UCHT1v9/hu4D5) (bispecific) concentration, as assessed by CELLTITERGLO® Luminescent Cell Viability Assay.

FIGURE 74C is a graph showing the percentage of SKBR target cell killings mediated by antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) in the presence of trastuzumab (T-mab), trastuzumab produced in *E. coli* (T-mab *E. coli*) , and HER2 TDB (UCHT1v9/hu4D5), as assessed by lactate dehydrogenase (LDH) release from lysed cells.

FIGURE 75 is a graph showing the percentage of SKBR3 target cell killing as a function of HER2 TDB (hu4D5-TDB, hu4D5.91A-TDB, and hu4D5.Y100A-TDB) concentration.

FIGURE 76A is a series of panels. The top panel is a rendering of the crystal structure of the HER2 extracellular domain (ECD) bound by hu4D5 Fab (Trastuzumab), 2C4 Fab (Pertuzumab), and 7C2. The bottom panel is a ribbon structure of the $CD3_{\varepsilon}$ bound by 2C11, 38E4v1, and 40G5c.

FIGURE 76B is a table indicating the binding affinities, represented by the dissociation constant K_D (nM), of HER2-TDB for three different HER2 arms: hu4D5, 2C4, and 7C2. The bottom right panel is a table indicating the binding affinities, represented by the dissociation constant K_D (nM), of HER2-TDB for three different $CD3_{\varepsilon}$ arms: 38E4v1, 40G5c, and 2C11.

FIGURE 76C is a graph showing the percentage of HER2-expressing MCF7 target cell killing as a function of HER2-TDB (hu4D5-TDB, 2C4-TDB, and 7C2-TDB) concentration. Cytotoxicity was measured by the release of lactate dehydrogenase (LDH).

FIGURE 77 is a graph showing the HER2 hu4D5 and 2C4 arms are potent mediators of cell killing as shown by the maximum percentage of SKBR3 target cell killing achieved by treatment with the following HER2-TDB variants: hu4D5-38E4v1, hu4D5-40G5c, 2C4-38E4v1, 2C4-40G5c, 7C2-38E4v1, and 7C2-40G5c.

FIGURE 78 is a series of graphs showing the potency of variants of the HER2-TDB in killing HER2-expressing SKBR3 (left) and HER2-expressing MCF7 (right) cell lines in a dose-dependent manner, with EC50 values of target cell killing (pM).

FIGURE 79 is a series of graphs showing the percentage of HER2-expressing SKBR3 target cell killing for various TDBs with HER2 arms (hu4D5, 2C4, and 7C2) paired with high affinity (38E4v1) or low affinity (40G5c) CD3 arms as a function of TDB concentration (ng/mL).

FIGURE 80 is a series of panels. The panel on the left is showing the potency of variants of the HER2-TDB (hu4D5-38E4v1, 2C4-38E4v1, 7C2-38E4v1; hu4D5-40G5c, 2C4-40G5c, 7C2-40G5c) in killing HER2-expressing SKBR3 and HER2-expressing MCF7 cell lines in a dose dependent manner, with EC50 values of target cell killing (pM). The panel on the right is a table with the ratio of the EC50 of the given HER2-TDB variants in MCF7 versus SKBR3 target cells for three experiments.

FIGURE 81 is a series of panels. The top panel is showing a table listing the variants of the hu4D5 HER2 arm (hu4D5v7, hu4D5v5, hu4D5v10, hu4D5v31, hu4D5.Y100A) for HER2-TDB (40G5c CD3 arm) and

the corresponding EC50 (ng/mL) for SKBR3 target cell killing, HER2 binding affinity (K_D, nM) in addition to the ratio of the HER2 binding affinity K_D and SKBR3 target cell killing EC50 for the hu4D5 variants relative to hu4D5. The bottom panel is a graph showing the correlation between the SKBR3 EC50 ratio for the hu4D5 HER2-TDB variants (hu4D5, hu4D5v7, hu4D5v5, hu4D5v10, and hu4D5v31) and the relative K_D ratio for the hu4D5 HER2-TDB variants.

FIGURE 82 is a series of graphs showing the percentage of SKBR3 and MCF7 target cell killing as a function of the concentration of the following HER2-TDB variants: hu4D5-40G5c (top left), hu4D5v7-40G5c (top center), hu4D5v5-40G5c (top right), hu4D5v10-40G5c (bottom left), hu4D5v31-40G5c (bottom center), hu4D5.Y100A-40G5c (bottom right).

FIGURE 83 is a series of graphs. The graph on the left is showing the percentage of target cell killing as a function of the concentration (μg/mL) of HER2 blocking bivalent monospecific antibodies specific for the designated HER2 arm of the HER2-TDB. (HER2 blocking antibodies: bivalent monospecific antibodies to hu4D5, 2C4, and 7C2. HER2-TDBs: hu4D5-40G5c, 2C4-40G5c, and 7C2-38E4v1 at fixed concentration: 10 ng/mL.) The graph on the right is showing the percentage of viable cells as a function of the concentration of the HER2 antibody (hu4D5) trastuzumab in the presence and absence of the HER2-TDB hu4D5-40G5c.

FIGURE 84 is a series of panels. The top panel is a table providing the reactivity of variants of the HER2 arm with HER2 as measured by various binding assays in addition to the reactivity of the HER2 clones with the hu4D5 antibody trastuzumab. The bottom panel is a graph showing the percentage of target cell killing as a function of the concentration (pM) of HER2 bispecific Fab for the given clones (hu4D5, 3H4, and 2H11). EC50 values are given for each clone in pM.

FIGURE 85 is a table providing affinity and reactivity information for the variants of the HER2-TDB CD3 arm (38E4v1, 38E4, SP34, 40G5c, and 2C11).

FIGURE 86 is a graph showing HER2-expressing CT26 target cell killing as a function of concentration (ng/mL) of variants of HER2-TDB (hu4D5-2C11, hu4D5-SP34, 7C2-2C11, and 2C4-2C11). Effector cells: CD3-TG derived T cells

FIGURE 87A is a graph showing tumor volume (mm^3) measured over time (0-5 days) in animals treated with vehicle or HER2-TDB (.5 mg/kg).

FIGURE 87B is a series of graphs. The top left graph is showing the percentage of peripheral CD45+ cells per 5 cells detected on day 6 post vehicle or HER2-TDB (.5 mg/kg) treatment. The top right graph is showing the percentage of peripheral CD45+ cells that are CD8+ cells detected on day 6 post vehicle or HER2-TDB (.5 mg/kg) treatment. The bottom left graph is showing the percentage of peripheral CD45+ cells that are CD4+ detected on day 6 post vehicle or HER2-TDB (.5 mg/kg) treatment. The bottom right graph is showing the percentage of peripheral CD8+ cells that are IFN+ detected on day 6 post vehicle or HER2-TDB (.5 mg/kg) treatment.

FIGURE 88A is a series of graphs. The top graph is showing a waterfall plot of the percent change in tumor volume in animals treated with vehicle or HER2-TDB variant (hu4D5-SP34 or hu4D5-2C11; .5 mg/kg;

IV, weekly, 5 weeks). The bottom graph is showing a waterfall plot of the percent change in tumor volume in animals treated with HER2-TDB variant (2C4-38E4; .5 mg/kg; IV, weekly, 5 weeks).

FIGURE 88B is a series of graphs. The top graph is showing tumor volume as a percent of baseline volume as a function of time (days) for vehicle or HER2-TDB (hu4D5-SP34) treated animals. The bottom graph is showing tumor volume as a percent of baseline volume as a function of time (days) for vehicle or HER2-TDB (hu4D5-2C11) treated animals. (HER2-TDB: .5 mg/kg; IV, weekly, 5 weeks).

FIGURE 89 is a graph showing the percentage of CD8+CD107a+ T cells as a function of HER2 TDB (hu4D5-TDB, hu4D5.91A-TDB, and hu4D5.Y100A-TDB) concentrationhu4D5, as assessed by FACS analysis. Target cells were SKBR3 cells; effector cells were CD8+ T cells; effector cell: target cell ratio = 3:1.

FIGURE 90A is a graph showing the percentage of SKBR3 target cell killing as a function of HER2 TDB (UCHT1v9/hu4D5 and SP34/hu4D5) concentration.

FIGURE 90B is a graph showing the percentage of SKBR3 target cell killing as a function of HER2 TDB (SP34/hu4D5, 38E4c/hu4D5, and 40G5c/hu4D5) concentration.

FIGURE 90C is a graph showing the percentage of SKBR3 target cell killing as a function of HER2 TDB (SP34/hu4D5, 38E4c/hu4D5, and 40G5c/hu4D5) concentration.

FIGURE 91A is a graph showing the binding curve for each of the three HER2-TDBs (SP34/hu4D5, 38E4c/hu4D5, and 40G5c/hu4D5) tested for *in vitro* binding to CD8+ CD3-expressing T cells as assessed by FACS analysis.

FIGURE 91B is a graph showing the percentage of CD8+CD69+ T cells as a function of HER2-TDB (SP34/hu4D5, 38E4c/hu4D5, and 40G5c/hu4D5) concentration.

FIGURE 92A is a graph showing the binding curve for the two HER2 TDBs (38E4c/hu4D5 and 38E4/hu4D5) tested for *in vitro* binding to CD8+ CD3-expressing T cells, as assessed by FACS analysis.

FIGURE 92B is a graph showing the binding curve for the two HER2 TDBs (38E4c/hu4D5 and 38E4/hu4D5) tested for *in vitro* binding to Her2-expressing SKBR3 cells, as assessed by FACS analysis.

FIGURE 92C is a graph showing the percentage of SKBR3 target cell killing as a function of HER2 TDB (38E4c/hu4D5 and 38E4/hu4D5) concentration as assessed by FACS analysis. Effector cells were human CD8+ T cells; effector cell: target cell ratio = 3:1.

FIGURE 92D is a graph showing the percentage of CD8+CD69+ T cells as a function of HER2-TDB (38E4c/hu4D5 and 38E4/hu4D5) concentration.

FIGURE 93A is a graph showing the percentage of CD8+CD69+GranzymeB+ T cells as a function of HER2 TDB (UCHT1v9/hu4D5) concentration, as assessed by FACS analysis. Target cells were SKBR3 cells; effector cells were CD8+ T cells; effector cell: target cell ratio = 3:1.

FIGURE 93B is a series of graphs showing HER2 TDB (UCHT1v9/hu4D5) T cell-mediated target cell granule exocytosis detected by ELISA for perforin and granzymes A and B, and the percentage of target cell killing as assessed by LDH release. Target cells were SKBR3 cells; effector cells were PBMCs; effector cell:target cell ratio = 30:1.

FIGURE 93C is a series of graphs showing HER2 TDB (UCHT1v9/hu4D5) T cell-mediated target cell apoptosis as measured by caspase-3 and caspase-7 activities in a CASPASE-GLO® 3/7 assay, apoptosis in

a Cell Death Detection ELISA^{plus} assay, and LDH release. Target cells were SKBR3 cells; effector cells were PBMCs; effector cell: target cell ratio = 10:1.

FIGURE 93D is the image of a Western blot (top) showing the expression of Her2 in 3T3 transfected cells and a graph (bottom) showing the percentage of target cell killing by activated T cells as a function of HER2 TDB (UCHT1v9/hu4D5) concentration as measured by LDH release. Target cells were 3T3-Vector and 3T3-HER2; effector cells were PBMCs; effector cell: target cell ratio = 10:1.

FIGURE 93E is a graph showing the percentage of BT474 target cell killing as a function of HER2 TDB (UCHT1v9/hu4D5) concentration in the presence of trastuzumab Fab (T-Fab) or soluble HER2 extracellular domain (ECD) as assessed by LDH release. Effector cells were CD8+ T cells; effector cell: target cell ratio = 5:1.

FIGURE 93F is a graph showing the percentage of SKBR3 target cell killing as a function of HER2 TDB (UCHT1v9/hu4D5) concentration following the depletion of CD3+ cells from the PBMC effector cell population. Effector cell: target cell ratio = 20:1.

FIGURE 94A is a series of graphs showing the percentage of CD8+CD69+ T cells (left) and CD8+CD107a+ T cells (middle) as a function of HER2 TDB (UCHT1v9/hu4D5) concentration, as assessed by FACS analysis, and the percentage of SKBR3 target cell killing as a function of HER2 TDB (UCHT1v9/hu4D5) concentration (right). Target cells were SKBR3 cells; effector cells were CD8+ T cells; effector cell: target cell ratio = 3:1.

FIGURE 94B is a series of graphs showing the percentage of BT474 target cell killing as a function of HER2 TDB (UCHT1v9/hu4D5) concentration (left) and the percentage of CD8+CD69+GranzymeB+ T cells as a function of HER2 TDB (UCHT1v9/hu4D5) concentration (right), as assessed by FACS analysis. Target cells were BT474 cells; effector cells were CD8+ T cells; effector cell: target cell ratio as indicated.

FIGURE 95A is a series of histograms showing the expression of CFSE in CD8+ T cells in the presence of SKBR3 target cells and/or HER2 TDB (UCHT1v9/hu4D5).

FIGURE 95B is a graph showing the fold change in CD8+ cell number as a function of time following incubation with SKBR3 target cells and HER2 TDB (UCHT1v9/hu4D5), as assessed by FACS analysis.

FIGURE 95C are a series of graphs showing the fold change in CD8+ cell number as a function of time following incubation with SKBR3 target cells, HER2 TDB (UCHT1v9/hu4D5), and 20 ng/ml IL-2, as assessed by FACS analysis.

FIGURE 96A is an image of a Western blot showing the expression level of Her2 in a panel of human tumor cell lines.

FIGURE 96B is a graph showing the percentage of target cell killing as a function of HER2 TDB (UCHT1v9/hu4D5) concentration as assessed by LDH release. Target cells were BJAB, MDA435, MDA231, MCF7, MDA453, SKBR3, and BT474; effector cells were PBMCs; effector cell: target cell ratio = 25:1.

FIGURE 96C is a graph showing the percentage of target cell killing as a function of HER2 TDB (UCHT1v9/hu4D5) concentration as assessed by FACS analysis. Target cells were MCF7 and SKBR3; effector cells were PBMCs; effector cell: target cell ratio = 20:1.

FIGURE 96D is a graph showing the percentage of target cell killing as a function of HER2 TDB (UCHT1v9/hu4D5) concentration as assessed by FACS analysis. Target cells were BJAB and SKBR3; effector cells were PBMCs; effector cell: target cell ratio = 20:1.

FIGURE 96E is a table displaying the HER2 copy number for a panel of target cells and for each, the HER2 TDB EC50 and percentage of HER2 occupancy at that concentration. Target cells are MDA435, MDA231, MCF7, MDA453, BT474, and SKBR3.

FIGURE 97A is a graph showing the percentage of target cell killing as a function of HER2 TDB (UCHT1v9/hu4D5) concentration as assessed by LDH release. Target cells were SKBR3, HCC1569, KPL4, HCC202, JIMT1, and CALU3; effector cells were PBMCs; effector cell: target cell ratio = 10:1.

FIGURE 97B is a graph showing the percentage of viable target cells as a function of trastuzumab emtansine (T-DM1) concentration as assessed by CELLTITERGLO® Luminescent Cell Viability Assay. Target cells were parental BT474-M1 and T-DM1 resistant BT474-M1; effector cells were CD8+ T cells; effector cell: target cell ratio = 3:1.

FIGURE 97C is a graph showing the percentage of viable target cells as a function of HER2 TDB (UCHT1v9/hu4D5) concentration as assessed by FACS analysis. Target cells were parental BT474-M1 and T-DM1 resistant BT474-M1; effector cells were CD8+ T cells; effector cell: target cell ratio = 3:1.

FIGURE 98 is a graph and a table showing the pharmacokinetics (PK) of HER2 TDB (UCHT1v9/hu4D5) in Sprague-Dawley rats as assessed by ELISA.

FIGURE 99A is a graph showing the relative tumor volume over time for Group 1 (Vehicle at 0.5 mg/kg); Group 2 (PBMC(1) + vehicle at 0.5 mg/kg); Group 3 (PBMC(1) + HER2 TDB (UCHT1v9/hu4D5) at 0.5 mg/kg); Group 4 (PBMC(2) + vehicle at 0.5 mg/kg); and Group 5 (PBMC(2) + HER2 TDB (UCHT1v9/hu4D5) at 0.5 mg/kg).

FIGURE 99B is a graph showing the percentage of change in tumor volume over time for Group 1 (Vehicle at 0.5 mg/kg); and Group 2 (HER2 TDB (hu4D5/2C11) at 0.5 mg/kg).

FIGURE 99C is a histogram showing the relative percentage of change in tumor volume over time for Group 1 (Vehicle at 0.5 mg/kg); and Group 2 (HER2 TDB (hu4D5/2C11) at 0.5 mg/kg).

FIGURE 99D is a graph showing the relative tumor volume over time for Group 1 (Vehicle at 0.5 mg/kg); and Group 2 (HER2 TDB (hu4D5/2C11) at 0.5 mg/kg). Responders included tumors that were greater than 1000 mm^3 at the start of treatment.

FIGURE 99E is a graph showing the percentage of change in tumor volume over time for Group 1 (CD3-arm control HER2 TDB (hu4D5/SP34) at 0.5 mg/kg); and Group 2 (control TDB (2C11) at 0.5 mg/kg).

FIGURE 99F is a graph showing the relative tumor volume over time for Group 1 (Vehicle at 0.5 mg/kg); and Group 2 (HER2 TDB (hu4D5/SP34) at 0.5 mg/kg).

FIGURE 99G is a graph showing the relative tumor volume over time for Group 1 (Vehicle at 0.5 mg/kg); Group 2 (HER2 TDB (hu4D5/2C11) at 0.5 mg/kg); Group 3 (control TDB (2C11) at 0.5 mg/kg); and Group 4 (T-DM1 at 15 mg/kg).

FIGURE 100A is a graph showing the relative tumor volume over time for Group 1 (Untreated); Group 2 (HER2 TDB (UCHT1v9/hu4D5) at 0.5 mg/kg).

FIGURE 100B is a graph showing the relative tumor volume over time for Group 1 (Vehicle at 0.5 mg/kg); Group 2 (PBMC(3) + Vehicle at 0.5 mg/kg); and Group 3 (PBMC(3) + control TDB (2C11) at 0.5 mg/kg).

FIGURE 101A is a graph showing the binding affinity for the CD3-UCHT1 antibody tested for *in vitro* binding to human CD3 on human T cells, CD3 TG T cells, and BALB/c T cells, as assessed by FACS analysis.

FIGURE 101B is a graph showing the binding affinity for the CD3-2C11 antibody tested for *in vitro* binding to mouse CD3 on CD3 TG T cells and BALB/c T cells, as assessed by FACS analysis.

FIGURE 102A is a graph showing the percentage of CT26-HER2 target cell killing as a function of HER2 TDB (UCHT1v9/hu4D5) concentration, as assessed by FACS analysis. Effector cells were human peripheral blood isolated T cells, huCD3 transgenic splenic T cells, and BALB/c splenic T cells.

FIGURE 102B is a graph showing the percentage of CT26-HER2 target cell killing as a function of HER2 TDB (hu4D5/2C11) concentration, as assessed by FACS analysis. Effector cells were human peripheral blood isolated T cells, huCD3 transgenic splenic T cells, and BALB/c splenic T cells.

FIGURE 103 is a graph showing the relative tumor volume over time for Group 1 (Vehicle at 0.5 mg/kg); and Group 2 (HER2 TDB (hu4D5/SP34) at 0.5 mg/kg).

FIGURE 104 a graph showing the binding curves for each of the three LYPD1 TDBs tested for *in vitro* binding to CD8+ CD3-expressing T cells.

FIGURE 105 is a graph showing the percentage of OVCAR3.Luc target cell killing as a function of LYPD1 TDB concentration.

FIGURE 106 is a set of graphs showing the percentage of CD8+CD69+ (left) and CD8+CD25+ (right) T cells as a function of LYPD1 TDB concentration, as assessed by FACS analysis. Target cells were OVCAR3.Luc cells; effector cell: target cell ratio = 3:1.

FIGURE 107 shows the amino acid sequences of the light chain variable domain (top) and heavy chain variable domain (bottom) of anti-RET antibody 41205.v6.

FIGURE 108A is a graph showing tumor volume (mm^3) as a function of time (days) for Group 1 (vehicle, qwx3, IV; n=9); Group 2 (CD20 TDB (2H7-mu2C11), 0.5 mg/kg, qwx3, IV; n=9); Group 3 (anti-PD1 (mu8F11 DANA), 10 mg/kg, tiwx3, IP; n=9); and Group 4 (anti-PD1 (mu8F11 DANA), 10 mg/kg, tiwx3, IP+ CD20 TDB (2H7-mu2C11), 0.5 mg/kg, qwx3, IV; n=9).

FIGURE 108B is a graph showing tumor volume (mm^3) as a function of time (days) for Group 1 (vehicle, qwx3, IV; n=9); Group 2 (CD20 TDB (2H7-mu2C11), 0.5 mg/kg, qwx3, IV; n=9); Group 3 (anti-PD1 (mu8F11 DANA), 10 mg/kg, tiwx3, IP; n=9); and Group 4 (anti-PD1 (mu8F11 DANA), 10 mg/kg, tiwx3, IP + CD20 TDB (2H7-mu2C11), 0.5 mg/kg, qwx3, IV; n=9). The bolded solid line represents the fitted tumor volume for the specified group.

DETAILED DESCRIPTION OF EMBODIMENTS OF THE INVENTION

I. DEFINITIONS

The term "about" as used herein refers to the usual error range for the respective value readily known to the skilled person in this technical field. Reference to "about" a value or parameter herein includes (and describes) embodiments that are directed to that value or parameter per se.

An "acceptor human framework" for the purposes herein is a framework comprising the amino acid sequence of a light chain variable domain (VL) framework or a heavy chain variable domain (VH) framework derived from a human immunoglobulin framework or a human consensus framework, as defined below. An acceptor human framework "derived from" a human immunoglobulin framework or a human consensus framework may comprise the same amino acid sequence thereof, or it may contain amino acid sequence changes. In some embodiments, the number of amino acid changes are 10 or less, 9 or less, 8 or less, 7 or less, 6 or less, 5 or less, 4 or less, 3 or less, or 2 or less. In some embodiments, the VL acceptor human framework is identical in sequence to the VL human immunoglobulin framework sequence or human consensus framework sequence.

"Affinity" refers to the strength of the sum total of noncovalent interactions between a single binding site of a molecule (e.g., an antibody) and its binding partner (e.g., an antigen). Unless indicated otherwise, as used herein, "binding affinity" refers to intrinsic binding affinity which reflects a 1:1 interaction between members of a binding pair (e.g., antibody and antigen). The affinity of a molecule X for its partner Y can generally be represented by the dissociation constant (Kd). Affinity can be measured by common methods known in the art, including those described herein. Specific illustrative and exemplary embodiments for measuring binding affinity are described in the following.

An "affinity matured" antibody refers to an antibody with one or more alterations in one or more hypervariable regions (HVRs), compared to a parent antibody which does not possess such alterations, such alterations resulting in an improvement in the affinity of the antibody for antigen.

The terms "anti-CD3 antibody" and "an antibody that binds to CD3" refer to an antibody that is capable of binding CD3 with sufficient affinity such that the antibody is useful as a diagnostic and/or therapeutic agent in targeting CD3. In one embodiment, the extent of binding of an anti-CD3 antibody to an unrelated, non-CD3 protein is less than about 10% of the binding of the antibody to CD3 as measured, e.g., by a radioimmunoassay (RIA). In certain embodiments, an antibody that binds to CD3 has a dissociation constant (Kd) of ≤ 1μM, ≤ 100 nM, ≤ 10 nM, ≤ 1 nM, ≤ 0.1 nM, ≤ 0.01 nM, or ≤ 0.001 nM (e.g. 10^{-8} M or less, e.g. from 10^{-8} M to 10^{-13} M, e.g., from 10^{-9} M to 10^{-13} M). In certain embodiments, an anti-CD3 antibody binds to an epitope of CD3 that is conserved among CD3 from different species.

The term "antibody" herein is used in the broadest sense and encompasses various antibody structures, including but not limited to monoclonal antibodies, polyclonal antibodies, multispecific antibodies (e.g., bispecific antibodies), and antibody fragments so long as they exhibit the desired antigen-binding activity.

An “antibody fragment” refers to a molecule other than an intact antibody that comprises a portion of an intact antibody that binds the antigen to which the intact antibody binds. Examples of antibody fragments include but are not limited to Fv, Fab, Fab’, Fab’-SH, $F(ab')_2$; diabodies; linear antibodies; single-chain antibody molecules (e.g. scFv); and multispecific antibodies formed from antibody fragments.

By “binding domain” is meant a part of a compound or a molecule that specifically binds to a target epitope, antigen, ligand, or receptor. Binding domains include but are not limited to antibodies (e.g., monoclonal, polyclonal, recombinant, humanized, and chimeric antibodies), antibody fragments or portions thereof (e.g., Fab fragments, Fab’2, scFv antibodies, SMIP, domain antibodies, diabodies, minibodies, scFv-Fc, affibodies, nanobodies, and VH and/or VL domains of antibodies), receptors, ligands, aptamers, and other molecules having an identified binding partner.

A “chemotherapeutic agent” is a chemical compound useful in the treatment of cancer. Examples of chemotherapeutic agents include alkylating agents such as thiotepa and cyclosphosphamide (CYTOXAN®); alkyl sulfonates such as busulfan, improsulfan and piposulfan; aziridines such as benzodopa, carboquone, meturedopa, and uredopa; ethylenimines and methylamelamines including altretamine, triethylenemelamine, triethylenephosphoramide, triethylenethiophosphoramide and trimethylomelamine; acetogenins (especially bullatacin and bullatacinone); delta-9-tetrahydrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapachone; lapachol; colchicines; betulinic acid; a camptothecin (including the synthetic analogue topotecan (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecan, CAMPTOSAR®), acetylcamptothecin, scopolectin, and 9-aminocamptothecin); bryostatin; callystatin; CC-1065 (including its adozelesin, carzelesin and bizelesin synthetic analogues); podophyllotoxin; podophyllinic acid; teniposide; cryptophycins (particularly cryptophycin 1 and cryptophycin 8); dolastatin; duocarmycin (including the synthetic analogues, KW-2189 and CB1-TM1); eleutherobin; pancratistatin; a sarcodictyin; spongistatin; nitrogen mustards such as chlorambucil, chlornaphazine, chlorophosphamide, estramustine, ifosfamide, mechlorethamine, mechlorethamine oxide hydrochloride, melphalan, novembichin, phenesterine, prednimustine, trofosfamide, uracil mustard; nitrosoureas such as carmustine, chlorozotocin, fotemustine, lomustine, nimustine, and ranimnustine; antibiotics such as the enediyne antibiotics (e.g., calicheamicin, especially calicheamicin gamma1I and calicheamicin omegaII (see, e.g., Nicolaou et al., *Angew. Chem Intl. Ed. Engl.*, 33: 183-186 (1994)); CDP323, an oral alpha-4 integrin inhibitor; dynemicin, including dynemicin A; an esperamicin; as well as neocarzinostatin chromophore and related chromoprotein enediyne antibiotic chromophores), aclacinomysins, actinomycin, authramycin, azaserine, bleomycins, cactinomycin, carabicin, caminomycin, carzinophilin, chromomycins, dactinomycin, daunorubicin, detorubicin, 6-diazo-5-oxo-L-norleucine, doxorubicin (including ADRIAMYCIN®, morpholino-doxorubicin, cyanomorpholino-doxorubicin, 2-pyrrolino-doxorubicin, doxorubicin HCl liposome injection (DOXIL®), liposomal doxorubicin TLC D-99 (MYOCET®), peglylated liposomal doxorubicin (CAELYX®), and deoxydoxorubicin), epirubicin, esorubicin, idarubicin, marcellomycin, mitomycins such as mitomycin C, mycophenolic acid, nogalamycin, olivomycins, peplomycin, porfiromycin, puromycin, quelamycin, rodorubicin, streptonigrin, streptozocin, tubercidin, ubenimex, zinostatin, zorubicin; anti-metabolites such as methotrexate, gemcitabine (GEMZAR®), tegafur (UFTORAL®), capecitabine (XELODA®), an epothilone, and 5-fluorouracil (5-FU); combretastatin; folic acid analogues such as denopterin, methotrexate, pteropterin, trimetrexate; purine analogs such as fludarabine, 6-mercaptopurine, thiamiprine,

thioguanine; pyrimidine analogs such as ancitabine, azacitidine, 6-azauridine, carmofur, cytarabine, dideoxyuridine, doxifluridine, enocitabine, floxuridine; androgens such as calusterone, dromostanolone propionate, epitiostanol, mepitiostane, testolactone; anti-adrenals such as aminoglutethimide, mitotane, trilostane; folic acid replenisher such as frolinic acid; aceglatone; aldophosphamide glycoside; aminolevulinic acid; eniluracil; amsacrine; bestrabucil; bisantrene; edatraxate; defofamine; demecolcine; diaziquone; elformithine; elliptinium acetate; an epothilone; etoglucid; gallium nitrate; hydroxyurea; lentinan; lonidainine; maytansinoids such as maytansine and ansamitocins; mitoguazone; mitoxantrone; mopidanmol; nitraerine; pentostatin; phenamet; pirarubicin; losoxantrone; 2-ethylhydrazide; procarbazine; PSK® polysaccharide complex (JHS Natural Products, Eugene, Oreg.); razoxane; rhizoxin; sizofuran; spirogermanium; tenuazonic acid; triaziquone; 2,2',2'-trichlorotriethylamine; trichothecenes (especially T-2 toxin, verracurin A, roridin A and anguidine); urethan; vindesine (ELDISINE®, FILDESIN®); dacarbazine; mannomustine; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacytosine; arabinoside ("Ara-C"); thiotepa; taxoid, e.g., paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), albumin-engineered nanoparticle formulation of paclitaxel (ABRAXANE™), and docetaxel (TAXOTERE®, Rhome-Poulene Rorer, Antony, France); chloranbucil; 6-thioguanine; mercaptopurine; methotrexate; platinum agents such as cisplatin, oxaliplatin (e.g., ELOXATIN®), and carboplatin; vincas, which prevent tubulin polymerization from forming microtubules, including vinblastine (VELBAN®), vincristine (ONCOVIN®), vindesine (ELDISINE®, FILDESIN®), and vinorelbine (NAVELBINE®); etoposide (VP-16); ifosfamide; mitoxantrone; leucovorin; novantrone; edatrexate; daunomycin; aminopterin; ibandronate; topoisomerase inhibitor RFS 2000; difluoromethylornithine (DMFO); retinoids such as retinoic acid, including bexarotene (TARGRETIN®); bisphosphonates such as clodronate (for example, BONEFOS® or OSTAC®), etidronate (DIDROCAL®), NE-58095, zoledronic acid/zoledronate (ZOMETA®), alendronate (FOSAMAX®), pamidronate (AREDIA®), tiludronate (SKELID®), or risedronate (ACTONEL®); troxacitabine (a 1,3-dioxolane nucleoside cytosine analog); antisense oligonucleotides, particularly those that inhibit expression of genes in signaling pathways implicated in aberrant cell proliferation, such as, for example, PKC-alpha, Raf, H-Ras, and epidermal growth factor receptor (EGF-R) (e.g., erlotinib (Tarceva™)); and VEGF-A that reduce cell proliferation; vaccines such as THERATOPE® vaccine and gene therapy vaccines, for example, ALLOVECTIN® vaccine, LEUVECTIN® vaccine, and VAXID® vaccine; topoisomerase 1 inhibitor (e.g., LURTOTECAN®); rmRH (e.g., ABARELIX®); BAY439006 (sorafenib; Bayer); SU-11248 (sunitinib, SUTENT®, Pfizer); perifosine, COX-2 inhibitor (e.g. celecoxib or etoricoxib), proteosome inhibitor (e.g. PS341); bortezomib (VELCADE®); CCI-779; tipifarnib (R11577); orafenib, ABT510; Bcl-2 inhibitor such as oblimersen sodium (GENASENSE®); pixantrone; EGFR inhibitors; tyrosine kinase inhibitors; serine-threonine kinase inhibitors such as rapamycin (sirolimus, RAPAMUNE®); farnesyltransferase inhibitors such as lonafarnib (SCH 6636, SARASAR™); and pharmaceutically acceptable salts, acids or derivatives of any of the above; as well as combinations of two or more of the above such as CHOP, an abbreviation for a combined therapy of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisolone; and FOLFOX, an abbreviation for a treatment regimen with oxaliplatin (ELOXATIN™) combined with 5-FU and leucovorin, and pharmaceutically acceptable salts, acids or derivatives of any of the above; as well as combinations of two or more of the above.

Chemotherapeutic agents as defined herein include “anti-hormonal agents” or “endocrine therapeutics” which act to regulate, reduce, block, or inhibit the effects of hormones that can promote the growth of cancer. They may be hormones themselves, including, but not limited to: anti-estrogens and selective estrogen receptor modulators (SERMs), including, for example, tamoxifen (including NOLVADEX® tamoxifen), raloxifene, droloxifene, 4-hydroxytamoxifen, trioxifene, keoxifene, LY117018, onapristone, and FARESTON.cndot.toremifene; aromatase inhibitors that inhibit the enzyme aromatase, which regulates estrogen production in the adrenal glands, such as, for example, 4(5)-imidazoles, aminoglutethimide, MEGASE® megestrol acetate, AROMASIN® exemestane, formestanie, fadrozole, RIVISOR® vorozole, FEMARA® letrozole, and ARIMIDEX® anastrozole; and anti-androgens such as flutamide, nilutamide, bicalutamide, leuprolide, and goserelin; as well as troxacitabine (a 1,3-dioxolane nucleoside cytosine analog); antisense oligonucleotides, particularly those which inhibit expression of genes in signaling pathways implicated in abherant cell proliferation, such as, for example, PKC-alpha, Raf and H-Ras; ribozymes such as a VEGF expression inhibitor (e.g., ANGIOZYME® ribozyme) and a HER2 expression inhibitor; vaccines such as gene therapy vaccines, for example, ALLOVECTIN® vaccine, LEUVECTIN® vaccine, and VAXID® vaccine; PROLEUKIN® rIL-2; LURTOTECAN® topoisomerase 1 inhibitor; ABARELIX® rmRH; Vinorelbine and Esperamicins (see U.S. Pat. No. 4,675,187), and pharmaceutically acceptable salts, acids or derivatives of any of the above; as well as combinations of two or more of the above.

The term “chimeric” antibody refers to an antibody in which a portion of the heavy and/or light chain is derived from a particular source or species, while the remainder of the heavy and/or light chain is derived from a different source or species.

The term “cluster of differentiation 3” or “CD3,” as used herein, refers to any native CD3 from any vertebrate source, including mammals such as primates (e.g. humans) and rodents (e.g., mice and rats), unless otherwise indicated, including, for example, CD3ε, CD3γ, CD3α, and CD3β chains. The term encompasses “full-length,” unprocessed CD3 (e.g., unprocessed or unmodified CD3ε or CD3γ), as well as any form of CD3 that results from processing in the cell. The term also encompasses naturally occurring variants of CD3, including, for example, splice variants or allelic variants. CD3 includes, for example, human CD3ε protein (NCBI RefSeq No. NP_000724), which is 207 amino acids in length, and human CD3γ protein (NCBI RefSeq No. NP_000064), which is 182 amino acids in length.

The “class” of an antibody refers to the type of constant domain or constant region possessed by its heavy chain. There are five major classes of antibodies: IgA, IgD, IgE, IgG, and IgM, and several of these may be further divided into subclasses (isotypes), e.g., IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4, IgA_1, and IgA_2. The heavy chain constant domains that correspond to the different classes of immunoglobulins are called α, δ, ε, γ, and μ, respectively.

It is understood that aspects and embodiments of the invention described herein include “comprising,” “consisting,” and “consisting essentially of” aspects and embodiments.

The term “cytotoxic agent” as used herein refers to a substance that inhibits or prevents a cellular function and/or causes cell death or destruction. Cytotoxic agents include, but are not limited to, radioactive

isotopes (e.g., At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32}, Pb^{212} and radioactive isotopes of Lu); chemotherapeutic agents or drugs (e.g., methotrexate, adriamicin, vinca alkaloids (vincristine, vinblastine, etoposide), doxorubicin, melphalan, mitomycin C, chlorambucil, daunorubicin or other intercalating agents); growth inhibitory agents; enzymes and fragments thereof such as nucleolytic enzymes; antibiotics; toxins such as small molecule toxins or enzymatically active toxins of bacterial, fungal, plant or animal origin, including fragments and/or variants thereof; and the various antitumor or anticancer agents disclosed below.

A “disorder” is any condition that would benefit from treatment including, but not limited to, chronic and acute disorders or diseases including those pathological conditions which predispose the mammal to the disorder in question.

The terms “cell proliferative disorder” and “proliferative disorder” refer to disorders that are associated with some degree of abnormal cell proliferation. In one embodiment, the cell proliferative disorder is cancer. In one embodiment, the cell proliferative disorder is a tumor.

The terms "cancer" and "cancerous" refer to or describe the physiological condition in mammals that is typically characterized by unregulated cell growth. Examples of cancer include but are not limited to, carcinoma, lymphoma, blastoma, sarcoma, and leukemia or lymphoid malignancies. More particular examples of such cancers include, but not limited to, squamous cell cancer (*e.g.*, epithelial squamous cell cancer), lung cancer including small-cell lung cancer, non-small cell lung cancer, adenocarcinoma of the lung and squamous carcinoma of the lung, cancer of the peritoneum, hepatocellular cancer, gastric or stomach cancer including gastrointestinal cancer and gastrointestinal stromal cancer, pancreatic cancer, glioblastoma, cervical cancer, ovarian cancer, liver cancer, bladder cancer, cancer of the urinary tract, hepatoma, breast cancer, colon cancer, rectal cancer, colorectal cancer, endometrial or uterine carcinoma, salivary gland carcinoma, kidney or renal cancer, prostate cancer, vulval cancer, thyroid cancer, hepatic carcinoma, anal carcinoma, penile carcinoma, melanoma, superficial spreading melanoma, lentigo maligna melanoma, acral lentiginous melanomas, nodular melanomas, multiple myeloma and B-cell lymphoma (including low grade/follicular non-Hodgkin's lymphoma (NHL); small lymphocytic (SL) NHL; intermediate grade/follicular NHL; intermediate grade diffuse NHL; high grade immunoblastic NHL; high grade lymphoblastic NHL; high grade small non-cleaved cell NHL; bulky disease NHL; mantle cell lymphoma; AIDS-related lymphoma; and Waldenstrom's Macroglobulinemia); chronic lymphocytic leukemia (CLL); acute lymphoblastic leukemia (ALL); hairy cell leukemia; chronic myeloblastic leukemia; and post-transplant lymphoproliferative disorder (PTLD), as well as abnormal vascular proliferation associated with phakomatoses, edema (such as that associated with brain tumors), Meigs' syndrome, brain, as well as head and neck cancer, and associated metastases. In certain embodiments, cancers that are amenable to treatment by the antibodies of the invention include breast cancer, colorectal cancer, rectal cancer, non-small cell lung cancer, glioblastoma, non-Hodgkins lymphoma (NHL), renal cell cancer, prostate cancer, liver cancer, pancreatic cancer, soft-tissue sarcoma, kaposi's sarcoma, carcinoid carcinoma, head and neck cancer, ovarian cancer, mesothelioma, and multiple myeloma. In some embodiments, the cancer is selected from: small cell lung cancer, gliblastoma, neuroblastomas, melanoma, breast carcinoma, gastric cancer, colorectal cancer (CRC), and hepatocellular carcinoma. Yet, in some embodiments, the cancer is selected from: non-small cell lung

cancer, colorectal cancer, glioblastoma and breast carcinoma, including metastatic forms of those cancers. In other embodiments, the cancer is selected from a class of mature B-Cell cancers excluding Hodgkin's Lymphoma but including germinal-center B-cell-like (GCB) DLBCL, activated B-cell-like (ABC) DLBCL, follicular lymphoma (FL), mantle cell lymphoma (MCL), acute myeloid leukemia (AML), chronic lymphoid leukemia (CLL), marginal zone lymphoma (MZL), small lymphocytic leukemia (SLL), lymphoplasmacytic lymphoma (LL), Waldenstrom macroglobulinemia (WM), central nervous system lymphoma (CNSL), Burkitt's lymphoma (BL), B-cell prolymphocytic leukemia, Splenic marginal zone lymphoma, Hairy cell leukemia, Splenic lymphoma/leukemia, unclassifiable, Splenic diffuse red pulp small B-cell lymphoma, Hairy cell leukemia variant, Waldenström macroglobulinemia, Heavy chain diseases, α Heavy chain disease, γ Heavy chain disease, μ Heavy chain disease, Plasma cell myeloma, Solitary plasmacytoma of bone, Extraosseous plasmacytoma, Extranodal marginal zone lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma), Nodal marginal zone lymphoma, Pediatric nodal marginal zone lymphoma, Pediatric follicular lymphoma, Primary cutaneous follicle centre lymphoma, T-cell/histiocyte rich large B-cell lymphoma, Primary DLBCL of the CNS, Primary cutaneous DLBCL, leg type, EBV-positive DLBCL of the elderly, DLBCL associated with chronic inflammation, Lymphomatoid granulomatosis, Primary mediastinal (thymic) large B-cell lymphoma, Intravascular large B-cell lymphoma, ALK-positive large B-cell lymphoma, Plasmablastic lymphoma, Large B-cell lymphoma arising in HHV8-associated multicentric Castleman disease, Primary effusion lymphoma: B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and Burkitt lymphoma, and B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and classical Hodgkin lymphoma.

"Tumor," as used herein, refers to all neoplastic cell growth and proliferation, whether malignant or benign, and all pre-cancerous and cancerous cells and tissues. The terms "cancer", "cancerous", "cell proliferative disorder", "proliferative disorder" and "tumor" are not mutually exclusive as referred to herein.

The term "tumor antigen," as used herein, may be understood as those antigens that are presented on tumor cells. These antigens can be presented on the cell surface with an extracellular part, which is often combined with a transmembrane and cytoplasmic part of the molecule. These antigens can sometimes be presented only by tumor cells and never by the normal ones. Tumor antigens can be exclusively expressed on tumor cells or might represent a tumor specific mutation compared to normal cells. In this case, they are called tumor-specific antigens. More common are tumor antigens that are presented by tumor cells and normal cells, and they are called tumor-associated antigens. These tumor-associated antigens can be overexpressed compared to normal cells or are accessible for antibody binding in tumor cells due to the less compact structure of the tumor tissue compared to normal tissue. In one aspect the tumor antigen is selected from those set forth in Table 1 below.

"Effector functions" refer to those biological activities attributable to the Fc region of an antibody, which vary with the antibody isotype. Examples of antibody effector functions include: C1q binding and complement dependent cytotoxicity (CDC); Fc receptor binding; antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC); phagocytosis; down regulation of cell surface receptors (e.g. B cell receptor); and B cell activation.

An "effective amount" of a compound, for example, an anti-CD3 antibody of the invention or a composition (e.g., pharmaceutical composition) thereof, is at least the minimum amount required to achieve the desired therapeutic or prophylactic result, such as a measurable improvement or prevention of a particular disorder (e.g., a cell proliferative disorder, e.g., cancer). An effective amount herein may vary according to factors such as the disease state, age, sex, and weight of the patient, and the ability of the antibody to elicit a desired response in the individual. An effective amount is also one in which any toxic or detrimental effects of the treatment are outweighed by the therapeutically beneficial effects. For prophylactic use, beneficial or desired results include results such as eliminating or reducing the risk, lessening the severity, or delaying the onset of the disease, including biochemical, histological and/or behavioral symptoms of the disease, its complications and intermediate pathological phenotypes presenting during development of the disease. For therapeutic use, beneficial or desired results include clinical results such as decreasing one or more symptoms resulting from the disease, increasing the quality of life of those suffering from the disease, decreasing the dose of other medications required to treat the disease, enhancing effect of another medication such as via targeting, delaying the progression of the disease, and/or prolonging survival. In the case of cancer or tumor, an effective amount of the drug may have the effect in reducing the number of cancer cells; reducing the tumor size; inhibiting (*i.e.*, slow to some extent or desirably stop) cancer cell infiltration into peripheral organs; inhibit (*i.e.*, slow to some extent and desirably stop) tumor metastasis; inhibiting to some extent tumor growth; and/or relieving to some extent one or more of the symptoms associated with the disorder. An effective amount can be administered in one or more administrations. For purposes of this invention, an effective amount of drug, compound, or pharmaceutical composition is an amount sufficient to accomplish prophylactic or therapeutic treatment either directly or indirectly. As is understood in the clinical context, an effective amount of a drug, compound, or pharmaceutical composition may or may not be achieved in conjunction with another drug, compound, or pharmaceutical composition. Thus, an "effective amount" may be considered in the context of administering one or more therapeutic agents, and a single agent may be considered to be given in an effective amount if, in conjunction with one or more other agents, a desirable result may be or is achieved.

The term "Fc region" herein is used to define a C-terminal region of an immunoglobulin heavy chain that contains at least a portion of the constant region. The term includes native sequence Fc regions and variant Fc regions. In one embodiment, a human IgG heavy chain Fc region extends from Cys226, or from Pro230, to the carboxyl-terminus of the heavy chain. However, the C-terminal lysine (Lys447) of the Fc region may or may not be present. Unless otherwise specified herein, numbering of amino acid residues in the Fc region or constant region is according to the EU numbering system, also called the EU index, as described in Kabat et al*., Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

"Framework" or "FR" refers to variable domain residues other than hypervariable region (HVR) residues. The FR of a variable domain generally consists of four FR domains: FR1, FR2, FR3, and FR4. Accordingly, the HVR and FR sequences generally appear in the following sequence in VH (or VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

The terms “full-length antibody,” “intact antibody,” and “whole antibody” are used herein interchangeably to refer to an antibody having a structure substantially similar to a native antibody structure or having heavy chains that contain an Fc region as defined herein.

A “growth inhibitory agent” when used herein refers to a compound or composition which inhibits growth of a cell either *in vitro* or *in vivo*. In one embodiment, growth inhibitory agent is growth inhibitory antibody that prevents or reduces proliferation of a cell expressing an antigen to which the antibody binds. In another embodiment, the growth inhibitory agent may be one which significantly reduces the percentage of cells in S phase. Examples of growth inhibitory agents include agents that block cell cycle progression (at a place other than S phase), such as agents that induce G1 arrest and M-phase arrest. Classical M-phase blockers include the vincas (vincristine and vinblastine), taxanes, and topoisomerase II inhibitors such as doxorubicin, epirubicin, daunorubicin, etoposide, and bleomycin. Those agents that arrest G1 also spill over into S-phase arrest, for example, DNA alkylating agents such as tamoxifen, prednisone, dacarbazine, mechlorethamine, cisplatin, methotrexate, 5-fluorouracil, and ara-C. Further information can be found in Mendelsohn and Israel, eds., The Molecular Basis of Cancer, Chapter 1, entitled “Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs” by Murakami et al. (W.B. Saunders, Philadelphia, 1995), e.g., p. 13. The taxanes (paclitaxel and docetaxel) are anticancer drugs both derived from the yew tree. Docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), derived from the European yew, is a semisynthetic analogue of paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). Paclitaxel and docetaxel promote the assembly of microtubules from tubulin dimers and stabilize microtubules by preventing depolymerization, which results in the inhibition of mitosis in cells.

The term “HER2-positive” cancer comprises cancer cells which have higher than normal levels of HER2. Examples of HER2-positive cancer include HER2-positive breast cancer and HER2-positive gastric cancer. Optionally, HER2-positive cancer has an immunohistochemistry (IHC) score of 2+ or 3+ and/or an in situ hybridization (ISH) amplification ratio ≥2.0.

The terms “host cell,” “host cell line,” and “host cell culture” are used interchangeably and refer to cells into which exogenous nucleic acid has been introduced, including the progeny of such cells. Host cells include “transformants” and “transformed cells,” which include the primary transformed cell and progeny derived therefrom without regard to the number of passages. Progeny may not be completely identical in nucleic acid content to a parent cell, but may contain mutations. Mutant progeny that have the same function or biological activity as screened or selected for in the originally transformed cell are included herein.

A “human antibody” is one which possesses an amino acid sequence which corresponds to that of an antibody produced by a human or a human cell or derived from a non-human source that utilizes human antibody repertoires or other human antibody-encoding sequences. This definition of a human antibody specifically excludes a humanized antibody comprising non-human antigen-binding residues. Human antibodies can be produced using various techniques known in the art, including phage-display libraries. Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991). Also available for the preparation of human monoclonal antibodies are methods described in Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner *et al.*, *J. Immunol.*,

147(1):86-95 (1991). See also van Dijk and van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 5: 368-74 (2001). Human antibodies can be prepared by administering the antigen to a transgenic animal that has been modified to produce such antibodies in response to antigenic challenge, but whose endogenous loci have been disabled, *e.g.*, immunized xenomice (see, *e.g.*, U.S. Pat. Nos. 6,075,181 and 6,150,584 regarding XENOMOUSE™ technology). See also, for example, Li *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006) regarding human antibodies generated via a human B-cell hybridoma technology.

A "human consensus framework" is a framework which represents the most commonly occurring amino acid residues in a selection of human immunoglobulin VL or VH framework sequences. Generally, the selection of human immunoglobulin VL or VH sequences is from a subgroup of variable domain sequences. Generally, the subgroup of sequences is a subgroup as in Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3. In one embodiment, for the VL, the subgroup is subgroup kappa I as in Kabat et al*., supra.* In one embodiment, for the VH, the subgroup is subgroup III as in Kabat et al*., supra*.

A "humanized" antibody refers to a chimeric antibody comprising amino acid residues from non-human HVRs and amino acid residues from human FRs. In certain embodiments, a humanized antibody will comprise substantially all of at least one, and typically two, variable domains, in which all or substantially all of the HVRs (e.g., CDRs) correspond to those of a non-human antibody, and all or substantially all of the FRs correspond to those of a human antibody. A humanized antibody optionally may comprise at least a portion of an antibody constant region derived from a human antibody. A "humanized form" of an antibody, e.g., a non-human antibody, refers to an antibody that has undergone humanization.

The term "hypervariable region" or "HVR" as used herein refers to each of the regions of an antibody variable domain which are hypervariable in sequence ("complementarity determining regions" or "CDRs") and/or form structurally defined loops ("hypervariable loops") and/or contain the antigen-contacting residues ("antigen contacts"). Generally, antibodies comprise six HVRs: three in the VH (H1, H2, H3), and three in the VL (L1, L2, L3). Exemplary HVRs herein include:

(a) hypervariable loops occurring at amino acid residues 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2), and 96-101 (H3) (Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987));

(b) CDRs occurring at amino acid residues 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35b (H1), 50-65 (H2), and 95-102 (H3) (Kabat et al*., Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991));

(c) antigen contacts occurring at amino acid residues 27c-36 (L1), 46-55 (L2), 89-96 (L3), 30-35b (H1), 47-58 (H2), and 93-101 (H3) (MacCallum et al. *J. Mol. Biol.* 262: 732-745 (1996)); and

(d) combinations of (a), (b), and/or (c), including HVR amino acid residues 46-56 (L2), 47-56 (L2), 48-56 (L2), 49-56 (L2), 26-35 (H1), 26-35b (H1), 49-65 (H2), 93-102 (H3), and 94-102 (H3).

Unless otherwise indicated, HVR residues and other residues in the variable domain (e.g., FR residues) are numbered herein according to Kabat et al*., supra*.

An "immunoconjugate" is an antibody conjugated to one or more heterologous molecule(s), including but not limited to a cytotoxic agent.

A “subject” or an “individual” is a mammal. Mammals include, but are not limited to, domesticated animals (e.g., cows, sheep, cats, dogs, and horses), primates (e.g., humans and non-human primates such as monkeys), rabbits, and rodents (e.g., mice and rats). In certain embodiments, the subject or individual is a human.

An “isolated” antibody is one which has been separated from a component of its natural environment. In some embodiments, an antibody is purified to greater than 95% or 99% purity as determined by, for example, electrophoretic (e.g., SDS-PAGE, isoelectric focusing (IEF), capillary electrophoresis) or chromatographic (e.g., ion exchange or reverse phase HPLC). For review of methods for assessment of antibody purity, see, e.g., Flatman et al., *J. Chromatogr. B* 848:79-87 (2007).

An “isolated” nucleic acid refers to a nucleic acid molecule that has been separated from a component of its natural environment. An isolated nucleic acid includes a nucleic acid molecule contained in cells that ordinarily contain the nucleic acid molecule, but the nucleic acid molecule is present extrachromosomally or at a chromosomal location that is different from its natural chromosomal location.

“Isolated nucleic acid encoding an anti-CD3 antibody” refers to one or more nucleic acid molecules encoding antibody heavy and light chains (or fragments thereof), including such nucleic acid molecule(s) in a single vector or separate vectors, and such nucleic acid molecule(s) present at one or more locations in a host cell.

The term “monoclonal antibody” as used herein refers to an antibody obtained from a population of substantially homogeneous antibodies, i.e., the individual antibodies comprising the population are identical and/or bind the same epitope, except for possible variant antibodies, e.g., containing naturally occurring mutations or arising during production of a monoclonal antibody preparation, such variants generally being present in minor amounts. In contrast to polyclonal antibody preparations, which typically include different antibodies directed against different determinants (epitopes), each monoclonal antibody of a monoclonal antibody preparation is directed against a single determinant on an antigen. Thus, the modifier “monoclonal” indicates the character of the antibody as being obtained from a substantially homogeneous population of antibodies, and is not to be construed as requiring production of the antibody by any particular method. For example, the monoclonal antibodies to be used in accordance with the present invention may be made by a variety of techniques, including but not limited to the hybridoma method, recombinant DNA methods, phage-display methods, and methods utilizing transgenic animals containing all or part of the human immunoglobulin loci, such methods and other exemplary methods for making monoclonal antibodies being described herein.

A “naked antibody” refers to an antibody that is not conjugated to a heterologous moiety (e.g., a cytotoxic moiety) or radiolabel. The naked antibody may be present in a pharmaceutical formulation.

“Native antibodies” refer to naturally occurring immunoglobulin molecules with varying structures. For example, native IgG antibodies are heterotetrameric glycoproteins of about 150,000 daltons, composed of two identical light chains and two identical heavy chains that are disulfide-bonded. From N- to C-terminus, each heavy chain has a variable region (VH), also called a variable heavy domain or a heavy chain variable domain, followed by three constant domains (CH1, CH2, and CH3). Similarly, from N- to C-terminus, each

light chain has a variable region (VL), also called a variable light domain or a light chain variable domain, followed by a constant light (CL) domain. The light chain of an antibody may be assigned to one of two types, called kappa (κ) and lambda (λ), based on the amino acid sequence of its constant domain.

The term "package insert" is used to refer to instructions customarily included in commercial packages of therapeutic products, that contain information about the indications, usage, dosage, administration, combination therapy, contraindications and/or warnings concerning the use of such therapeutic products.

The term "PD-1 axis binding antagonist" refers to a molecule that inhibits the interaction of a PD-1 axis binding partner with either one or more of its binding partner, so as to remove T-cell dysfunction resulting from signaling on the PD-1 signaling axis – with a result being to restore or enhance T-cell function (e.g., proliferation, cytokine production, target cell killing). As used herein, a PD-1 axis binding antagonist includes a PD-1 binding antagonist, a PD-L1 binding antagonist and a PD-L2 binding antagonist.

The term "PD-1 binding antagonist" refers to a molecule that decreases, blocks, inhibits, abrogates or interferes with signal transduction resulting from the interaction of PD-1 with one or more of its binding partners, such as PD-L1, PD-L2. In some embodiments, the PD-1 binding antagonist is a molecule that inhibits the binding of PD-1 to one or more of its binding partners. In a specific aspect, the PD-1 binding antagonist inhibits the binding of PD-1 to PD-L1 and/or PD-L2. For example, PD-1 binding antagonists include anti-PD-1 antibodies, antigen binding fragments thereof, immunoadhesins, fusion proteins, oligopeptides and other molecules that decrease, block, inhibit, abrogate or interfere with signal transduction resulting from the interaction of PD-1 with PD-L1 and/or PD-L2. In one embodiment, a PD-1 binding antagonist reduces the negative co-stimulatory signal mediated by or through cell surface proteins expressed on T lymphocytes mediated signaling through PD-1 so as render a dysfunctional T-cell less dysfunctional (e.g., enhancing effector responses to antigen recognition). In some embodiments, the PD-1 binding antagonist is an anti-PD-1 antibody. In a specific aspect, a PD-1 binding antagonist is MDX-1106 (nivolumab) described herein. In another specific aspect, a PD-1 binding antagonist is MK-3475 (lambrolizumab) described herein. In another specific aspect, a PD-1 binding antagonist is CT-011 (pidilizumab) described herein. In another specific aspect, a PD-1 binding antagonist is AMP-224 described herein.

The term "PD-L1 binding antagonist" refers to a molecule that decreases, blocks, inhibits, abrogates or interferes with signal transduction resulting from the interaction of PD-L1 with either one or more of its binding partners, such as PD-1, B7-1. In some embodiments, a PD-L1 binding antagonist is a molecule that inhibits the binding of PD-L1 to its binding partners. In a specific aspect, the PD-L1 binding antagonist inhibits binding of PD-L1 to PD-1 and/or B7-1. In some embodiments, the PD-L1 binding antagonists include anti-PD-L1 antibodies, antigen binding fragments thereof, immunoadhesins, fusion proteins, oligopeptides and other molecules that decrease, block, inhibit, abrogate or interfere with signal transduction resulting from the interaction of PD-L1 with one or more of its binding partners, such as PD-1, B7-1. In one embodiment, a PD-L1 binding antagonist reduces the negative co-stimulatory signal mediated by or through cell surface proteins expressed on T lymphocytes mediated signaling through PD-L1 so as to render a dysfunctional T-

cell less dysfunctional (e.g., enhancing effector responses to antigen recognition). In some embodiments, a PD-L1 binding antagonist is an anti-PD-L1 antibody. In a specific aspect, an anti-PD-L1 antibody is YW243.55.S70 described herein. In another specific aspect, an anti-PD-L1 antibody is MDX-1105 described herein. In still another specific aspect, an anti-PD-L1 antibody is MPDL3280A described herein. In still another specific aspect, an anti-PD-L1 antibody is MEDI4736 described herein.

The term "PD-L2 binding antagonist" refers to a molecule that decreases, blocks, inhibits, abrogates or interferes with signal transduction resulting from the interaction of PD-L2 with either one or more of its binding partners, such as PD-1. In some embodiments, a PD-L2 binding antagonist is a molecule that inhibits the binding of PD-L2 to one or more of its binding partners. In a specific aspect, the PD-L2 binding antagonist inhibits binding of PD-L2 to PD-1. In some embodiments, the PD-L2 antagonists include anti-PD-L2 antibodies, antigen binding fragments thereof, immunoadhesins, fusion proteins, oligopeptides and other molecules that decrease, block, inhibit, abrogate or interfere with signal transduction resulting from the interaction of PD-L2 with either one or more of its binding partners, such as PD-1. In one embodiment, a PD-L2 binding antagonist reduces the negative co-stimulatory signal mediated by or through cell surface proteins expressed on T lymphocytes mediated signaling through PD-L2 so as render a dysfunctional T-cell less dysfunctional (e.g., enhancing effector responses to antigen recognition). In some embodiments, a PD-L2 binding antagonist is an immunoadhesin.

The term "protein," as used herein, refers to any native protein from any vertebrate source, including mammals such as primates (e.g. humans) and rodents (e.g., mice and rats), unless otherwise indicated. The term encompasses "full-length," unprocessed protein as well as any form of the protein that results from processing in the cell. The term also encompasses naturally occurring variants of the protein, e.g., splice variants or allelic variants. Proteins according to the invention include, for example, any protein listed in Table 1.

"Percent (%) amino acid sequence identity" with respect to a reference polypeptide sequence is defined as the percentage of amino acid residues in a candidate sequence that are identical with the amino acid residues in the reference polypeptide sequence, after aligning the sequences and introducing gaps, if necessary, to achieve the maximum percent sequence identity, and not considering any conservative substitutions as part of the sequence identity. Alignment for purposes of determining percent amino acid sequence identity can be achieved in various ways that are within the skill in the art, for instance, using publicly available computer software such as BLAST, BLAST-2, ALIGN or Megalign (DNASTAR) software. Those skilled in the art can determine appropriate parameters for aligning sequences, including any algorithms needed to achieve maximal alignment over the full length of the sequences being compared. For purposes herein, however, % amino acid sequence identity values are generated using the sequence comparison computer program ALIGN-2. The ALIGN-2 sequence comparison computer program was authored by Genentech, Inc., and the source code has been filed with user documentation in the U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, where it is registered under U.S. Copyright Registration No. TXU510087. The ALIGN-2 program is publicly available from Genentech, Inc., South San Francisco, California, or may be compiled from the source code. The ALIGN-2 program should be compiled for use on a

UNIX operating system, including digital UNIX V4.0D. All sequence comparison parameters are set by the ALIGN-2 program and do not vary.

In situations where ALIGN-2 is employed for amino acid sequence comparisons, the % amino acid sequence identity of a given amino acid sequence A to, with, or against a given amino acid sequence B (which can alternatively be phrased as a given amino acid sequence A that has or comprises a certain % amino acid sequence identity to, with, or against a given amino acid sequence B) is calculated as follows:

100 times the fraction X/Y

where X is the number of amino acid residues scored as identical matches by the sequence alignment program ALIGN-2 in that program's alignment of A and B, and where Y is the total number of amino acid residues in B. It will be appreciated that where the length of amino acid sequence A is not equal to the length of amino acid sequence B, the % amino acid sequence identity of A to B will not equal the % amino acid sequence identity of B to A. Unless specifically stated otherwise, all % amino acid sequence identity values used herein are obtained as described in the immediately preceding paragraph using the ALIGN-2 computer program.

The term "pharmaceutical formulation" refers to a preparation which is in such form as to permit the biological activity of an active ingredient contained therein to be effective, and which contains no additional components which are unacceptably toxic to a subject to which the formulation would be administered.

A "pharmaceutically acceptable carrier" refers to an ingredient in a pharmaceutical formulation, other than an active ingredient, which is nontoxic to a subject. A pharmaceutically acceptable carrier includes, but is not limited to, a buffer, excipient, stabilizer, or preservative.

As used herein, "treatment" (and grammatical variations thereof such as "treat" or "treating") refers to clinical intervention in an attempt to alter the natural course of the individual being treated, and can be performed either for prophylaxis or during the course of clinical pathology. Desirable effects of treatment include, but are not limited to, preventing occurrence or recurrence of disease, alleviation of symptoms, diminishment of any direct or indirect pathological consequences of the disease, preventing metastasis, decreasing the rate of disease progression, amelioration or palliation of the disease state, and remission or improved prognosis. In some embodiments, antibodies of the invention are used to delay development of a disease or to slow the progression of a disease.

As used herein, "delaying progression" of a disorder or disease means to defer, hinder, slow, retard, stabilize, and/or postpone development of the disease or disorder (e.g., a cell proliferative disorder, e.g., cancer). This delay can be of varying lengths of time, depending on the history of the disease and/or individual being treated. As is evident to one skilled in the art, a sufficient or significant delay can, in effect, encompass prevention, in that the individual does not develop the disease. For example, a late stage cancer, such as development of metastasis, may be delayed.

By "reduce" or "inhibit" is meant the ability to cause an overall decrease, for example, of 20% or greater, of 50% or greater, or of 75%, 85%, 90%, 95%, or greater. In certain embodiments, reduce or inhibit can refer to the effector function of an antibody that is mediated by the antibody Fc region, such effector

functions specifically including complement-dependent cytotoxicity (CDC), antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC), and antibody-dependent cellular phagocytosis (ADCP).

The term "variable region" or "variable domain" refers to the domain of an antibody heavy or light chain that is involved in binding the antibody to antigen. The variable domains of the heavy chain and light chain (VH and VL, respectively) of a native antibody generally have similar structures, with each domain comprising four conserved framework regions (FRs) and three hypervariable regions (HVRs). (See, e.g., Kindt et al. *Kuby Immunology*, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007).) A single VH or VL domain may be sufficient to confer antigen-binding specificity. Furthermore, antibodies that bind a particular antigen may be isolated using a VH or VL domain from an antibody that binds the antigen to screen a library of complementary VL or VH domains, respectively. See, e.g., Portolano et al., *J. Immunol.* 150:880-887 (1993); Clarkson et al., *Nature* 352:624-628 (1991).

The term "vector," as used herein, refers to a nucleic acid molecule capable of propagating another nucleic acid to which it is linked. The term includes the vector as a self-replicating nucleic acid structure as well as the vector incorporated into the genome of a host cell into which it has been introduced. Certain vectors are capable of directing the expression of nucleic acids to which they are operatively linked. Such vectors are referred to herein as "expression vectors."

As used herein, "administering" is meant a method of giving a dosage of a compound (e.g., an anti-CD3 antibody of the invention or a nucleic acid encoding an anti-CD3 antibody of the invention) or a composition (e.g., a pharmaceutical composition, e.g., a pharmaceutical composition including an anti-CD3 antibody of the invention) to a subject. The compositions utilized in the methods described herein can be administered, for example, intramuscularly, intravenously, intradermally, percutaneously, intraarterially, intraperitoneally, intralesionally, intracranially, intraarticularly, intraprostatically, intrapleurally, intratracheally, intranasally, intravitreally, intravaginally, intrarectally, topically, intratumorally, peritoneally, subcutaneously, subconjunctivally, intravesicularlly, mucosally, intrapericardially, intraumbilically, intraocularly, orally, topically, locally, by inhalation, by injection, by infusion, by continuous infusion, by localized perfusion bathing target cells directly, by catheter, by lavage, in cremes, or in lipid compositions. The method of administration can vary depending on various factors (e.g., the compound or composition being administered and the severity of the condition, disease, or disorder being treated).

II. COMPOSITIONS AND METHODS

In one aspect, the invention is based, in part, on anti-CD3 antibodies. In certain embodiments, the anti-CD3 antibodies are multispecific (e.g., bispecific) and bind, in addition to CD3 or a fragment thereof, a second biological molecule (e.g., a cell surface antigen, e.g., a tumor antigen). Antibodies of the invention are useful, for example, for treating or delaying the progression of a cell proliferative disorder (e.g., cancer) or an autoimmune disorder, or for enhancing immune function in a subject having such a disorder.

A. Exemplary Anti-CD3 Antibodies

In one aspect, the invention provides isolated antibodies that bind to CD3 (e.g., CD3ε and/or CD3γ).

For example, in one aspect, the invention provides an anti-CD3 antibody having a binding domain comprising at least one, two, three, four, five, or six hypervariable regions (HVRs) selected from (a) HVR-H1 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1; (b) HVR-H2 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2; (c) HVR-H3 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3; (d) HVR-L1 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 4; (e) HVR-L2 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 5; and (f) HVR-L3 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 6. In some instances, the anti-CD3 antibody comprises at least one (e.g., 1, 2, 3, or 4) of heavy chain framework regions FR-H1, FR-H2, FR-H3, and FR-H4 comprising the sequences of SEQ ID NOs: 301-304, respectively, and/or at least one (e.g., 1, 2, 3, or 4) of the light chain framework regions FR-L1, FR-L2, FR-L3, and FR-L4 comprising the sequences of SEQ ID NOs: 305-308, respectively. In some instances, the anti-CD3 antibody may have a heavy chain variable (VH) domain including an amino acid sequence having at least 90% sequence identity (e.g., at least 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, or 99% sequence identity) to, or the sequence of, SEQ ID NO: 184 and/or a light chain variable (VL) domain comprising an amino acid sequence having at least 90% sequence identity (e.g., at least 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, or 99% sequence identity) to, or the sequence of, SEQ ID NO: 185. In other instances, the anti-CD3 antibody comprises at least one (e.g., 1, 2, 3, or 4) of heavy chain framework regions FR-H1, FR-H2, FR-H3, and FR-H4 comprising the sequences of SEQ ID NOs: 293-296, respectively, and/or at least one (e.g., 1, 2, 3, or 4) of the light chain framework regions FR-L1, FR-L2, FR-L3, and FR-L4 comprising the sequences of SEQ ID NOs: 297-300, respectively. In some instances, the anti-CD3 antibody may have a VH domain comprising an amino acid sequence having at least at least 90% sequence identity (e.g., at least 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, or 99% sequence identity) to, or the sequence of, SEQ ID NO: 186 and/or a VL domain comprising an amino acid sequence having at least 90% sequence identity (e.g., at least 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, or 99% sequence identity) to, or the sequence of, SEQ ID NO: 187. In a particular instance, the anti-CD3 antibody can be 40G5c, or a derivative or clonal relative thereof.

In another aspect, an antibody of the invention comprises (a) a VH domain comprising at least one, at least two, or all three VH HVR sequences selected from (i) HVR-H1 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1, (ii) HVR-H2 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2, and (iii) HVR-H3 comprising an amino acid sequence selected from SEQ ID NO: 3; and (b) a VL domain comprising at least one, at least two, or all three VL HVR sequences selected from (i) HVR-L1 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 4, (ii) HVR-L2 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 5, and (iii) HVR-L3 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 6. In some instances, the anti-CD3 antibody may have a VH domain comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 184 and a VL domain comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 185. In some instances, the anti-CD3 antibody may have a VH domain comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 186 and a VL domain comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 187. In a particular instance, the anti-CD3 antibody can be 40G5c, or a derivative or clonal relative thereof.

In any of the above embodiments, an anti-CD3 antibody is humanized. In one embodiment, an anti-CD3 antibody comprises HVRs as in any of the above embodiments, and further comprises an acceptor human framework, e.g., a human immunoglobulin framework or a human consensus framework.

In another aspect, an anti-CD3 antibody is provided, wherein the antibody comprises a VH as in any of the embodiments provided above, and a VL as in any of the embodiments provided above, wherein one or both of the variable domain sequences include post-translational modifications.

In a further aspect, the invention provides an antibody that binds to the same epitope as an anti-CD3 antibody provided herein. For example, in certain embodiments, an antibody is provided that binds to the same epitope as an anti-CD3 antibody comprising a VH sequence of SEQ ID NO: 184 and a VL sequence of SEQ ID NO: 185. In certain embodiments, an antibody is provided that binds to an epitope within a fragment of CD3 (e.g., human CD3ε) consisting of amino acids 1-26 (SEQ ID NO: 283) or 1-27 (SEQ ID NO: 278) of human CD3ε.

In another aspect, the invention provides an antibody that binds a unique CD3 epitope. In certain embodiments, the anti-CD3 antibody of the invention makes unique contacts with amino acids of human CD3ε at a distance of 3.5 Angstroms, 3.25 Angstroms, 3.00 Angstroms, 2.75 Angstroms, or less. In certain embodiments, an antibody is provided that binds to an epitope consisting of one, two, three, four, or five amino acids of human CD3ε at a distance of 3.5 Angstroms, 3.25 Angstroms, 3.00 Angstroms, 2.75 Angstroms or less. In one embodiment, the anti-CD3 antibody of the invention makes unique contacts with amino acids of human CD3ε at a distance of 3.5 Angstroms or less. In certain embodiments, an antibody is provided that binds to an epitope consisting of one, two, three, four, or five amino acids of human CD3ε at a distance of 3.5 Angstroms or less. For example, in certain embodiments, an antibody is provided that binds to an epitope consisting of amino acids of human CD3ε selected from Gln1, Asp2, Asn4, Glu6, and Met7. In one particular embodiment, the anti-CD3 antibody binds to an epitope that specifically includes Glu6. In certain other embodiments, an antibody is provided that does not bind to an epitope that includes human CD3ε amino acid Glu5. In certain other embodiments, an antibody is provided that does not bind to an epitope that includes human CD3ε amino acids Gly3 and Glu5.

An anti-CD3 epitope may be determined by anti-CD3 antibody binding to peptide fragments of the epitope. Alternatively, an anti-CD3 epitope may be determined by alanine scanning mutagenesis. In one embodiment, a reduction in binding of an anti-CD3 antibody to mutated CD3 by 20%, 30%, 50%, 80% or more indicates the amino acid residue of CD3 mutated in an alanine scanning mutagenesis assay is an epitope residue for that anti-CD3 antibody. Alternatively, an anti-CD3 epitope may be determined by mass spectrometry. In some embodiments, the epitope is determined by crystallography (e.g., crystallography methods described in the Examples).

In some embodiments, the epitope as determined by crystallography is determined using amino acids Q1-M7 of CD3. In some embodiments, the epitope as determined by crystallography is determined using amino acids QDGNEEMGGITQTPYK (SEQ ID NO: 284) of CD3.

In some embodiments, the epitope as determined by crystallography may be performed by combining the anti-CD3 antibody Fab, dissolved in 0.15 M NaCl, 25mM tris, pH 7.5 at 10 mg/ml, with a 2-fold

molar excess (1 mg) of CD3ε peptide and initially screening a sparse matrix of precipitants in a sitting drop vapor diffusion format. Optimized crystals may be grown from a 1:1 mixture with reservoir solution containing 70% v/v methyl-pentanediol, and 0.1 M HEPES buffer at pH 7.5. The reservoir may be be used as a cryoprotectant. The crystals may be transferred to cryogenic temperature by sudden immersion into liquid nitrogen.

The diffraction data for crystals may be collected at Advanced Photon Source beam line 22ID, using a MAR300 CCD detector. The recorded diffractions may be integrated and scaled using the program HKL2000.

The structure may be phased by molecular replacement (MR) method using program Phaser. For example, the MR search model is a Fab subunit derived from a crystal structure of HGFA/Fab complex (PDB code: 2R0L). The CD3ε peptide is built into the structure based on a Fo-Fc map. The structure may be subsequently refined with programs REFMAC5 and PHENIX using the maximum likelihood target functions, anisotropic individual B-factor refinement method, and TLS refinement method, to achieve convergence.

In certain other embodiments, an antibody is provided that includes a paratope that binds to the same epitope as an anti-CD3 antibody provided herein. For example, in certain embodiments an antibody is provided that binds to the same epitope as an anti-CD3 antibody paratope comprising amino acids that form contacts at a distance of 3.5 Angstroms or less. In certain embodiments, an antibody is provided that binds to the same epitope as an anti-CD3 antibody paratope consisting of amino acids of the VH region of an anti-CD3 antibody selected from the group comprising 33Tyr, 35His, 50Trp, 97Tyr, and 98Ser. In certain embodiments, an antibody is provided that binds to the same epitope as an anti-CD3 antibody paratope consisting of one, two, three, four, or five amino acids of the VH region of an anti-CD3 antibody selected from the group comprising 33Tyr, 35His, 50Trp, 97Tyr, and 98Ser. In certain embodiments, an antibody is provided that binds to the same epitope as an anti-CD3 antibody paratope consisting of amino acids of the VL region of an anti-CD3 antibody selected from the group comprising 27Arg, 27Asn, 30Lys, 32Tyr, 92Phe, 94Leu, and 96Arg. In certain embodiments, an antibody is provided that binds to the same epitope as an anti-CD3 antibody paratope consisting of one, two, three, four, five, six, or seven amino acids of the VL region of an anti-CD3 antibody selected from the group comprising 27Arg, 27Asn, 30Lys, 32Tyr, 92Phe, 94Leu, and 96Arg. In an optional embodiment, an antibody is provided that does not bind to the same epitope as an anti-CD3 antibody paratope consisting of amino acids of the VL region comprising 91Ser. In a further aspect of the invention, an anti-CD3 antibody according to any of the above embodiments is a monoclonal antibody, comprising a chimeric, humanized, or human antibody. In one embodiment, an anti-CD3 antibody is an antibody fragment, for example, a Fv, Fab, Fab', scFv, diabody, or $F(ab')_2$ fragment. In another embodiment, the antibody is a full length antibody, e.g., an intact IgG antibody (e.g., an intact IgG1 antibody) or other antibody class or isotype as defined herein.

In a further aspect, an anti-CD3 antibody according to any of the above embodiments may incorporate any of the features, singly or in combination, as described in Sections 1-7 below.

1. Antibody Affinity

In certain embodiments, an antibody provided herein has a dissociation constant (Kd) of ≤ 1μM, ≤ 100 nM, ≤ 10 nM, ≤ 1 nM, ≤ 0.1 nM, ≤ 0.01 nM, or ≤ 0.001 nM (e.g., 10^{-8} M or less, e.g., from 10^{-8} M to 10^{-13} M, e.g., from 10^{-9} M to 10^{-13} M).

In one embodiment, Kd is measured by a radiolabeled antigen binding assay (RIA). In one embodiment, an RIA is performed with the Fab version of an antibody of interest and its antigen. For example, solution binding affinity of Fabs for antigen is measured by equilibrating Fab with a minimal concentration of (^{125}I)-labeled antigen in the presence of a titration series of unlabeled antigen, then capturing bound antigen with an anti-Fab antibody-coated plate (see, e.g., Chen et al., *J. Mol. Biol.* 293:865-881(1999)). To establish conditions for the assay, MICROTITER® multi-well plates (Thermo Scientific) are coated overnight with 5 μg/ml of a capturing anti-Fab antibody (Cappel Labs) in 50 mM sodium carbonate (pH 9.6), and subsequently blocked with 2% (w/v) bovine serum albumin in PBS for two to five hours at room temperature (approximately 23°C). In a non-adsorbent plate (Nunc #269620), 100 pM or 26 pM [^{125}I]-antigen are mixed with serial dilutions of a Fab of interest (e.g., consistent with assessment of the anti-VEGF antibody, Fab-12, in Presta et al., *Cancer Res.* 57:4593-4599 (1997)). The Fab of interest is then incubated overnight; however, the incubation may continue for a longer period (e.g., about 65 hours) to ensure that equilibrium is reached. Thereafter, the mixtures are transferred to the capture plate for incubation at room temperature (e.g., for one hour). The solution is then removed and the plate washed eight times with 0.1% polysorbate 20 (TWEEN-20®) in PBS. When the plates have dried, 150 μl/well of scintillant (MICROSCINT-20™; Packard) is added, and the plates are counted on a TOPCOUNT™ gamma counter (Packard) for ten minutes. Concentrations of each Fab that give less than or equal to 20% of maximal binding are chosen for use in competitive binding assays.

According to another embodiment, Kd is measured using a BIACORE® surface plasmon resonance assay. For example, an assay using a BIACORE®-2000 or a BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) is performed at 25°C with immobilized antigen CM5 chips at ~10 response units (RU). In one embodiment, carboxymethylated dextran biosensor chips (CM5, BIACORE, Inc.) are activated with *N*-ethyl-*N'*- (3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride (EDC) and *N*-hydroxysuccinimide (NHS) according to the supplier's instructions. Antigen is diluted with 10 mM sodium acetate, pH 4.8, to 5 μg/ml (~0.2 μM) before injection at a flow rate of 5 μl/minute to achieve approximately 10 response units (RU) of coupled protein. Following the injection of antigen, 1 M ethanolamine is injected to block unreacted groups. For kinetics measurements, two-fold serial dilutions of Fab (0.78 nM to 500 nM) are injected in PBS with 0.05% polysorbate 20 (TWEEN-20™) surfactant (PBST) at 25°C at a flow rate of approximately 25 μl/min. Association rates (k_{on}) and dissociation rates (k_{off}) are calculated using a simple one-to-one Langmuir binding model (BIACORE® Evaluation Software version 3.2) by simultaneously fitting the association and dissociation sensorgrams. The equilibrium dissociation constant (Kd) is calculated as the ratio k_{on}/k_{off}. See, for example, Chen et al., *J. Mol. Biol.* 293:865-881 (1999). If the on-rate exceeds $10^6 M^{-1}s^{-1}$ by the surface plasmon resonance assay above, then the on-rate can be determined by using a fluorescent quenching

technique that measures the increase or decrease in fluorescence emission intensity (excitation = 295 nm; emission = 340 nm, 16 nm band-pass) at 25°C of a 20 nM anti-antigen antibody (Fab form) in PBS, pH 7.2, in the presence of increasing concentrations of antigen as measured in a spectrometer, such as a stop-flow equipped spectrophometer (Aviv Instruments) or a 8000-series SLM-AMINCO ™ spectrophotometer (ThermoSpectronic) with a stirred cuvette.

2. Antibody Fragments

In certain embodiments, an antibody provided herein is an antibody fragment. Antibody fragments include, but are not limited to, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')$_2$, Fv, and scFv fragments, and other fragments described below. For a review of certain antibody fragments, see Hudson et al. *Nat. Med.* 9:129-134 (2003). For a review of scFv fragments, see, e.g., Pluckthün, in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York), pp. 269-315 (1994); see also WO 93/16185; and U.S. Patent Nos. 5,571,894 and 5,587,458. For discussion of Fab and F(ab')$_2$ fragments comprising salvage receptor binding epitope residues and having increased *in vivo* half-life, see U.S. Patent No. 5,869,046.

Diabodies are antibody fragments with two antigen-binding sites that may be bivalent or bispecific. See, for example, EP 404,097; WO 1993/01161; Hudson et al. *Nat. Med.* 9:129-134 (2003); and Hollinger et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993). Triabodies and tetrabodies are also described in Hudson et al. *Nat. Med.* 9:129-134 (2003).

Single-domain antibodies are antibody fragments comprising all or a portion of the heavy chain variable domain or all or a portion of the light chain variable domain of an antibody. In certain embodiments, a single-domain antibody is a human single-domain antibody (Domantis, Inc., Waltham, MA; see, e.g., U.S. Patent No. 6,248,516 B1).

Antibody fragments can be made by various techniques, including but not limited to proteolytic digestion of an intact antibody as well as production by recombinant host cells (e.g. *E. coli* or phage), as described herein.

3. Chimeric and Humanized Antibodies

In certain embodiments, an antibody provided herein is a chimeric antibody. Certain chimeric antibodies are described, e.g., in U.S. Patent No. 4,816,567; and Morrison et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)). In one example, a chimeric antibody comprises a non-human variable region (e.g., a variable region derived from a mouse, rat, hamster, rabbit, or non-human primate, such as a monkey) and a human constant region. In a further example, a chimeric antibody is a "class switched" antibody in which the class or subclass has been changed from that of the parent antibody. Chimeric antibodies include antigen-binding fragments thereof.

In certain embodiments, a chimeric antibody is a humanized antibody. Typically, a non-human antibody is humanized to reduce immunogenicity to humans, while retaining the specificity and affinity of the

parental non-human antibody. Generally, a humanized antibody comprises one or more variable domains in which HVRs, e.g., CDRs, (or portions thereof) are derived from a non-human antibody, and FRs (or portions thereof) are derived from human antibody sequences. A humanized antibody optionally will also comprise at least a portion of a human constant region. In some embodiments, some FR residues in a humanized antibody are substituted with corresponding residues from a non-human antibody (e.g., the antibody from which the HVR residues are derived), e.g., to restore or improve antibody specificity or affinity.

Humanized antibodies and methods of making them are reviewed, e.g., in Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008), and are further described, e.g., in Riechmann et al*., Nature* 332:323-329 (1988); Queen et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86:10029-10033 (1989); US Patent Nos. 5, 821,337, 7,527,791, 6,982,321, and 7,087,409; Kashmiri *et al*., *Methods* 36:25-34 (2005) (describing specificity determining region (SDR) grafting); Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489-498 (1991) (describing "resurfacing"); Dall'Acqua et al., *Methods* 36:43-60 (2005) (describing "FR shuffling"); and Osbourn et al., *Methods* 36:61-68 (2005) and Klimka et al., *Br. J. Cancer*, 83:252-260 (2000) (describing the "guided selection" approach to FR shuffling).

Human framework regions that may be used for humanization include but are not limited to: framework regions selected using the "best-fit" method (see, e.g., Sims et al. *J. Immunol.* 151:2296 (1993)); framework regions derived from the consensus sequence of human antibodies of a particular subgroup of light or heavy chain variable regions (see, e.g., Carter et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); and Presta et al. *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)); human mature (somatically mutated) framework regions or human germline framework regions (see, e.g., Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)); and framework regions derived from screening FR libraries (see, e.g., Baca et al., *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684 (1997) and Rosok et al., *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618 (1996)).

4. Human Antibodies

In certain embodiments, an antibody provided herein is a human antibody. Human antibodies can be produced using various techniques known in the art. Human antibodies are described generally in van Dijk and van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5: 368-74 (2001) and Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20:450-459 (2008).

Human antibodies may be prepared by administering an immunogen to a transgenic animal that has been modified to produce intact human antibodies or intact antibodies with human variable regions in response to antigenic challenge. Such animals typically contain all or a portion of the human immunoglobulin loci, which replace the endogenous immunoglobulin loci, or which are present extrachromosomally or integrated randomly into the animal's chromosomes. In such transgenic mice, the endogenous immunoglobulin loci have generally been inactivated. For review of methods for obtaining human antibodies from transgenic animals, see Lonberg, *Nat. Biotech.* 23:1117-1125 (2005). See also, e.g., U.S. Patent Nos. 6,075,181 and 6,150,584 describing XENOMOUSE™ technology; U.S. Patent No. 5,770,429 describing HUMAB® technology; U.S. Patent No. 7,041,870 describing K-M MOUSE® technology, and U.S. Patent Application Publication No. US 2007/0061900, describing VELOCIMOUSE® technology). Human variable

regions from intact antibodies generated by such animals may be further modified, e.g., by combining with a different human constant region.

Human antibodies can also be made by hybridoma-based methods. Human myeloma and mouse-human heteromyeloma cell lines for the production of human monoclonal antibodies have been described. (See, e.g., Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); and Boerner et al., *J. Immunol.*, 147: 86 (1991).) Human antibodies generated via human B-cell hybridoma technology are also described in Li et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006). Additional methods include those described, for example, in U.S. Patent No. 7,189,826 (describing production of monoclonal human IgM antibodies from hybridoma cell lines) and Ni, *Xiandai Mianyixue*, 26(4):265-268 (2006) (describing human-human hybridomas). Human hybridoma technology (Trioma technology) is also described in Vollmers and Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005) and Vollmers and Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3):185-91 (2005).

Human antibodies may also be generated by isolating Fv clone variable domain sequences selected from human-derived phage display libraries. Such variable domain sequences may then be combined with a desired human constant domain. Techniques for selecting human antibodies from antibody libraries are described below.

5. Library-Derived Antibodies

Antibodies of the invention may be isolated by screening combinatorial libraries for antibodies with the desired activity or activities. For example, a variety of methods are known in the art for generating phage display libraries and screening such libraries for antibodies possessing the desired binding characteristics. Such methods are reviewed, e.g., in Hoogenboom et al. in *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) and further described, e.g., in the McCafferty et al., *Nature* 348:552-554; Clackson et al., *Nature* 352: 624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Marks and Bradbury, in *Methods in Molecular Biology* 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004); and Lee et al., *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132(2004).

In certain phage display methods, repertoires of VH and VL genes are separately cloned by polymerase chain reaction (PCR) and recombined randomly in phage libraries, which can then be screened for antigen-binding phage as described in Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Phage typically display antibody fragments, either as single-chain Fv (scFv) fragments or as Fab fragments. Libraries from immunized sources provide high-affinity antibodies to the immunogen without the requirement of constructing hybridomas. Alternatively, the naive repertoire can be cloned (e.g., from human) to provide a single source of antibodies to a wide range of non-self and also self antigens without any immunization as described by Griffiths et al., *EMBO J,* 12: 725-734 (1993). Finally, naive libraries can also be made synthetically by cloning unrearranged V-gene segments from stem cells, and using PCR primers containing

random sequence to encode the highly variable CDR3 regions and to accomplish rearrangement *in vitro*, as described by Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992). Patent publications describing human antibody phage libraries include, for example: US Patent No. 5,750,373, and US Patent Publication Nos. 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936, and 2009/0002360.

Antibodies or antibody fragments isolated from human antibody libraries are considered human antibodies or human antibody fragments herein.

6. Multispecific Antibodies

In any one of the above aspects, the anti-CD3 antibody provided herein is a multispecific antibody, for example, a bispecific antibody. Multispecific antibodies are monoclonal antibodies that have binding specificities for at least two different sites. In certain embodiments, bispecific antibodies may bind to two different epitopes of CD3 (e.g., CD3ε or CD3γ). In certain embodiments, one of the binding specificities is for CD3 (e.g., CD3ε or CD3γ) and the other is for any other antigen (e.g., a second biological molecule, e.g., a cell surface antigen, e.g., a tumor antigen). Accordingly, a bispecific anti-CD3 antibody may have binding specificities for CD3 and a second biological molecule, such as a second biological molecule (e.g., a tumor antigen) listed in Table 1 and described in U.S. Pub. No. 2010/0111856.

TABLE 1. Tumor antigen targets of the bispecific anti-CD3 antibodies of the invention

CD20	CD79a	ETBR	IL13Ralpha2	M-CSF	P2X5	SSX-2
0772P	CD79b	ETV6-AML1 fusion protein	IL20Rα	MCSP	p53	SSX-4
adipophilin	Cdc27	EZH2	Intestinal carboxyl esterase	mdm-2	PAP	STEAP1
AIM-2	CDK4	FcRH1	IRTA2	MDP	PAX5	STEAP1
ALDH1A1	CDKN2A	FcRH2	Kallikrein 4	ME1	PBF	STEAP2
alpha-actinin-4	CEA	FcRH5	KIF20A	Melan-A / MART-1	PMEL17	survivin
alpha-foetoprotein	CLL1	FLT3-ITD	KK-LC-1	Meloe	pml-RARalpha fusion protein	SYT-SSX1 or -SSX2 fusion protein
Amphiregulin	CLPP	FN1	KM-HN-1	MMP-2	PRAME	TAG-1
ARTC1	COA-1	G250 / MN / CAIX	K-ras	MMP-7	PRDX5	TAG-2

ASLG659	CPSF	GAGE-1,2,8	LAGE-1	MPF	PSCA	Telomerase
ASPHD1	CRIPTO	GAGE-3,4,5,6,7	LDLR-fucosyltransferaseASfusion protein	MRP4	PSCA hlg	TENB2
B7-H4	Cw6	GDNF-Ra1	Lengsin	MSG783	PSMA	TGF-betaRII
BAFF-R	CXCR5	GEDA	LGR5	MUC1	PTPRK	TMEFF1
BAGE-1	CXORF61	GFRA1	LY64	MUC5AC	RAB38 / NY-MEL-1	TMEM118
BCLX (L)	cyclin D1	glypican-3	Ly6E	mucin	RAGE-1	TMEM46
BCR-ABL fusion protein (b3a2)	Cyclin-A1	GnTVf	Ly6G6D	MUM-1f	RBAF600	TRAG-3
beta-catenin	dek-can fusion protein	gp100 / Pmel17	LY6K	MUM-2	RET	Triosephosphate isomerase
BING-4	DKK1	GPC3	LYPD1	MUM-3	RGS5	TRP-1 / gp75
B-RAF	DR1	GPNMB	MAGE-A1	Myosin class I	RhoC	TRP-2
Brevican	DR13	GPR172A	MAGE-A10	NA88-A	RNF43	TRP2-INT2
CALCA	E16	GPR19	MAGE-A12	Napi2b	RNF43	TrpM4
CASP-5	EDAR	GPR54	MAGE-A2	NCA	RU2AS	Tyrosinase
CASP-8	EFTUD2	HAVCR1	MAGE-A3	neo-PAP	SAGE	tyrosinase
CD19	Elongation factor 2	HER2	MAGE-A4	NFYC	secernin 1	VEGF
CD21	ENAH (hMena)	HER-2 / neu	MAGE-A6	N-ras	Sema 5b	WT1
CD22	EpCAM	HERV-K-MEL	MAGE-A9	NY-BR-1	SIRT2	XAGE-1b/GAGED2a
CD33	EphA3	HLA-DOB	MAGE-C1	NY-ESO-1/LAGE-2	SLC35D3	EGFR-T790M;
CD45	EphB2R	hsp70-2	MAGE-C2	OA1	SNRPD1	BMPR1B
CD70	Epiregulin	IDO1	mammaglobin-A	OGT	SOX10	

CD72	EGFR	IGF2B3	MART2	OS-9	Sp17	
EGFR-G719A	EGFR-G719C;	EGFR-G719S;	EGFR-L858R	EGFR-S768I	EGFR-L861Q	

The bispecific anti-CD3 antibody (e.g., any one of the anti-CD3 antibodies described above) may have binding specificities for CD3 and a second biological molecule such as a human leukocyte antigen (HLA)-peptide complex presented on the cell surface by MHC. The bispecific anti-CD3 antibody (e.g., any one of the anti-CD3 antibodies described above) may have binding specificities for CD3 and a second biological molecule comprising a HLA-peptide complex selected from the group consisiting of 0772P (CA125, MUC16; Genbank accession no. AF36148); adipophilin (perilipin-2, Adipose differentiation-related protein, ADRP, ADFP, MGC10598; NCBI Reference Sequence: NP_001113.2); AIM-2 (Absent In Melanoma 2, PYHIN4, Interferon-Inducible Protein AIM2; NCBI Reference Sequence: NP_004824.1); ALDH1A1 (Aldehyde Dehydrogenase 1 Family, Member A1, ALDH1, PUMB1, Retinaldehyde Dehydrogenase 1, ALDC, ALDH-E1, ALHDII, RALDH 1, EC 1.2.1.36, ALDH11, HEL-9, HEL-S-53e, HEL12, RALDH1, Acetaldehyde Dehydrogenase 1, Aldehyde Dehydrogenase 1, Soluble, Aldehyde Dehydrogenase, Liver Cytosolic, ALDH Class 1, Epididymis Luminal Protein 12, Epididymis Luminal Protein 9, Epididymis Secretory Sperm Binding Protein Li 53e, Retinal Dehydrogenase 1, RalDH1, Aldehyde Dehydrogenase Family 1 Member A1, Aldehyde Dehydrogenase, Cytosolic, EC 1.2.1; NCBI Reference Sequence: NP_000680.2); alpha-actinin-4 (ACTN4, Actinin, Alpha 4, FSGS1, Focal Segmental Glomerulosclerosis 1, Non-Muscle Alpha-Actinin 4, F-Actin Cross-Linking Protein, FSGS, ACTININ-4, Actinin Alpha4 Isoform, alpha-actinin-4; NCBI Reference Sequence: NP_004915.2); alpha-fetoprotein (AFP, HPAFP, FETA, alpha-1-fetoprotein, alpha-fetoglobulin, Alpha-1-fetoprotein, Alpha-fetoglobulin, HP; GenBank: AAB58754.1); Amphiregulin (AREG, SDGF, Schwannoma-Derived Growth Factor, Colorectum Cell-Derived Growth Factor, AR, CRDGF; GenBank: AAA51781.1); ARTC1 (ART1, ADP-Ribosyltransferase 1, Mono(ADP-Ribosyl)Transferase 1, ADP-Ribosyltransferase C2 And C3 Toxin-Like 1, ART2, CD296, RT6, ADP-Ribosyltransferase 2, GPI-Linked NAD(P)(+)--Arginine ADP-Ribosyltransferase 1, EC 2.4.2.31, CD296 Antigen; NP); ASLG659; ASPHD1 (Aspartate Beta-Hydroxylase Domain Containing 1, Aspartate Beta-Hydroxylase Domain-Containing Protein 1, EC 1.14.11.-, EC 1.14.11; GenBank: AAI44153.1); B7-H4 (VTCN1, V-Set Domain Containing T Cell Activation Inhibitor 1, B7H4, B7 Superfamily Member 1, Immune Costimulatory Protein B7-H4, B7h.5, T-Cell Costimulatory Molecule B7x, B7S1, B7X, VCTN1, H4, B7 Family Member, PRO1291, B7 Family Member, H4, T Cell Costimulatory Molecule B7x, V-Set Domain-Containing T-Cell Activation Inhibitor 1, Protein B7S1; GenBank: AAZ17406.1); BAFF-R (TNFRSF13C, Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily, Member 13C, BAFFR, B-Cell-Activating Factor Receptor, BAFF Receptor, BLyS Receptor 3, CVID4, BROMIX, CD268, B Cell-Activating Factor Receptor, prolixin, Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily Member 13C, BR3, CD268 Antigen; NCBI Reference Sequence: NP_443177.1); BAGE-1 ; BCLX (L); BCR-ABL fusion protein (b3a2) ; beta-catenin (CTNNB1, Catenin (Cadherin-Associated Protein), Beta 1, 88kDa, CTNNB, MRD19, Catenin (Cadherin-Associated Protein), Beta 1 (88kD), armadillo, Catenin Beta-1; GenBank: CAA61107.1); BING-4 (WDR46, WD Repeat Domain 46, C6orf11, BING4, WD Repeat-Containing Protein BING4, Chromosome 6

Open Reading Frame 11, FP221, UTP7, WD Repeat-Containing Protein 46; NP); BMPR1B (bone morphogenetic protein receptor-type IB, Genbank accession no. NM_00120; NP); B-RAF (Brevican (BCAN, BEHAB, Genbank accession no. AF22905); Brevican (BCAN, Chondroitin Sulfate Proteoglycan 7, Brain-Enriched Hyaluronan-Binding Protein, BEHAB, CSPG7, Brevican Proteoglycan, Brevican Core Protein, Chondroitin Sulfate Proteoglycan BEHAB; GenBank: AAH27971.1); CALCA (Calcitonin-Related Polypeptide Alpha, CALC1, Calcitonin 1, calcitonin, Alpha-Type CGRP, Calcitonin Gene-Related Peptide I, CGRP-I, CGRP, CGRP1, CT, KC, Calcitonin/Calcitonin-Related Polypeptide, Alpha, katacalcin; NP); CASP-5 (CASP5, Caspase 5, Apoptosis-Related Cysteine Peptidase, Caspase 5, Apoptosis-Related Cysteine Protease, Protease ICH-3, Protease TY, ICE(rel)-III, ICE(rel)III, ICEREL-III, ICH-3, caspase-5, TY Protease, EC 3.4.22.58, ICH3, EC 3.4.22; NP); CASP-8 ; CD19 (CD19 - B-lymphocyte antigen CD19 isoform 2 precursor , B4,CVID3 [Homo sapiens], NCBI Reference Sequence: NP_001761.3); CD20 (CD20 - B-lymphocyte antigen CD20, membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 1, B1,Bp35,CD20,CVID5,LEU-16,MS4A2,S7; NCBI Reference Sequence: NP_690605.1); CD21 (CD21 (CR2 (Complement receptor or C3DR (C3d/Epstein Barr virus receptor) or Hs.73792 Genbank accession no. M2600); (CD22 (B-cell receptor CD22-B isoform, BL-CAM, Lyb-8, Lyb8, SIGLEC-2, FLJ22814, Genbank accession No. AK02646); CD22; CD33 (CD33 Molecule, CD33 Antigen (Gp67), Sialic Acid Binding Ig-Like Lectin 3, Sialic Acid-Binding Ig-Like Lectin 3, SIGLEC3, gp67, SIGLEC-3, Myeloid Cell Surface Antigen CD33, p67, Siglec-3, CD33 Antigen; GenBank: AAH28152.1); CD45; CD70 (CD70 - tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 7; surface antigen CD70; Ki-24 antigen; CD27 ligand; CD27-L; tumor necrosis factor ligand superfamily member 7; NCBI Reference Sequence for species homo sapiens: NP_001243.1); CD72 (CD72 (B-cell differentiation antigen CD72, Lyb-; 359 aa, pI: 8.66, MW: 40225, TM: 1 [P] Gene Chromosome: 9p13.3, Genbank accession No. NP_001773.); CD79a (CD79a (CD79A, CD79a, immunoglobulin-associated alpha, a B cell-specific protein that covalently interacts with Ig beta (CD79B) and forms a complex on the surface with Ig M molecules, transduces a signal involved in B-cell differentiation), pI: 4.84, MW: 25028 TM: 2 [P] Gene Chromosome: 19q13.2, Genbank accession No. NP_001774.1); CD79b (CD79b (CD79B, CD79b, IGb (immunoglobulin-associated beta), B29, Genbank accession no. NM_000626 or 1103867); Cdc27 (Cell Division Cycle 27, D0S1430E, D17S978E, Anaphase Promoting Complex Subunit 3, Anaphase-Promoting Complex Subunit 3, ANAPC3, APC3, CDC27Hs, H-NUC, CDC27 Homolog, Cell Division Cycle 27 Homolog (S. Cerevisiae), HNUC, NUC2, Anaphase-Promoting Complex, Protein 3, Cell Division Cycle 27 Homolog, Cell Division Cycle Protein 27 Homolog, Nuc2 Homolog; GenBank: AAH11656.1); CDK4 (Cyclin-Dependent Kinase 4, Cell Division Protein Kinase 4, PSK-J3, EC 2.7.11.22, CMM3, EC 2.7.11; NCBI Reference Sequence: NP_000066.1); CDKN2A (Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A, MLM, CDKN2, MTS1, Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A (Melanoma, P16, Inhibits CDK4), Cyclin-Dependent Kinase 4 Inhibitor A, Multiple Tumor Suppressor 1, CDK4I, MTS-1, CMM2, P16, ARF, INK4, INK4A, P14, P14ARF, P16-INK4A, P16INK4, P16INK4A, P19, P19ARF, TP16, CDK4 Inhibitor P16-INK4, Cell Cycle Negative Regulator Beta, p14ARF, p16-INK4, p16-INK4a, p16INK4A, p19ARF; NP); CEA; CLL1 (CLL-1 (CLEC12A, MICL, and DCAL, encodes a member of the C-type lectin/C-type lectin-like domain (CTL/CTLD) superfamily. Members of this family share a common protein fold and have diverse functions, such as cell adhesion, cell-cell signaling, glycoprotein

turnover, and roles in inflammation and immune response. The protein encoded by this gene is a negative regulator of granulocyte and monocyte function. Several alternatively spliced transcript variants of this gene have been described, but the full-length nature of some of these variants has not been determined. This gene is closely linked to other CTL/CTLD superfamily members in the natural killer gene complex region on chromosome 12p13 (Drickamer K *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9):585–90; van Rhenen A, et al., *Blood* 110):2659–66; Chen CH, et al. *Blood* 107):1459–67; Marshall AS, et al. *Eur. J. Immunol*. 36):2159–69; Bakker AB, et al *Cancer Res*. 64 :8443–50; Marshall AS, et al *J. Biol. Chem*. 279 :14792–80. CLL-1 has been shown to be a type II transmembrane receptor comprising a single C-type lectin-like domain (which is not predicted to bind either calcium or sugar), a stalk region, a transmembrane domain and a short cytoplasmic tail containing an ITIM motif.); CLPP (Caseinolytic Mitochondrial Matrix Peptidase Proteolytic Subunit, Endopeptidase Clp, EC 3.4.21.92, PRLTS3, ATP-Dependent Protease ClpAP (E. Coli), ClpP (Caseinolytic Protease, ATP-Dependent, Proteolytic Subunit, E. Coli) Homolog, ClpP Caseinolytic Peptidase, ATP-Dependent, Proteolytic Subunit Homolog (E. Coli), ClpP Caseinolytic Protease, ATP-Dependent, Proteolytic Subunit Homolog (E. Coli), human, Proteolytic Subunit, ATP-Dependent Protease ClpAP, Proteolytic Subunit, Human, ClpP Caseinolytic Peptidase ATP-Dependent, Proteolytic Subunit, ClpP Caseinolytic Peptidase, ATP-Dependent, Proteolytic Subunit Homolog, ClpP Caseinolytic Protease, ATP-Dependent, Proteolytic Subunit Homolog, Putative ATP-Dependent Clp Protease Proteolytic Subunit, Mitochondrial; NP); COA-1; CPSF; CRIPTO (CRIPTO (CR, CR1, CRGF, CRIPTO, TDGF1, teratocarcinoma-derived growth factor, Genbank accession no. NP_003203 or NM_00321); Cw6; CXCR5 CXCR5 (Burkitt's lymphoma receptor 1, a G protein-coupled receptor that is activated by the CXCL13 chemokine, functions in lymphocyte migration and humoral defense, plays a role in HIV-2 infection and perhaps development of AIDS, lymphoma, myeloma, and leukemia); 372 aa, pI: 8.54 MW: 41959 TM: 7 [P] Gene Chromosome: 11q23.3, Genbank accession No. NP_001707.); CXORF61 CXORF61 - chromosome X open reading frame 61[Homo sapiens], NCBI Reference Sequence: NP_001017978.1); cyclin D1 (CCND1, BCL1, PRAD1, D11S287E, B-Cell CLL/Lymphoma 1, B-Cell Lymphoma 1 Protein, BCL-1 Oncogene, PRAD1 Oncogene, Cyclin D1 (PRAD1: Parathyroid Adenomatosis 1), G1/S-Specific Cyclin D1, Parathyroid Adenomatosis 1, U21B31, G1/S-Specific Cyclin-D1, BCL-1; NCBI Reference Sequence: NP_444284.1); Cyclin-A1 (CCNA1, CT146, Cyclin A1; GenBank: AAH36346.1); dek-can fusion protein ; DKK1 (Dickkopf WNT Signaling Pathway Inhibitor 1, SK, hDkk-1, Dickkopf (Xenopus Laevis) Homolog 1, Dickkopf 1 Homolog (Xenopus Laevis), DKK-1, Dickkopf 1 Homolog, Dickkopf Related Protein-1, Dickkopf-1 Like, Dickkopf-Like Protein 1, Dickkopf-Related Protein 1, Dickkopf-1, Dkk-1; GenBank: AAQ89364.1); DR1 (Down-Regulator Of Transcription 1, TBP-Binding (Negative Cofactor 2), Negative Cofactor 2-Beta, TATA-Binding Protein-Associated Phosphoprotein, NC2, NC2-BETA, Protein Dr1, NC2-beta, Down-Regulator Of Transcription 1; NCBI Reference Sequence: NP_001929.1); DR13 (Major Histocompatibility Complex, Class II, DR Beta 1, HLA-DR1B, DRw10, DW2.2/DR2.2, SS1, DRB1, HLA-DRB, HLA Class II Histocompatibility Antigen, DR-1 Beta Chain, Human Leucocyte Antigen DRB1, Lymphocyte Antigen DRB1, MHC Class II Antigen, MHC Class II HLA-DR Beta 1 Chain, MHC Class II HLA-DR-Beta Cell Surface Glycoprotein, MHC Class II HLA-DRw10-Beta, DR-1, DR-12, DR-13, DR-14, DR-16, DR-4, DR-5, DR-7, DR-8, DR-9, DR1, DR12, DR13, DR14, DR16, DR4, DR5, DR7,

DR8, DR9, DRw11, DRw8, HLA-DRB2, Clone P2-Beta-3, MHC Class II Antigen DRB1*1, MHC Class II Antigen DRB1*10, MHC Class II Antigen DRB1*11, MHC Class II Antigen DRB1*12, MHC Class II Antigen DRB1*13, MHC Class II Antigen DRB1*14, MHC Class II Antigen DRB1*15, MHC Class II Antigen DRB1*16, MHC Class II Antigen DRB1*3, MHC Class II Antigen DRB1*4, MHC Class II Antigen DRB1*7, MHC Class II Antigen DRB1*8, MHC Class II Antigen DRB1*9; NP); E16 (E16 (LAT1, SLC7A5, Genbank accession no. NM_00348); EDAR (EDAR - tumor necrosis factor receptor superfamily member EDAR precursor, EDA-A1 receptor; downless homolog; ectodysplasin-A receptor; ectodermal dysplasia receptor; anhidrotic ectodysplasin receptor 1, DL; ECTD10A; ECTD10B; ED1R; ED3; ED5; EDA-A1R; EDA1R; EDA3; HRM1 [Homo sapiens]; NCBI Reference Sequence: NP_071731.1); EFTUD2 (Elongation Factor Tu GTP Binding Domain Containing 2, Elongation Factor Tu GTP-Binding Domain-Containing Protein 2, hSNU114, SNU114 Homolog, U5 SnRNP-Specific Protein, 116 KDa, MFDGA, KIAA0031, 116 KD, U5 SnRNP Specific Protein, 116 KDa U5 Small Nuclear Ribonucleoprotein Component, MFDM, SNRNP116, Snrp116, Snu114, U5-116KD, SNRP116, U5-116 KDa; GenBank: AAH02360.1); EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor, ERBB, Proto-Oncogene C-ErbB-1, Receptor Tyrosine-Protein Kinase ErbB-1, ERBB1, HER1, EC 2.7.10.1, Epidermal Growth Factor Receptor (Avian Erythroblastic Leukemia Viral (V-Erb-B) Oncogene Homolog), Erythroblastic Leukemia Viral (V-Erb-B) Oncogene Homolog (Avian), PIG61, Avian Erythroblastic Leukemia Viral (V-Erb-B) Oncogene Homolog, Cell Growth Inhibiting Protein 40, Cell Proliferation-Inducing Protein 61, mENA, EC 2.7.10; GenBank: AAH94761.1); EGFR-G719A ; EGFR-G719C; EGFR-G719S; EGFR-L858R; EGFR-L861Q; EGFR-S768I; EGFR-T790M; Elongation factor 2 (EEF2, Eukaryotic Translation Elongation Factor 2, EF2, Polypeptidyl-TRNA Translocase, EF-2, SCA26, EEF-2; NCBI Reference Sequence: NP_001952.1); ENAH (hMena) (Enabled Homolog (Drosophila), MENA, Mammalian Enabled, ENA, NDPP1, Protein Enabled Homolog; GenBank: AAH95481.1) – results for just “ENAH” not “ENAH (hMena)”; EpCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule, M4S1, MIC18, Tumor-Associated Calcium Signal Transducer 1, TACSTD1, TROP1, Adenocarcinoma-Associated Antigen, Cell Surface Glycoprotein Trop-1, Epithelial Glycoprotein 314, Major Gastrointestinal Tumor-Associated Protein GA733-2, EGP314, KSA, DIAR5, HNPCC8, Antigen Identified By Monoclonal Antibody AUA1, EGP-2, EGP40, ESA, KS1/4, MK-1, Human Epithelial Glycoprotein-2, Membrane Component, Chromosome 4, Surface Marker (35kD Glycoprotein), EGP, Ep-CAM, GA733-2, M1S2, CD326 Antigen, Epithelial Cell Surface Antigen, hEGP314, KS 1/4 Antigen, ACSTD1; GenBank: AAH14785.1); EphA3 (EPH Receptor A3, ETK1, ETK, TYRO4, HEK, Eph-Like Tyrosine Kinase 1, Tyrosine-Protein Kinase Receptor ETK1, EK4, EPH-Like Kinase 4, EC 2.7.10.1, EPHA3, HEK4, Ephrin Type-A Receptor 3, Human Embryo Kinase 1, TYRO4 Protein Tyrosine Kinase, hEK4, Human Embryo Kinase, Tyrosine-Protein Kinase TYRO4, EC 2.7.10; GenBank: AAH63282.1); EphB2R ; Epiregulin (EREG, ER, proepiregulin; GenBank: AAI36405.1); ETBR (EDNRB, Endothelin Receptor Type B, HSCR2, HSCR, Endothelin Receptor Non-Selective Type, ET-B, ET-BR, ETRB, ABCDS, WS4A, ETB, Endothelin B Receptor; NP); ETV6-AML1 fusion protein; EZH2 (Enhancer Of Zeste Homolog 2 (Drosophila), Lysine N-Methyltransferase 6, ENX-1, KMT6 EC 2.1.1.43, EZH1, WVS, Enhancer Of Zeste (Drosophila) Homolog 2, ENX1, EZH2b, KMT6A, WVS2, Histone-Lysine N-Methyltransferase EZH2, Enhancer Of Zeste Homolog 2, EC 2.1.1; GenBank: AAH10858.1); FcRH1 (FCRL1, Fc Receptor-Like 1, FCRH1, Fc Receptor Homolog 1,

FcR-Like Protein 1, Immune Receptor Translocation-Associated Protein 5, IFGP1, IRTA5, hIFGP1, IFGP Family Protein 1, CD307a, Fc Receptor-Like Protein 1, Immunoglobulin Superfamily Fc Receptor, Gp42, FcRL1, CD307a Antigen; GenBank: AAH33690.1); FcRH2 (FCRL2, Fc Receptor-Like 2, SPAP1, SH2 Domain-Containing Phosphatase Anchor Protein 1, Fc Receptor Homolog 2, FcR-Like Protein 2, Immunoglobulin Receptor Translocation-Associated Protein 4, FCRH2, IFGP4, IRTA4, IFGP Family Protein 4, SPAP1A, SPAP1B, SPAP1C, CD307b, Fc Receptor-Like Protein 2, Immune Receptor Translocation-Associated Protein 4, Immunoglobulin Superfamily Fc Receptor, Gp42, SH2 Domain Containing Phosphatase Anchor Protein 1, FcRL2, CD307b Antigen; GenBank: AAQ88497.1); FcRH5 (FCRL5, Fc Receptor-Like 5, IRTA2, Fc Receptor Homolog 5, FcR-Like Protein 5, Immune Receptor Translocation-Associated Protein 2, BXMAS1, FCRH5, CD307, CD307e, PRO820, Fc Receptor-Like Protein 5, Immunoglobulin Superfamily Receptor Translocation Associated 2 (IRTA2), FcRL5, CD307e Antigen; GenBank: AAI01070.1); FLT3-ITD; FN1(Fibronectin 1, Cold-Insoluble Globulin, FN, Migration-Stimulating Factor, CIG, FNZ, GFND2, LETS, ED-B, FINC, GFND, MSF, fibronectin; GenBank: AAI43764.1); G250 (MN, CAIX, Carbonic Anhydrase IX, Carbonic Dehydratase, RCC-Associated Protein G250, Carbonate Dehydratase IX, Membrane Antigen MN, Renal Cell Carcinoma-Associated Antigen G250, CA-IX, P54/58N, pMW1, RCC-Associated Antigen G250, Carbonic Anhydrase 9; NP); - alias results for “G250” not “G250 / MN / CAIX”; GAGE-1,2,8; GAGE-3,4,5,6,7; GDNF-Ra1 (GDNF family receptor alpha 1; GFRA1; GDNFR; GDNFRA; RETL1; TRNR1; RET1L; GDNFR-alpha1; GFR-ALPHA-; U95847; BC014962; NM_145793 NM_005264); GEDA (Genbank accession No. AY26076); GFRA1 - GDNF family receptor alpha-1; GDNF receptor alpha-1; GDNFR-alpha-1; GFR-alpha-1; RET ligand 1; TGF-beta-related neurotrophic factor receptor 1 [Homo sapiens]; ProtKB/Swiss-Prot: P56159.2; glypican-3 (GPC3, Glypican 3, SDYS, Glypican Proteoglycan 3, Intestinal Protein OCI-5, GTR2-2, MXR7, SGBS1, DGSX, OCI-5. SGB, SGBS, Heparan Sulphate Proteoglycan, Secreted Glypican-3, OCI5; GenBank: AAH35972.1); GnTVf ; gp100 (PMEL, Premelanosome Protein, SILV, D12S53E, PMEL17, SIL, Melanocyte Protein Pmel 17, Melanocytes Lineage-Specific Antigen GP100, Melanoma-Associated ME20 Antigen, Silver Locus Protein Homolog, ME20-M, ME20M, P1, P100, Silver (Mouse Homolog) Like, Silver Homolog (Mouse), ME20, SI, Melanocyte Protein Mel 17, Melanocyte Protein PMEL, Melanosomal Matrix Protein17, Silver, Mouse, Homolog Of; GenBank: AAC60634.1); GPC; GPNMB (Glycoprotein (Transmembrane) Nmb, Glycoprotein NMB, Glycoprotein Nmb-Like Protein, osteoactivin, Transmembrane Glycoprotein HGFIN, HGFIN, NMB, Transmembrane Glycoprotein, Transmembrane Glycoprotein NMB; GenBank: AAH32783.1); GPR172A (G protein-coupled receptor 172A; GPCR41; FLJ11856; D15Ertd747e); NP_078807.1; NM_024531.3); GPR19 (G protein-coupled receptor 19; Mm.478; NP_006134.1; NM_006143.2); GPR54 (KISS1 receptor; KISS1R; GPR54; HOT7T175; AXOR1; NP_115940.2; NM_032551.4); HAVCR1 (Hepatitis A Virus Cellular Receptor 1, T-Cell Immunoglobulin Mucin Family Member 1, Kidney Injury Molecule 1, KIM-1, KIM1, TIM, TIM-1, TIM1, TIMD-1, TIMD1, T-Cell Immunoglobulin Mucin Receptor 1, T-Cell Membrane Protein 1, HAVCR, HAVCR-1, T Cell Immunoglobin Domain And Mucin Domain Protein 1, HAVcr-1, T-Cell Immunoglobulin And Mucin Domain-Containing Protein 1; GenBank: AAH13325.1); HER2 (ERBB2, V-Erb-B2 Avian Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene Homolog 2, NGL, NEU, Neuro/Glioblastoma Derived Oncogene Homolog, Metastatic Lymph Node

Gene 19 Protein, Proto-Oncogene C-ErbB-2, Proto-Oncogene Neu, Tyrosine Kinase-Type Cell Surface Receptor HER2, MLN 19, p185erbB2, EC 2.7.10.1, V-Erb-B2 Avian Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene Homolog 2 (Neuro/Glioblastoma Derived Oncogene Homolog), CD340, HER-2, HER-2/neu, TKR1, C-Erb B2/Neu Protein, herstatin, Neuroblastoma/Glioblastoma Derived Oncogene Homolog, Receptor Tyrosine-Protein Kinase ErbB-2, V-Erb-B2 Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene Homolog 2, Neuro/Glioblastoma Derived Oncogene Homolog, MLN19, CD340 Antigen, EC 2.7.10; NP); HER-2 / neu – alias of above; HERV-K-MEL ; HLA-DOB (Beta subunit of MHC class II molecule (Ia antigen) that binds peptides and presents them to CD4+ T lymphocytes); 273 aa, pI: 6.56, MW: 30820.TM: 1 [P] Gene Chromosome: 6p21.3, Genbank accession No. NP_002111); hsp70-2 (HSPA2, Heat Shock 70kDa Protein 2, Heat Shock 70kD Protein 2, HSP70-3, Heat Shock-Related 70 KDa Protein 2, Heat Shock 70 KDa Protein 2; GenBank: AAD21815.1); IDO1 (Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1, IDO, INDO, Indoleamine-Pyrrole 2,3-Dioxygenase, IDO-1, Indoleamine-Pyrrole 2,3 Dioxygenase, Indolamine 2,3 Dioxygenase, Indole 2,3 Dioxygenase, EC 1.13.11.52; NCBI Reference Sequence: NP_002155.1); IGF2B3 ; IL13Ralpha2 (IL13RA2,Interleukin 13 Receptor, Alpha 2, Cancer/Testis Antigen 19, Interleukin-13-Binding Protein, IL-13R-alpha-2, IL-13RA2, IL-13 Receptor Subunit Alpha-2, IL-13R Subunit Alpha-2, CD213A2, CT19, IL-13R, IL13BP, Interleukin 13 Binding Protein, Interleukin 13 Receptor Alpha 2 Chain, Interleukin-13 Receptor Subunit Alpha-2, IL13R, CD213a2 Antigen; NP); IL20Rα; Intestinal carboxyl esterase; IRTA2 (alias of FcRH5); Kallikrein 4 (KLK4, Kallikrein-Related Peptidase 4, PRSS17, EMSP1, Enamel Matrix Serine Proteinase 1, Kallikrein-Like Protein 1, Serine Protease 17, KLK-L1, PSTS, AI2A1, Kallikrein 4 (Prostase, Enamel Matrix, Prostate), ARM1, EMSP, Androgen-Regulated Message 1, Enamel Matrix Serine Protease 1, kallikrein, kallikrein-4, prostase, EC 3.4.21.-, Prostase, EC 3.4.21; GenBank: AAX30051.1); KIF20A (Kinesin Family Member 20A, RAB6KIFL, RAB6 Interacting, Kinesin-Like (Rabkinesin6), Mitotic a; LAGE-1; LDLR-fucosyltransferaseASfusion protein; Lengsin (LGSN, Lengsin, Lens Protein With Glutamine Synthetase Domain, GLULD1, Glutamate-Ammonia Ligase Domain-Containing Protein 1, LGS, Glutamate-Ammonia Ligase (Glutamine Synthetase) Domain Containing 1, Glutamate-Ammonia Ligase (Glutamine Synthase) Domain Containing 1, Lens Glutamine Synthase-Like; GenBank: AAF61255.1); LGR5 (leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5; GPR49, GPR6; NP_003658.1; NM_003667.2; LY64 (Lymphocyte antigen 64 (RP10, type I membrane protein of the leucine rich repeat (LRR) family, regulates B-cell activation and apoptosis, loss of function is associated with increased disease activity in patients with systemic lupus erythematosis); 661 aa, pI: 6.20, MW: 74147 TM: 1 [P] Gene Chromosome: 5q12, Genbank accession No. NP_005573.; Ly6E (lymphocyte antigen 6 complex, locus E; Ly67,RIG-E,SCA-2,TSA-; NP_002337.1; NM_002346.2); Ly6G6D (lymphocyte antigen 6 complex, locus G6D; Ly6-D, MEGT; NP_067079.2; NM_021246.2); LY6K (lymphocyte antigen 6 complex, locus K; LY6K; HSJ001348; FLJ3522; NP_059997.3; NM_017527.3); LyPD1 - LY6/PLAUR domain containing 1, PHTS [Homo sapiens], GenBank: AAH17318.1); MAGE-A1 (Melanoma Antigen Family A, 1 (Directs Expression Of Antigen MZ2-E, MAGE1, Melanoma Antigen Family A 1, MAGEA1, Melanoma Antigen MAGE-1, Melanoma-Associated Antigen 1, Melanoma-Associated Antigen MZ2-E, Antigen MZ2-E, Cancer/Testis Antigen 1.1, CT1.1, MAGE-1 Antigen, Cancer/Testis Antigen Family 1, Member 1, Cancer/Testis Antigen Family 1, Member 1, MAGE1A; NCBI Reference Sequence: NP_004979.3); MAGE-

A10 (MAGEA10, Melanoma Antigen Family A, 10, MAGE10, MAGE-10 Antigen, Melanoma-Associated Antigen 10, Cancer/Testis Antigen 1.10, CT1.10, Cancer/Testis Antigen Family 1, Member 10, Cancer/Testis Antigen Family 1, Member 10; NCBI Reference Sequence: NP_001238757.1); MAGE-A12 (MAGEA12, Melanoma Antigen Family A, 12, MAGE12, Cancer/Testis Antigen 1.12, CT1.12, MAGE12F Antigen, Cancer/Testis Antigen Family 1, Member 12, Cancer/Testis Antigen Family 1, Member 12, Melanoma-Associated Antigen 12, MAGE-12 Antigen; NCBI Reference Sequence: NP_001159859.1); MAGE-A2 (MAGEA2, Melanoma Antigen Family A, 2, MAGE2, Cancer/Testis Antigen 1.2, CT1.2, MAGEA2A, MAGE-2 Antigen, Cancer/Testis Antigen Family 1, Member 2, Cancer/Testis Antigen Family 1, Member 2, Melanoma Antigen 2, Melanoma-Associated Antigen 2; NCBI Reference Sequence: NP_001269434.1); MAGE-A3 (MAGEA3, Melanoma Antigen Family A, 3, MAGE3, MAGE-3 Antigen, Antigen MZ2-D, Melanoma-Associated Antigen 3, Cancer/Testis Antigen 1.3, CT1.3, Cancer/Testis Antigen Family 1, Member 3, HIP8, HYPD, MAGEA6, Cancer/Testis Antigen Family 1, Member 3; NCBI Reference Sequence: NP_005353.1); MAGE-A4 (MAGEA4, Melanoma Antigen Family A, 4, MAGE4, Melanoma-Associated Antigen 4, Cancer/Testis Antigen 1.4, CT1.4, MAGE-4 Antigen, MAGE-41 Antigen, MAGE-X2 Antigen, MAGE4A, MAGE4B, Cancer/Testis Antigen Family 1, Member 4, MAGE-41, MAGE-X2, Cancer/Testis Antigen Family 1, Member 4; NCBI Reference Sequence: NP_001011550.1); MAGE-A6 (MAGEA6, Melanoma Antigen Family A, 6, MAGE6, MAGE-6 Antigen, Melanoma-Associated Antigen 6, Cancer/Testis Antigen 1.6, CT1.6, MAGE3B Antigen, Cancer/Testis Antigen Family 1, Melanoma Antigen Family A 6, Member 6, MAGE-3b, MAGE3B, Cancer/Testis Antigen Family 1, Member 6; NCBI Reference Sequence: NP_787064.1); MAGE-A9 (MAGEA9, Melanoma Antigen Family A, 9, MAGE9, MAGE-9 Antigen, Melanoma-Associated Antigen 9, Cancer/Testis Antigen 1.9, CT1.9, Cancer/Testis Antigen Family 1, Member 9, Cancer/Testis Antigen Family 1, Member 9, MAGEA9A; NCBI Reference Sequence: NP_005356.1); MAGE-C1 (MAGEC1, Melanoma Antigen Family C, 1, Cancer/Testis Antigen 7.1, CT7.1, MAGE-C1 Antigen, Cancer/Testis Antigen Family 7, Member 1, CT7, Cancer/Testis Antigen Family 7, Member 1, Melanoma-Associated Antigen C1; NCBI Reference Sequence: NP_005453.2); MAGE-C2 (MAGEC2, Melanoma Antigen Family C, 2, MAGEE1, Cancer/Testis Antigen 10, CT10, HCA587, Melanoma Antigen, Family E, 1, Cancer/Testis Specific, Hepatocellular Carcinoma-Associated Antigen 587, MAGE-C2 Antigen, MAGE-E1 Antigen, Hepatocellular Cancer Antigen 587, Melanoma-Associated Antigen C2; NCBI Reference Sequence: NP_057333.1); mammaglobin-A (SCGB2A2, Secretoglobin, Family 2A, Member 2, MGB1, Mammaglobin 1, UGB2, Mammaglobin A, mammaglobin-A, Mammaglobin-1, Secretoglobin Family 2A Member 2; NP); MART2 (HHAT, Hedgehog Acyltransferase, SKI1, Melanoma Antigen Recognized By T-Cells 2, Skinny Hedgehog Protein 1, Skn, Melanoma Antigen Recognized By T Cells 2, Protein-Cysteine N-Palmitoyltransferase HHAT, EC 2.3.1.-; GenBank: AAH39071.1); M-CSF (CSF1, Colony Stimulating Factor 1 (Macrophage), MCSF, CSF-1, lanimostim, Macrophage Colony-Stimulating Factor 1, Lanimostim; GenBank: AAH21117.1); MCSP (SMCP, Sperm Mitochondria-Associated Cysteine-Rich Protein, MCS, Mitochondrial Capsule Selenoprotein, HSMCSGEN1, Sperm Mitochondrial-Associated Cysteine-Rich Protein; NCBI Reference Sequence: NP_109588.2); XAGE-1b/GAGED2a; WT1 (Wilms Tumor 1, WAGR, GUD, WIT-2, WT33, Amino-Terminal Domain Of EWS, NPHS4, Last Three Zinc Fingers Of The DNA-Binding Domain Of WT1, AWT1, Wilms

Tumor Protein, EWS-WT1; GenBank: AAB33443.1); VEGF; Tyrosinase (TYR; OCAIA; OCA1A; tyrosinase; SHEP; NP_000363.1; NM_000372.4; GenBank: AAB60319.1); TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 4, Genbank accession no. NM_01763); TRP2-INT2; TRP-2 ; TRP-1 / gp75 (Tyrosinase-Related Protein 1, 5,6-Dihydroxyindole-2-Carboxylic Acid Oxidase, CAS2, CATB, TYRP, OCA3, Catalase B, b-PROTEIN, Glycoprotein 75, EC 1.14.18., Melanoma Antigen Gp75, TYRP1, TRP, TYRRP, TRP1, SHEP11, DHICA Oxidase, EC 1.14.18, GP75, EC 1.14.18.1; Triosephosphate isomerase (Triosephosphate isomerase 1, TPID, Triose-Phosphate Isomerase, HEL-S-49, TIM, Epididymis Secretory Protein Li 49, TPI, Triosephosphate Isomerase, EC 5.3.1.1; TRAG-3 (CSAG Family Member 2, Cancer/Testis Antigen Family 24, CSAG3B, Member 2, CSAG Family Member 3B, Cancer/Testis Antigen Family 24 Member 2, Cancer/Testis Antigen 24.2, Chondrosarcoma-Associated Gene 2/3 Protein, Taxol-Resistant-Associated Gene 3 Protein, Chondrosarcoma-Associated Gene 2/3 Protein-Like, CT24.2, Taxol Resistance Associated Gene 3, TRAG-3, CSAG3A, TRAG3;); TMEM46 (shisa homolog 2 (Xenopus laevis); SHISA; NP_001007539.1; NM_001007538.1; TMEM118 (ring finger protein, transmembrane2; RNFT2; FLJ1462; NP_001103373.1; NM_001109903.1; TMEFF1 (transmembrane protein with EGF-like and two follistatin-like domains 1; Tomoregulin-; H7365; C9orf2; C9ORF2; U19878; X83961; NM_080655; NM_003692; TGF-betaRII (TGFBR2, Transforming Growth Factor, Beta Receptor II (70/80kDa), TGFbeta-RII, MFS2, tbetaR-II, TGFR-2, TGF-Beta Receptor Type IIB, TGF-Beta Type II Receptor, TGF-Beta Receptor Type-2, EC 2.7.11.30, Transforming Growth Factor Beta Receptor Type IIC, AAT3, TbetaR-II, Transforming Growth Factor, Beta Receptor II (70-80kD), TGF-Beta Receptor Type II, FAA3, Transforming Growth Factor-Beta Receptor Type II, LDS1B, HNPCC6, LDS2B, LDS2, RIIC, EC 2.7.11, TAAD2; TENB2 (TMEFF2, tomoregulin, TPEF, HPP1, TR, putative transmembrane proteoglycan, related to the EGF/heregulin family of growth factors and follistatin); 374 aa, NCBI Accession: AAD55776, AAF91397, AAG49451, NCBI RefSeq: NP_057276; NCBI Gene: 23671; OMIM: 605734; SwissProt Q9UIK5; Genbank accession No. AF179274; AY358907, CAF85723, CQ782436; TAG-2; TAG-1 (Contactin 2 (Axonal), TAG-1, AXT, Axonin-1 Cell Adhesion Molecule, TAX, Contactin 2 (transiently Expressed), TAX1, Contactin-2, Axonal Glycoprotein TAG-1, Transiently-Expressed Axonal Glycoprotein, Transient Axonal Glycoprotein, Axonin-1, TAX-1, TAG1, FAME5; PRF: 444868); SYT-SSX1 or -SSX2 fusion protein; survivin; STEAP2 (HGNC_8639, IPCA-1, PCANAP1, STAMP1, STEAP2, STMP, prostate cancer associated gene 1, prostate cancer associated protein 1, six transmembrane epithelial antigen of prostate 2, six transmembrane prostate protein, Genbank accession no. AF45513; STEAP1 (six transmembrane epithelial antigen of prostate, Genbank accession no. NM_01244; SSX-4; SSX-2 (SSX2, Synovial Sarcoma, X Breakpoint2, X Breakpoint 2, SSX, X Breakpoint 2B, Cancer/Testis Antigen 5.2, X-Chromosome-Related 2, Tumor Antigen HOM-MEL-40, CT5.2, HD21, Cancer/Testis Antigen Family 5, HOM-MEL-40, Isoform B, Cancer/Testis Antigen Family 5 member 2a, member 2a, Protein SSX2, Sarcoma, Sarcoma, Synovial, X-Chromosome-Related 2, synovial, Synovial Sarcoma, X Breakpoint 2B, Synovial Sarcomam, SSX2A; Sp17; SOX10 (SRY (Sex Determining Region Y)-Box 10, mouse, PCWH, DOM, WS4, WS2E, WS4C, Dominant Megacolon, mouse, Human Homolog Of, Dominant Megacolon, SRY-Related HMG-Box Gene 10, Human Homolog Of, transcription Factor SOX-10; GenBank: CAG30470.1); SNRPD1 (Small Nuclear

Ribonucleoprotein D1, Small Nuclear Ribonucleoprotein D1, Polypeptide 16kDa, Polypeptide (16kD), SNRPD, HsT2456, Sm-D1, SMD1, Sm-D Autoantigen, Small Nuclear Ribonucleoprotein D1 Polypeptide 16kDa Pseudogene, SnRNP Core Protein D1, Small Nuclear Ribonucleoprotein Sm D1; SLC35D3 (Solute Carrier Family 35, Member D3, FRCL1, Fringe Connection-Like Protein 1, bA55K22.3, Frc, Fringe-Like 1, Solute Carrier Family 35 Member D3; NCBI GenBank: NC_000006.11 NC_018917.2 NT_025741.16); SIRT2 (Sirtuin 2, NAD-Dependent Deacetylase Sirtuin-2, SIRL2, Silent Information Regulator 2, Regulatory Protein SIR2 Homolog 2, Sir2-Related Protein Type 2, SIR2-Like Protein 2, Sirtuin Type 2, Sirtuin (Silent Mating Type Information Regulation 2 Homolog) 2 (S.Cerevisiae), Sirtuin-2, Sirtuin (Silent Mating Type Information Regulation 2, S.Cerevisiae, Homolog) 2, EC 3.5.1., SIR2; GenBank: AAK51133.1); Sema 5b (FLJ10372, KIAA1445, Mm.42015, SEMA5B, SEMAG, Semaphorin 5b Hlog, sema domain, seven thrombospondin repeats (type 1 and type 1-like), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 5B, Genbank accession no. AB04087; secernin 1 (SCRN1, SES1, KIAA0193, secerin-1; GenBank: EAL24458.1); SAGE (SAGE1, Sarcoma Antigen 1, Cancer/Testis Antigen 14, CT14, Putative Tumor Antigen; NCBI Reference Sequence: NP_061136.2); RU2AS (KAAG1, Kidney Associated Antigen 1, RU2AS, RU2 Antisense Gene Protein, Kidney-Associated Antigen 1; GenBank: AAF23613.1); RNF43 - E3 ubiquitin-protein ligase RNF43 precursor [Homo sapiens], RNF124; URCC; NCBI Reference Sequence: NP_060233.3; RhoC (RGS5 (Regulator Of G-Protein Signaling 5, MSTP032, Regulator Of G-Protein Signalling 5, MSTP092, MST092, MSTP106, MST106, MSTP129, MST129; GenBank: AAB84001.1); RET (ret proto-oncogene; MEN2A; HSCR1; MEN2B; MTC1; PTC; CDHF12; Hs.168114; RET51; RET-ELE; NP_066124.1; NM_020975.4); RBAF600 (UBR4, Ubiquitin Protein Ligase E3 Component N-Recognin 4, Zinc Finger, UBR1 Type 1, ZUBR1, E3 Ubiquitin-Protein Ligase UBR4, RBAF600, 600 KDa Retinoblastoma Protein-Associated Factor, Zinc Finger UBR1-Type Protein 1, EC 6.3.2., N-recognin-4, KIAA0462, p600, EC 6.3.2, KIAA1307; GenBank: AAL83880.1); RAGE-1 (MOK, MOK Protein Kinase, Renal Tumor Antigen, RAGE, MAPK/MAK/MRK Overlapping Kinase, Renal Tumor Antigen 1, Renal Cell Carcinoma Antigen, RAGE-1, EC 2.7.11.22, RAGE1; UniProtKB/Swiss-Prot: Q9UQ07.1); RAB38 / NY-MEL-1 (RAB38, NY-MEL-1, RAB38, Member RAS Oncogene Family, Melanoma Antigen NY-MEL-1, Rab-Related GTP-Binding Protein, Ras-Related Protein Rab-38, rrGTPbp; GenBank: AAH15808.1); PTPRK (DJ480J14.2.1 (Protein Tyrosine Phosphatase, Receptor Type, K R-PTP-KAPPA, Protein Tyrosine Phosphatase Kappa , Protein Tyrosine Phosphatase Kappa), Protein Tyrosine Phosphatase, Receptor Type, K, Protein-Tyrosine Phosphatase Kappa, Protein-Tyrosine Phosphatase, Receptor Type, Kappa, R-PTP-kappa, Receptor-Type Tyrosine-Protein Phosphatase Kappa, EC 3.1.3.48, PTPK; GenBank: AAI44514.1); PSMA; PSCA hlg(2700050C12Rik, C530008O16Rik, RIKEN cDNA 2700050C12, RIKEN cDNA 2700050C12 gene, Genbank accession no. AY358628); PSCA (Prostate stem cell antigen precursor, Genbank accession no. AJ29743; PRDX5 (Peroxiredoxin 5, EC 1.11.1.15, TPx Type VI, B166, Antioxidant Enzyme B166, HEL-S-55, Liver Tissue 2D-Page Spot 71B, PMP20, Peroxisomal Antioxidant Enzyme, PRDX6, Thioredoxin Peroxidase PMP20, PRXV, AOEB166, Epididymis Secretory Protein Li 55, Alu Co-Repressor 1, Peroxiredoxin-5, Mitochondrial, Peroxiredoxin V, prx-V, Thioredoxin Reductase, Prx-V, ACR1, Alu Corepressor, PLP; GenBank: CAG33484.1); PRAME (Preferentially Expressed Antigen In Melanoma, Preferentially Expressed

Antigen Of Melanoma, MAPE, OIP-4, OIPA, CT130, Cancer/Testis Antigen 130, Melanoma Antigen Preferentially Expressed In Tumors, Opa-Interacting Protein 4, Opa-Interacting Protein OIP4; GenBank: CAG30435.1); pml-RARalpha fusion protein; PMEL17 (silver homolog; SILV; D12S53E; PMEL17; SI; SIL); ME20; gp10 BC001414; BT007202; M32295; M77348; NM_006928; PBF (ZNF395, Zinc Finger Protein 395, PRF-1, Huntington disease regulatory, HD Gene Regulatory Region-Binding Protein, Region-Binding Protein 2, Protein 2, Papillomavirus Regulatory Factor 1, HD-Regulating Factor 2, Papillomavirus-Regulatory Factor, PRF1, HDBP-2, Si-1-8-14, HDBP2, Huntington'S Disease Gene Regulatory Region-Binding Protein 2, HDRF-2, Papillomavirus Regulatory Factor PRF-1, PBF; GenBank: AAH01237.1); PAX5 (Paired Box 5, Paired Box Homeotic Gene 5, BSAP, Paired Box Protein Pax-5, B-Cell Lineage Specific Activator, Paired Domain Gene 5, Paired Box Gene 5 (B-Cell Lineage Specific Activator Protein), B-Cell-Specific Transcription Factor, Paired Box Gene 5 (B-Cell Lineage Specific Activator); PAP (REG3A, Regenerating Islet-Derived 3 Alpha, INGAP, PAP-H, Hepatointestinal Pancreatic Protein, PBBCGF, Human Proislet Peptide, REG-III, Pancreatitis-Associated Protein 1, Reg3, Reg III-Alpha, hepatocarcinoma-intestine-pancreas, Regenerating Islet-Derived Protein III-Alpha, Pancreatic Beta Cell Growth Factor, HIP, PAP Homologous Protein, HIP/PAP, Proliferation-Inducing Protein 34, PAP1, Proliferation-Inducing Protein 42, REG-3-alpha, Regenerating Islet-Derived Protein 3-Alpha, Pancreatitis-Associated Protein; GenBank: AAH36776.1); p53 (TP53, Tumor Protein P53, TPR53, P53, Cellular Tumor Antigen P53, Antigen NY-CO-13, Mutant Tumor Protein 53, Phosphoprotein P53, P53 Tumor Suppressor, BCC7, Transformation-Related Protein 53, LFS1, tumor Protein 53, Li-Fraumeni Syndrome, Tumor Suppressor P53; P2X5 (Purinergic receptor P2X ligand-gated ion channel 5, an ion channel gated by extracellular ATP, may be involved in synaptic transmission and neurogenesis, deficiency may contribute to the pathophysiology of idiopathic detrusor instability); 422 aa), pI: 7.63, MW: 47206 TM: 1 [P] Gene Chromosome: 17p13.3, Genbank accession No. NP_002552.; OGT (O-Linked N-Acetylglucosamine (GlcNAc) Transferase, O-GlcNAc Transferase P110 Subunit, O-Linked N-Acetylglucosamine (GlcNAc) Transferase (UDP-N-Acetylglucosamine:Polypeptide-N-Acetylglucosaminyl Transferase, UDP-N-Acetylglucosamine--Peptide N-Acetylglucosaminyltransferase 110 KDa Subunit, UDP-N-Acetylglucosamine:Polypeptide-N-Acetylglucosaminyl Transferase, Uridinediphospho-N-Acetylglucosamine:Polypeptide Beta-N-Acetylglucosaminyl Transferase, O-GlcNAc Transferase Subunit P110, EC 2.4.1.255, O-Linked N-Acetylglucosamine Transferase 110 KDa Subunit, EC 2.4.1, HRNT1, EC 2.4.1.186, O-GLCNAC; GenBank: AAH38180.1); OA1 (Osteoarthritis QTL 1, OASD; GenBank: CAA88742.1); NY-ESO-1/LAGE-2 (Cancer/Testis Antigen 1B, CTAG1B, NY-ESO-1, LAGE-2, ESO1, CTAG1, CTAG, LAGE2B, Cancer/Testis Antigen 1, Autoimmunogenic Cancer/Testis Antigen NY-ESO-1, Ancer Antigen 3, Cancer/Testis Antigen 6.1, New York Esophageal Squamous Cell Carcinoma 1, L Antigen Family Member 2, LAGE2, CT6.1, LAGE2A; GenBank: AAI30365.1); NY-BR-1 (ANKRD30A, Ankyrin Repeat Domain 30A, Breast Cancer Antigen NY-BR-1, Serologically Defined Breast Cancer Antigen NY-BR-1, Ankyrin Repeat Domain-Containing Protein 30A; NCBI Reference Sequence: NP_443723.2); N-ras (NRAS, Neuroblastoma RAS Viral (V-Ras) Oncogene Homolog, NRAS1, Transforming Protein N-Ras, GTPase NRas, ALPS4, N-Ras Protein Part 4, NS6, Oncogene Homolog, HRAS1; GenBank: AAH05219.1); NFYC (Nuclear Transcription Factor Y, Gamma, HAP5, HSM, Nuclear Transcription Factor Y Subunit C, Transactivator HSM-1/2, CCAAT

Binding Factor Subunit C, NF-YC, CCAAT Transcription Binding Factor Subunit Gamma, CAAT Box DNA-Binding Protein Subunit C, Histone H1 Transcription Factor Large Subunit 2A, CBFC, Nuclear Transcription Factor Y Subunit Gamma, CBF-C, Transactivator HSM-1, H1TF2A, Transcription Factor NF-Y, C Subunit; neo-PAP (PAPOLG, Poly(A) Polymerase Gamma, Neo-Poly(A) Polymerase, Nuclear Poly(A) Polymerase Gamma, Polynucleotide Adenylyltransferase Gamma, SRP RNA 3' Adenylating Enzyme/Pap2, PAP-gamma, Neo-PAP, SRP RNA 3'-Adenylating Enzyme, PAP2, EC 2.7.7.19, PAPG; NCBI Reference Sequence: NP_075045.2); NCA (CEACAM6, Genbank accession no. M1872); Napi3b (NAPI-3B, NPTIIb, SLC34A2, solute carrier family 34 (sodium phosphate), member 2, type II sodium-dependent phosphate transporter 3b, Genbank accession no. NM_00642); Myosin class I; MUM-3; MUM-2 (TRAPPC1, Trafficking Protein Particle Complex 1, BET5, BET5 Homolog, MUM2, Melanoma Ubiquitous Mutated 2, Multiple Myeloma Protein 2, Trafficking Protein Particle Complex Subunit 1; MUM-1f; Mucin (MUC1, Mucin 1, Cell Surface Associated, PEMT, PUM, CA 15-3, MCKD1, ADMCKD, Medullary Cystic Kidney Disease 1 (Autosomal Dominant), ADMCKD1, Mucin 1, Transmembrane, CD227, Breast Carcinoma-Associated Antigen DF3, MAM6, Cancer Antigen 15-3, MCD, Carcinoma-Associated Mucin, MCKD, Krebs Von Den Lungen-6, MUC-1/SEC, Peanut-Reactive Urinary Mucin, MUC1/ZD, Tumor-Associated Epithelial Membrane Antigen, DF3 Antigen, Tumor-Associated Mucin, episialin, EMA, H23 Antigen, H23AG, Mucin-1, KL-6, Tumor Associated Epithelial Mucin, MUC-1, Episialin, PEM, CD227 Antigen; UniProtKB/Swiss-Prot: P15941.3); MUC5AC (Mucin 5AC, Oligomeric Mucus/Gel-Forming, Tracheobronchial Mucin, MUC5, TBM, Mucin 5, Subtypes A And C, Tracheobronchial/Gastric, leB, Gastric Mucin, Mucin 5AC, Oligomeric Mucus/Gel-Forming Pseudogene, Lewis B Blood Group Antigen, LeB, Major Airway Glycoprotein, MUC-5AC, Mucin-5 Subtype AC, Tracheobronchial; MUC1 (Mucin 1, Cell Surface Associated, PEMT, PUM, CA 15-3, MCKD1, ADMCKD, Medullary Cystic Kidney Disease 1 (Autosomal Dominant), ADMCKD1, Mucin 1, Transmembrane, CD227, Breast Carcinoma-Associated Antigen DF3, MAM6, Cancer Antigen 15-3, MCD, Carcinoma-Associated Mucin, MCKD, Krebs Von Den Lungen-6, MUC-1/SEC, Peanut-Reactive Urinary Mucin, MUC-1/X, Polymorphic Epithelial Mucin, MUC1/ZD, Tumor-Associated Epithelial Membrane Antigen, DF3 Antigen, Tumor-Associated Mucin, episialin, EMA, h23 Antigen, H23AG, mucin-1, KL-6, Tumor Associated Epithelial Mucin, MUC-1, Episialin, PEM, CD227 Antigen; MSG783 (RNF124, hypothetical protein FLJ20315, Genbank accession no. NM—01776; MRP4 - multidrug resistance-associated protein 4 isoform 3, MOAT-B; MOATB [Homo sapiens]; NCBI Reference Sequence: NP_001288758.1; MPF (MPF, MSLN, SMR, megakaryocyte potentiating factor, mesothelin, Genbank accession no. NM_00582 ; MMP-7 (MMP7, matrilysin, MPSL1, matrin, Matrix Metalloproteinase 7 (Matrilysin, Uterine), Uterine Matrilysin, Matrix Metalloproteinase-7, EC 3.4.24.23, Pump-1 Protease, Matrin, Uterine Metalloproteinase, PUMP1, MMP-7, EC 3.4.24, PUMP-1; GenBank: AAC37543.1); MMP-2 (MMP2, Matrix Metallopeptidase 2 (Gelatinase A, 72kDa Gelatinase, 72kDa Type IV Collagenase), MONA, CLG4A, Matrix Metalloproteinase 2 (Gelatinase A, 72kD Gelatinase, 72kD Type IV Collagenase), CLG4, 72kDa Gelatinase, 72kDa Type IV Collagenase), Matrix Metalloproteinase-2, MMP-II, 72 KDa Gelatinase, Collagenase Type IV-A, MMP-2, Matrix Metalloproteinase-II, TBE-1, Neutrophil Gelatinase, EC 3.4.24.24, EC 3.4.24; GenBank: AAH02576.1); and Meloe.

For example, in some instances, an anti-CD3 antibody having a first binding domain comprising at least one, two, three, four, five, or six hypervariable regions (HVRs) selected from (a) HVR-H1 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1; (b) HVR-H2 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2; (c) HVR-H3 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3; (d) HVR-L1 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 4; (e) HVR-L2 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 5; and (f) HVR-L3 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 6, such as 40G5c, may have a second binding domain that binds to CD20.

In some instances, an anti-CD3 antibody having a first binding domain comprising at least one, two, three, four, five, or six hypervariable regions (HVRs) selected from (a) HVR-H1 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1; (b) HVR-H2 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2; (c) HVR-H3 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3; (d) HVR-L1 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 4; (e) HVR-L2 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 5; and (f) HVR-L3 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 6, such as 40G5c, may have a second binding domain that binds to HER2. The second binding domain that binds to HER2 may, for example, comprise at least one, two, three, four, five, or six hypervariable regions (HVRs) selected from (a) HVR-H1 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 169; (b) HVR-H2 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 170; (c) HVR-H3 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 171; (d) HVR-L1 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 172; (e) HVR-L2 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 173; and (f) HVR-L3 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 174, such as possessed by the anti-HER2 antibody, hu4D5. In some instances, the second binding domain that binds HER2 comprises at least one (e.g., 1, 2, 3, or 4) of heavy chain framework regions FR-H1, FR-H2, FR-H3, and FR-H4 comprising the sequences of SEQ ID NOs: 549-552, respectively, and/or at least one (e.g., 1, 2, 3, or 4) of the light chain framework regions FR-L1, FR-L2, FR-L3, and FR-L4 comprising the sequences of SEQ ID NOs: 553-556, respectively. In some instances, the second binding domain that binds to HER2 may, for example, comprise (a) a VH domain comprising an amino acid sequence having at least 90% sequence identity (e.g., at least 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, or 99% sequence identity) to, or the sequence of, SEQ ID NO: 270; (b) a VL domain comprising an amino acid sequence having at least 90% sequence identity (e.g., at least 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, or 99% sequence identity) to, or the sequence of, SEQ ID NO: 271; or (c) a VH domain as in (a) and a VL domain as in (b).

In some instances, an anti-CD3 antibody having a first binding domain comprising at least one, two, three, four, five, or six hypervariable regions (HVRs) selected from (a) HVR-H1 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 7; (b) HVR-H2 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 8; (c) HVR-H3 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 9; (d) HVR-L1 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 10; (e) HVR-L2 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 11; and (f) HVR-L3 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 12, such as 38E4v1, may have a second binding domain that binds to HER2. The second binding domain that binds to HER2 may, for example, comprise at least one, two, three, four, five, or six hypervariable regions (HVRs) selected from (a) HVR-H1 comprising the

amino acid sequence of SEQ ID NO: 169; (b) HVR-H2 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 170; (c) HVR-H3 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 171; (d) HVR-L1 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 172; (e) HVR-L2 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 173; and (f) HVR-L3 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 174, such as possessed by the anti-HER2 antibody, hu4D5. In some instances, the second binding domain that binds to HER2 may, for example, comprise (a) a VH domain comprising an amino acid sequence having at least 90% sequence identity (e.g., at least 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, or 99% sequence identity) to, or the sequence of, SEQ ID NO: 270; (b) a VL domain comprising an amino acid sequence having at least 90% sequence identity (e.g., at least 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, or 99% sequence identity) to, or the sequence of, SEQ ID NO: 271; or (c) a VH domain as in (a) and a VL domain as in (b).

In some embodiments, bispecific antibodies may also be used to localize cytotoxic agents to cells which express a tumor antigen, such as a tumor antigen listed in Table 1 (e.g., CD20, FcRH5, HER2, LYPD1, LY6G6D, PMEL17, LY6E, CD19, CD33, CD22, CD79A, CD79B, EDAR, GFRA1, MRP4, RET, Steap1, or TenB2). Bispecific antibodies can also be prepared as full length antibodies or antibody fragments.

Techniques for making multispecific antibodies include, but are not limited to, recombinant co-expression of two immunoglobulin heavy chain-light chain pairs having different specificities (see Milstein and Cuello, *Nature* 305: 537 (1983)), WO 93/08829, and Traunecker et al., *EMBO J.* 10: 3655 (1991)), and "knob-in-hole" engineering (see, e.g., U.S. Patent No. 5,731,168). "Knob-in-hole" engineering of multispecific antibodies may be utilized to generate a first arm containing a knob and a second arm containing the hole into which the knob of the first arm may bind. The knob of the multispecific antibodies of the invention may be an anti-CD3 arm in one embodiment. Alternatively, the knob of the multispecific antibodies of the invention may be an anti-target/antigen arm in one embodiment. The hole of the multispecific antibodies of the invention may be an anti-CD3 arm in one embodiment. Alternatively, the hole of the multispecific antibodies of the invention may be an anti-target/antigen arm in one embodiment. Multispecific antibodies may also be engineered using immunoglobulin crossover (also known as Fab domain exchange or CrossMab format) technology (see eg., WO2009/080253; Schaefer et al*., Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108:11187-11192 (2011)). Multi-specific antibodies may also be made by engineering electrostatic steering effects for making antibody Fc-heterodimeric molecules (WO 2009/089004A1); cross-linking two or more antibodies or fragments (see, e.g., US Patent No. 4,676,980, and Brennan et al*., Science*, 229: 81 (1985)); using leucine zippers to produce bi-specific antibodies (see, e.g., Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992)); using "diabody" technology for making bispecific antibody fragments (see, e.g., Hollinger et al*., Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)); and using single-chain Fv (sFv) dimers (see,e.g. Gruber et al*., J. Immunol.*, 152:5368 (1994)); and preparing trispecific antibodies as described, e.g., in Tutt et al. *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

Engineered antibodies with three or more functional antigen binding sites, including "Octopus antibodies," are also included herein (see, e.g. US 2006/0025576A1).

The antibodies, or antibody fragments thereof, may also include a "Dual Acting FAb" or "DAF" comprising an antigen binding site that binds to CD3 as well as another, different antigen (e.g., a second biological molecule) (see, e.g., US 2008/0069820).

7. Antibody Variants

In certain embodiments, amino acid sequence variants of the anti-CD3 antibodies of the invention (e.g., bispecific anti-CD3 antibodies of the invention that bind to CD3 and a second biological molecule, e.g., a cell surface antigen, e.g., a tumor antigen, such as TDB antibodies of the invention or variants thereof) are contemplated. For example, it may be desirable to improve the binding affinity and/or other biological properties of the antibody. Amino acid sequence variants of an antibody may be prepared by introducing appropriate modifications into the nucleotide sequence encoding the antibody, or by peptide synthesis. Such modifications include, for example, deletions from, and/or insertions into and/or substitutions of residues within the amino acid sequences of the antibody. Any combination of deletion, insertion, and substitution can be made to arrive at the final construct, provided that the final construct possesses the desired characteristics, for example, antigen-binding.

a. Substitution, Insertion, and Deletion Variants

In certain embodiments, antibody variants having one or more amino acid substitutions are provided. Sites of interest for substitutional mutagenesis include the HVRs and FRs. Conservative substitutions are shown in Table 2 under the heading of "preferred substitutions." More substantial changes are provided in Table 2 under the heading of "exemplary substitutions," and as further described below in reference to amino acid side chain classes. Amino acid substitutions may be introduced into an antibody of interest and the products screened for a desired activity, for example, retained/improved antigen binding, decreased immunogenicity, or improved ADCC or CDC.

TABLE 2. Exemplary and Preferred Amino Acid Substitutions

Original Residue	Exemplary Substitutions	Preferred Substitutions
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala

Original Residue	Exemplary Substitutions	Preferred Substitutions
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucine	Leu
Leu (L)	Norleucine; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucine	Leu

Amino acids may be grouped according to common side-chain properties:

(1) hydrophobic: Norleucine, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

(2) neutral hydrophilic: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

(3) acidic: Asp, Glu;

(4) basic: His, Lys, Arg;

(5) residues that influence chain orientation: Gly, Pro;

(6) aromatic: Trp, Tyr, Phe.

Non-conservative substitutions will entail exchanging a member of one of these classes for another class.

One type of substitutional variant involves substituting one or more hypervariable region residues of a parent antibody (*e.g.* a humanized or human antibody). Generally, the resulting variant(s) selected for further study will have modifications (e.g., improvements) in certain biological properties (e.g., increased affinity, reduced immunogenicity) relative to the parent antibody and/or will have substantially retained certain biological properties of the parent antibody. An exemplary substitutional variant is an affinity matured antibody, which may be conveniently generated, e.g., using phage display-based affinity maturation techniques such as those described herein. Briefly, one or more HVR residues are mutated and the variant antibodies displayed on phage and screened for a particular biological activity (e.g. binding affinity).

Alterations (e.g., substitutions) may be made in HVRs, e.g., to improve antibody affinity. Such alterations may be made in HVR "hotspots," i.e., residues encoded by codons that undergo mutation at high frequency during the somatic maturation process (see, e.g., Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)), and/or residues that contact antigen, with the resulting variant VH or VL being tested for binding

affinity. Affinity maturation by constructing and reselecting from secondary libraries has been described, e.g., in Hoogenboom et al. in *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001).) In some embodiments of affinity maturation, diversity is introduced into the variable genes chosen for maturation by any of a variety of methods (e.g., error-prone PCR, chain shuffling, or oligonucleotide-directed mutagenesis). A secondary library is then created. The library is then screened to identify any antibody variants with the desired affinity. Another method to introduce diversity involves HVR-directed approaches, in which several HVR residues (e.g., 4-6 residues at a time) are randomized. HVR residues involved in antigen binding may be specifically identified, e.g., using alanine scanning mutagenesis or modeling. CDR-H3 and CDR-L3 in particular are often targeted.

In certain embodiments, substitutions, insertions, or deletions may occur within one or more HVRs so long as such alterations do not substantially reduce the ability of the antibody to bind antigen. For example, conservative alterations (e.g., conservative substitutions as provided herein) that do not substantially reduce binding affinity may be made in HVRs. Such alterations may, for example, be outside of antigen contacting residues in the HVRs. In certain embodiments of the variant VH and VL sequences provided above, each HVR either is unaltered, or contains no more than one, two or three amino acid substitutions.

A useful method for identification of residues or regions of an antibody that may be targeted for mutagenesis is called "alanine scanning mutagenesis" as described by Cunningham and Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085. In this method, a residue or group of target residues (e.g., charged residues such as arg, asp, his, lys, and glu) are identified and replaced by a neutral or negatively charged amino acid (e.g., alanine or polyalanine) to determine whether the interaction of the antibody with antigen is affected. Further substitutions may be introduced at the amino acid locations demonstrating functional sensitivity to the initial substitutions. Alternatively, or additionally, a crystal structure of an antigen-antibody complex to identify contact points between the antibody and antigen. Such contact residues and neighboring residues may be targeted or eliminated as candidates for substitution. Variants may be screened to determine whether they contain the desired properties.

Amino acid sequence insertions include amino- and/or carboxyl-terminal fusions ranging in length from one residue to polypeptides containing a hundred or more residues, as well as intrasequence insertions of single or multiple amino acid residues. Examples of terminal insertions include an antibody with an N-terminal methionyl residue. Other insertional variants of the antibody molecule include the fusion to the N- or C-terminus of the antibody to an enzyme (e.g. for ADEPT) or a polypeptide which increases the serum half-life of the antibody.

b. Glycosylation variants

In certain embodiments, anti-CD3 antibodies of the invention (e.g., bispecific anti-CD3 antibodies of the invention that bind to CD3 and a second biological molecule, e.g., a cell surface antigen, e.g., a tumor antigen, such as TDB antibodies of the invention or variants thereof) can be altered to increase or decrease the extent to which the antibody is glycosylated. Addition or deletion of glycosylation sites to anti-CD3

antibody of the invention may be conveniently accomplished by altering the amino acid sequence such that one or more glycosylation sites is created or removed.

Where the antibody comprises an Fc region, the carbohydrate attached thereto may be altered. Native antibodies produced by mammalian cells typically comprise a branched, biantennary oligosaccharide that is generally attached by an N-linkage to Asn297 of the CH2 domain of the Fc region. See, e.g., Wright et al. *TIBTECH* 15:26-32 (1997). The oligosaccharide may include various carbohydrates, e.g., mannose, N-acetyl glucosamine (GlcNAc), galactose, and sialic acid, as well as a fucose attached to a GlcNAc in the "stem" of the biantennary oligosaccharide structure. In some embodiments, modifications of the oligosaccharide in an antibody of the invention may be made in order to create antibody variants with certain improved properties.

In one embodiment, anti-CD3 antibody variants are provided having a carbohydrate structure that lacks fucose attached (directly or indirectly) to an Fc region. For example, the amount of fucose in such antibody may be from 1% to 80%, from 1% to 65%, from 5% to 65% or from 20% to 40%. The amount of fucose is determined by calculating the average amount of fucose within the sugar chain at Asn297, relative to the sum of all glycostructures attached to Asn 297 (e. g. complex, hybrid and high mannose structures) as measured by MALDI-TOF mass spectrometry, as described in WO 2008/077546, for example. Asn297 refers to the asparagine residue located at about position 297 in the Fc region (EU numbering of Fc region residues); however, Asn297 may also be located about ± 3 amino acids upstream or downstream of position 297, i.e., between positions 294 and 300, due to minor sequence variations in antibodies. Such fucosylation variants may have improved ADCC function. See, e.g., US Patent Publication Nos. US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Examples of publications related to "defucosylated" or "fucose-deficient" antibody variants include: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki et al. *J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004). Examples of cell lines capable of producing defucosylated antibodies include Lec13 CHO cells deficient in protein fucosylation (Ripka et al. *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); US Pat Appl No US 2003/0157108 A1, Presta, L; and WO 2004/056312 A1, Adams *et al*., especially at Example 11), and knockout cell lines, such as alpha-1,6-fucosyltransferase gene, *FUT8,* knockout CHO cells (see, e.g., Yamane-Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004); Kanda, Y. et al*., Biotechnol. Bioeng*., 94(4):680-688 (2006); and WO2003/085107).

Anti-CD3 antibodies variants are further provided with bisected oligosaccharides, for example, in which a biantennary oligosaccharide attached to the Fc region of the antibody is bisected by GlcNAc. Such antibody variants may have reduced fucosylation and/or improved ADCC function. Examples of such antibody variants are described, e.g., in WO 2003/011878 (Jean-Mairet et al.); US Patent No. 6,602,684 (Umana et al.); and US 2005/0123546 (Umana *et al*.). Antibody variants with at least one galactose residue in the oligosaccharide attached to the Fc region are also provided. Such antibody variants may have

improved CDC function. Such antibody variants are described, e.g., in WO 1997/30087 (Patel et al.); WO 1998/58964 (Raju, S.); and WO 1999/22764 (Raju, S.).

c. Fc region variants

In certain embodiments, one or more amino acid modifications may be introduced into the Fc region of an anti-CD3 antibody of the invention (e.g., a bispecific anti-CD3 antibody of the invention that binds to CD3 and a second biological molecule, e.g., a cell surface antigen, e.g., a tumor antigen, such as a TDB antibody of the invention or variant thereof), thereby generating an Fc region variant (see e.g., US 2012/0251531). The Fc region variant may comprise a human Fc region sequence (*e.g.*, a human IgG1, IgG2, IgG3 or IgG4 Fc region) comprising an amino acid modification (*e.g.*, a substitution) at one or more amino acid positions.

In certain embodiments, the invention contemplates an anti-CD3 antibody variant that possesses some but not all effector functions, which make it a desirable candidate for applications in which the half life of the antibody *in vivo* is important yet certain effector functions (such as complement and ADCC) are unnecessary or deleterious. *In vitro* and/or *in vivo* cytotoxicity assays can be conducted to confirm the reduction/depletion of CDC and/or ADCC activities. For example, Fc receptor (FcR) binding assays can be conducted to ensure that the antibody lacks FcγR binding (hence likely lacking ADCC activity), but retains FcRn binding ability. The primary cells for mediating ADCC, NK cells, express Fc(RIII only, whereas monocytes express Fc(RI, Fc(RII and Fc(RIII. FcR expression on hematopoietic cells is summarized in Table 3 on page 464 of Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991). Non-limiting examples of *in vitro* assays to assess ADCC activity of a molecule of interest is described in U.S. Patent No. 5,500,362 (see, e.g. Hellstrom, I. et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83:7059-7063 (1986)) and Hellstrom, I et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82:1499-1502 (1985); 5,821,337 (see Bruggemann, M. et al., *J. Exp. Med.* 166:1351-1361 (1987)). Alternatively, non-radioactive assays methods may be employed (see, for example, ACTI™ non-radioactive cytotoxicity assay for flow cytometry (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA; and CytoTox 96® non-radioactive cytotoxicity assay (Promega, Madison, WI). Useful effector cells for such assays include peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and Natural Killer (NK) cells. Alternatively, or additionally, ADCC activity of the molecule of interest may be assessed *in vivo*, *e.g.*, in a animal model such as that disclosed in Clynes et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 95:652-656 (1998). C1q binding assays may also be carried out to confirm that the antibody is unable to bind C1q and hence lacks CDC activity. See, e.g., C1q and C3c binding ELISA in WO 2006/029879 and WO 2005/100402. To assess complement activation, a CDC assay may be performed (see, for example, Gazzano-Santoro *et al*. *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996); Cragg, M.S. et al. *Blood.* 101:1045-1052 (2003); and Cragg, M.S. and M.J. Glennie *Blood.* 103:2738-2743 (2004)). FcRn binding and *in vivo* clearance/half life determinations can also be performed using methods known in the art (see, e.g., Petkova, S.B. et al. *Int'l. Immunol.* 18(12):1759-1769 (2006)).

Antibodies with reduced effector function include those with substitution of one or more of Fc region residues 238, 265, 269, 270, 297, 327 and 329 (U.S. Patent Nos. 6,737,056 and 8,219,149). Such Fc

mutants include Fc mutants with substitutions at two or more of amino acid positions 265, 269, 270, 297 and 327, including the so-called "DANA" Fc mutant with substitution of residues 265 and 297 to alanine (US Patent No. 7,332,581 and 8,219,149).

In certain embodiments, the proline at position 329 of a wild-type human Fc region in the antibody is substituted with glycine or arginine or an amino acid residue large enough to destroy the proline sandwich within the Fc/Fc.gamma. receptor interface that is formed between the proline 329 of the Fc and tryptophan residues Trp 87 and Trp 110 of FcgRIII (Sondermann et al.: Nature 406, 267-273 (20 Jul. 2000)). In certain embodiments, the antibody comprises at least one further amino acid substitution. In one embodiment, the further amino acid substitution is S228P, E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297D, or P331S, and still in another embodiment the at least one further amino acid substitution is L234A and L235A of the human IgG1 Fc region or S228P and L235E of the human IgG4 Fc region (see e.g., US 2012/0251531), and still in another embodiment the at least one further amino acid substitution is L234A and L235A and P329G of the human IgG1 Fc region.

Certain antibody variants with improved or diminished binding to FcRs are described. (See, e.g., U.S. Patent No. 6,737,056; WO 2004/056312, and Shields et al.*, J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001).)

In certain embodiments, an antibody variant comprises an Fc region with one or more amino acid substitutions which improve ADCC, e.g., substitutions at positions 298, 333, and/or 334 of the Fc region (EU numbering of residues).

In some embodiments, alterations are made in the Fc region that result in altered (*i.e.*, either improved or diminished) C1q binding and/or Complement Dependent Cytotoxicity (CDC), e.g., as described in US Patent No. 6,194,551, WO 99/51642, and Idusogie et al. *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

Antibodies with increased half lives and improved binding to the neonatal Fc receptor (FcRn), which is responsible for the transfer of maternal IgGs to the fetus (Guyer et al., *J. Immunol.* 117:587 (1976) and Kim et al., *J. Immunol.* 24:249 (1994)), are described in US2005/0014934A1 (Hinton et al.). Those antibodies comprise an Fc region with one or more substitutions therein which improve binding of the Fc region to FcRn. Such Fc variants include those with substitutions at one or more of Fc region residues: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 or 434, e.g., substitution of Fc region residue 434 (US Patent No. 7,371,826).

See also Duncan & Winter, *Nature* 322:738-40 (1988); U.S. Patent No. 5,648,260; U.S. Patent No. 5,624,821; and WO 94/29351 concerning other examples of Fc region variants.

In some aspects the anti-CD3 antibody (e.g., bispecific anti-CD3 antibody) comprises an Fc region comprising an N297G mutation. In some embodiments, the anti-CD3 antibody comprising the N297G mutation comprises an anti-CD3 arm comprising a first binding domain comprising the following six HVRs: (a) an HVR-H1 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1; (b) an HVR-H2 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2; (c) an HVR-H3 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3; (d) an HVR-L1 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 4; (e) an HVR-L2 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 5; and (f) an HVR-L3 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 6; and

an anti-CD20 arm comprising a second binding domain comprising the following six HVRs: (a) an HVR-H1 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 157; (b) an HVR-H2 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 158; (c) an HVR-H3 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 159; (d) an HVR-L1 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 160; (e) an HVR-L2 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 161; and (f) an HVR-L3 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 162.

In some embodiments, the anti-CD3 antibody comprising the N297G mutation comprises an anti-CD3 arm comprising a first binding domain comprising (a) a VH domain comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 184 and (b) a VL domain comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 185, and an anti-CD20 arm comprising a second binding domain comprising (a) a VH domain comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 266 and (b) a VL domain comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 267.

In some embodiments, the anti-CD3 antibody comprising the N297G mutation comprises one or more heavy chain constant domains, wherein the one or more heavy chain constant domains are selected from a first CH1 ($CH1_1$) domain, a first CH2 ($CH2_1$) domain, a first CH3 ($CH3_1$) domain, a second CH1 ($CH1_2$) domain, second CH2 ($CH2_2$) domain, and a second CH3 ($CH3_2$) domain. In some instances, at least one of the one or more heavy chain constant domains is paired with another heavy chain constant domain. In some instances, the $CH3_1$ and $CH3_2$ domains each comprise a protuberance or cavity, and wherein the protuberance or cavity in the $CH3_1$ domain is positionable in the cavity or protuberance, respectively, in the $CH3_2$ domain. In some instances, the $CH3_1$ and $CH3_2$ domains meet at an interface between said protuberance and cavity. In some instances, the $CH2_1$ and $CH2_2$ domains each comprise a protuberance or cavity, and wherein the protuberance or cavity in the $CH2_1$ domain is positionable in the cavity or protuberance, respectively, in the $CH2_2$ domain. In other instances, the $CH2_1$ and $CH2_2$ domains meet at an interface between said protuberance and cavity. In some instances, the anti-CD3 antibody is an IgG1 antibody.

In other embodiments, the anti-CD3 antibody comprising the N297G mutation comprises an anti-CD3 arm comprising a first binding domain comprising (a) a VH domain comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 184 and (b) a VL domain comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 185, and an anti-CD20 arm comprising a second binding domain comprising (a) a VH domain comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 266 and (b) a VL domain comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 267, wherein (a) the anti-CD3 arm comprises T366S, L368A, Y407V, and N297G substitution mutations and (b) the anti-CD20 arm comprises T366W and N297G substitution mutations.

d. Cysteine engineered antibody variants

In certain embodiments, it may be desirable to create cysteine engineered antibodies, e.g., "thioMAbs," in which one or more residues of an antibody are substituted with cysteine residues. In particular embodiments, the substituted residues occur at accessible sites of the antibody. By substituting those residues with cysteine, reactive thiol groups are thereby positioned at accessible sites of the antibody and may be used to conjugate the antibody to other moieties, such as drug moieties or linker-drug moieties, to

create an immunoconjugate, as described further herein. In certain embodiments, any one or more of the following residues may be substituted with cysteine: V205 (Kabat numbering) of the light chain; A118 (EU numbering) of the heavy chain; and S400 (EU numbering) of the heavy chain Fc region. Cysteine engineered antibodies may be generated as described, for example, in U.S. Patent No. 7,521,541.

e. Antibody derivatives

In certain embodiments, an anti-CD3 antibody of the invention (e.g., bispecific anti-CD3 antibody of the invention that binds to CD3 and a second biological molecule, e.g., a cell surface antigen, e.g., a tumor antigen, such as a TDB antibody of the invention or variant thereof) provided herein may be further modified to contain additional nonproteinaceous moieties that are known in the art and readily available. The moieties suitable for derivatization of the antibody include but are not limited to water soluble polymers. Non-limiting examples of water soluble polymers include, but are not limited to, polyethylene glycol (PEG), copolymers of ethylene glycol/propylene glycol, carboxymethylcellulose, dextran, polyvinyl alcohol, polyvinyl pyrrolidone, poly-1, 3-dioxolane, poly-1,3,6-trioxane, ethylene/maleic anhydride copolymer, polyaminoacids (either homopolymers or random copolymers), and dextran or poly(n-vinyl pyrrolidone)polyethylene glycol, propropylene glycol homopolymers, prolypropylene oxide/ethylene oxide co-polymers, polyoxyethylated polyols (e.g., glycerol), polyvinyl alcohol, and mixtures thereof. Polyethylene glycol propionaldehyde may have advantages in manufacturing due to its stability in water. The polymer may be of any molecular weight, and may be branched or unbranched. The number of polymers attached to the antibody may vary, and if more than one polymer are attached, they can be the same or different molecules. In general, the number and/or type of polymers used for derivatization can be determined based on considerations including, but not limited to, the particular properties or functions of the antibody to be improved, whether the antibody derivative will be used in a therapy under defined conditions, etc.

In another embodiment, conjugates of an antibody and nonproteinaceous moiety that may be selectively heated by exposure to radiation are provided. In one embodiment, the nonproteinaceous moiety is a carbon nanotube (Kam et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 11600-11605 (2005)). The radiation may be of any wavelength, and includes, but is not limited to, wavelengths that do not harm ordinary cells, but which heat the nonproteinaceous moiety to a temperature at which cells proximal to the antibody-nonproteinaceous moiety are killed.

B. Recombinant Methods and Compositions

Anti-CD3 antibodies of the invention (e.g., bispecific anti-CD3 antibodies of the invention that bind to CD3 and a second biological molecule, e.g., a cell surface antigen, e.g., a tumor antigen, such as TDB antibodies of the invention or variants thereof) may be produced using recombinant methods and compositions, for example, as described in U.S. Patent No. 4,816,567. In one embodiment, isolated nucleic acid encoding an anti-CD3 antibody described herein is provided. Such nucleic acid may encode an amino acid sequence comprising the VL and/or an amino acid sequence comprising the VH of the antibody (e.g., the light and/or heavy chains of the antibody). In a further embodiment, one or more vectors (e.g.,

expression vectors) comprising such nucleic acid are provided. In a further embodiment, a host cell comprising such nucleic acid is provided. In one such embodiment, a host cell comprises (e.g., has been transformed with): (1) a vector comprising a nucleic acid that encodes an amino acid sequence comprising the VL of the antibody and an amino acid sequence comprising the VH of the antibody, or (2) a first vector comprising a nucleic acid that encodes an amino acid sequence comprising the VL of the antibody and a second vector comprising a nucleic acid that encodes an amino acid sequence comprising the VH of the antibody. In one embodiment, the host cell is eukaryotic, e.g. a Chinese Hamster Ovary (CHO) cell or lymphoid cell (e.g., Y0, NS0, Sp20 cell). In one embodiment, a method of making an anti-CD3 antibody is provided, wherein the method comprises culturing a host cell comprising a nucleic acid encoding the antibody, as provided above, under conditions suitable for expression of the antibody, and optionally recovering the antibody from the host cell (or host cell culture medium).

For recombinant production of an anti-CD3 antibody, nucleic acid encoding an antibody, e.g., as described above, is isolated and inserted into one or more vectors for further cloning and/or expression in a host cell. Such nucleic acid may be readily isolated and sequenced using conventional procedures (e.g., by using oligonucleotide probes that are capable of binding specifically to genes encoding the heavy and light chains of the antibody).

Suitable host cells for cloning or expression of antibody-encoding vectors include prokaryotic or eukaryotic cells described herein. For example, antibodies may be produced in bacteria, in particular when glycosylation and Fc effector function are not needed. For expression of antibody fragments and polypeptides in bacteria, see, e.g., U.S. Patent Nos. 5,648,237, 5,789,199, and 5,840,523. (See also Charlton, *Methods in Molecular Biology, Vol. 248* (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254, describing expression of antibody fragments in *E. coli*.) After expression, the antibody may be isolated from the bacterial cell paste in a soluble fraction and can be further purified.

In addition to prokaryotes, eukaryotic microbes such as filamentous fungi or yeast are suitable cloning or expression hosts for antibody-encoding vectors, including fungi and yeast strains whose glycosylation pathways have been “humanized,” resulting in the production of an antibody with a partially or fully human glycosylation pattern. See Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004), and Li et al., *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006).

Suitable host cells for the expression of glycosylated antibody are also derived from multicellular organisms (invertebrates and vertebrates). Examples of invertebrate cells include plant and insect cells. Numerous baculoviral strains have been identified which may be used in conjunction with insect cells, particularly for transfection of *Spodoptera frugiperda* cells.

Plant cell cultures can also be utilized as hosts. *See,* e.g., US Patent Nos. 5,959,177, 6,040,498, 6,420,548, 7,125,978, and 6,417,429 (describing PLANTIBODIES™ technology for producing antibodies in transgenic plants).

Vertebrate cells may also be used as hosts. For example, mammalian cell lines that are adapted to grow in suspension may be useful. Other examples of useful mammalian host cell lines are monkey kidney CV1 line transformed by SV40 (COS-7); human embryonic kidney line (293 or 293 cells as described, e.g., in

Graham et al., *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); baby hamster kidney cells (BHK); mouse sertoli cells (TM4 cells as described, e.g., in Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); monkey kidney cells (CV1); African green monkey kidney cells (VERO-76); human cervical carcinoma cells (HELA); canine kidney cells (MDCK; buffalo rat liver cells (BRL 3A); human lung cells (W138); human liver cells (Hep G2); mouse mammary tumor (MMT 060562); TRI cells, as described, e.g., in Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci*. 383:44-68 (1982); MRC 5 cells; and FS4 cells. Other useful mammalian host cell lines include Chinese hamster ovary (CHO) cells, including $DHFR^-$ CHO cells (Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); and myeloma cell lines such as Y0, NS0 and Sp2/0. For a review of certain mammalian host cell lines suitable for antibody production, see, e.g., Yazaki and Wu, *Methods in Molecular Biology, Vol. 248* (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003).

C. Assays

Anti-CD3 antibodies of the invention (e.g., bispecific anti-CD3 antibodies of the invention that bind to CD3 and a second biological molecule, e.g., a cell surface antigen, e.g., a tumor antigen, such as TDB antibodies of the invention or variants thereof) provided herein may be identified, screened for, or characterized for their physical/chemical properties and/or biological activities by various assays known in the art.

1. Binding assays and other assays

In one aspect, an anti-CD3 antibody of the invention is tested for its antigen binding activity, for example, by known methods such as ELISA, Western blot, etc.

In another aspect, competition assays may be used to identify an antibody that competes with an anti-CD3 antibody of the invention for binding to CD3.

In an exemplary competition assay, immobilized CD3 is incubated in a solution comprising a first labeled antibody that binds to CD3 and a second unlabeled antibody that is being tested for its ability to compete with the first antibody for binding to CD3. The second antibody may be present in a hybridoma supernatant. As a control, immobilized CD3 is incubated in a solution comprising the first labeled antibody but not the second unlabeled antibody. After incubation under conditions permissive for binding of the first antibody to CD3, excess unbound antibody is removed, and the amount of label associated with immobilized CD3 is measured. If the amount of label associated with immobilized CD3 is substantially reduced in the test sample relative to the control sample, then that indicates that the second antibody is competing with the first antibody for binding to CD3. See, e.g., Harlow and Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*. Ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

2. Activity assays

In one aspect, assays are provided for identifying anti-CD3 antibodies thereof having biological activity. Biological activity may include, for example, binding to CD3 (e.g., CD3 on the surface of a T cell), or a peptide fragment thereof, either *in vivo*, *in vitro*, or *ex vivo*. In the case of a multispecific (e.g., bispecific)

anti-CD3 antibody of the invention (e.g., a TDB antibody having one anti-CD3 arm and one arm that recognizes a second biological molecule, e.g., a cell surface antigen, e.g., a tumor antigen), biological activity may also include, for example, effector cell activation (e.g., T cell (e.g., CD8+ and/or CD4+ T cell) activation), effector cell population expansion (i.e., an increase in T cell count), target cell population reduction (i.e., a decrease in the population of cells expressing the second biological molecule on their cell surfaces), and/or target cell killing. Antibodies having such biological activity *in vivo* and/or *in vitro* are provided. In certain embodiments, an antibody of the invention is tested for such biological activity, as described in detail in the Examples herein below.

In some embodiments, the activity comprises ability to support B cell killing and/or the activation of the cytotoxic T cells. In certain embodiments, an anti-B cell targeting anti-CD3 antibody of the invention (such as an anti-CD20 TDB) is tested for such B cell killing and/or the activation of the cytotoxic effect of T cells biological activity by any of the methods described herein, in particular the Examples. In some embodiments of any of these activity assays, PBMCs may be isolated from whole blood of healthy donors by Ficoll separation. In particular, human blood may be collected in heparinized syringes, and PBMCs isolated using Leucosep and Ficoll Paque Plus. If needed CD4+T and CD8+T cells may be separated with Miltenyi kits according to manufacturer's instructions.

Further, cells may be washed in RPMI medium containing 10% FBS, supplemented with GlutaMax, penicillin & streptomycin, and ~0.2 million suspended cells added to a 96-well U-bottom plate. Cells may be cultured in RPMI1640 supplemented with 10% FBS at 37ºC in a humidified standard cell culture incubator. For BJAB cell killing assays, 20,000 BJAB cells may be incubated with effector cells, either as huPBMCs or purified T cells, as indicated ratios per assay, in the presence of various concentrations of TDB antibodies for 24 hours. For endogenous B cell killing assays, 200,000 huPBMCs may be incubated with various concentrations of TDB antibodies for 24 hours.

After culturing, cells may be washed with FACS buffer (0.5% BSA, 0.05% Na Azide in PBS). Cells may then be stained in FACS buffer, washed with FACS buffer and suspended in 100µl of FACS buffer containing 1µg/ml Propidium Iodide. Data may be collected on a FACSCalibur flow cytometer and analyzed using FlowJo. Live B cells may be gated out as PI-CD19+ or PI-CD20+ B cells by FACS, and absolute cell count may be obtained with FITC beads added to reaction mix as an internal counting control. The percent (%) of cell killing may be calculated based on non-TDB treated controls. Activated T cells may be detected by CD69 and CD25 surface expression using anti-CD69-FITC and anti-CD25-PE.

D. Immunoconjugates

The invention also provides immunoconjugates comprising an anti-CD3 antibody herein conjugated to one or more cytotoxic agents, such as chemotherapeutic agents or drugs, growth inhibitory agents, toxins (e.g., protein toxins, enzymatically active toxins of bacterial, fungal, plant, or animal origin, or fragments thereof), or radioactive isotopes.

In one embodiment, an immunoconjugate is an antibody-drug conjugate (ADC) in which an antibody is conjugated to one or more drugs, including but not limited to a maytansinoid (see U.S. Patent Nos.

5,208,020, 5,416,064 and European Patent EP 0 425 235 B1); an auristatin such as monomethylauristatin drug moieties DE and DF (MMAE and MMAF) (see U.S. Patent Nos. 5,635,483 and 5,780,588, and 7,498,298); a dolastatin; a calicheamicin or derivative thereof (see U.S. Patent Nos. 5,712,374, 5,714,586, 5,739,116, 5,767,285, 5,770,701, 5,770,710, 5,773,001, and 5,877,296; Hinman et al., *Cancer Res.* 53:3336-3342 (1993); and Lode et al., *Cancer Res.* 58:2925-2928 (1998)); an anthracycline such as daunomycin or doxorubicin (see Kratz et al., *Current Med. Chem.* 13:477-523 (2006); Jeffrey et al., *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 16:358-362 (2006); Torgov et al., *Bioconj. Chem.* 16:717-721 (2005); Nagy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:829-834 (2000); Dubowchik et al., *Bioorg. & Med. Chem. Letters* 12:1529-1532 (2002); King et al., *J. Med. Chem.* 45:4336-4343 (2002); and U.S. Patent No. 6,630,579); methotrexate; vindesine; a taxane such as docetaxel, paclitaxel, larotaxel, tesetaxel, and ortataxel; a trichothecene; and CC1065.

In another embodiment, an immunoconjugate comprises an anti-CD3 antibody as described herein conjugated to an enzymatically active toxin or fragment thereof, including but not limited to diphtheria A chain, nonbinding active fragments of diphtheria toxin, exotoxin A chain (from Pseudomonas aeruginosa), ricin A chain, abrin A chain, modeccin A chain, alpha-sarcin, Aleurites fordii proteins, dianthin proteins, Phytolaca americana proteins (PAPI, PAPII, and PAP-S), momordica charantia inhibitor, curcin, crotin, sapaonaria officinalis inhibitor, gelonin, mitogellin, restrictocin, phenomycin, enomycin, and the tricothecenes.

In another embodiment, an immunoconjugate comprises an anti-CD3 antibody as described herein conjugated to a radioactive atom to form a radioconjugate. A variety of radioactive isotopes are available for the production of radioconjugates. Examples include At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32}, Pb^{212} and radioactive isotopes of Lu. When the radioconjugate is used for detection, it may comprise a radioactive atom for scintigraphic studies, for example tc99m or I123, or a spin label for nuclear magnetic resonance (NMR) imaging (also known as magnetic resonance imaging, mri), such as iodine-123 again, iodine-131, indium-111, fluorine-19, carbon-13, nitrogen-15, oxygen-17, gadolinium, manganese or iron.

Conjugates of an antibody and cytotoxic agent may be made using a variety of bifunctional protein coupling agents such as N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio) propionate (SPDP), succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate (SMCC), iminothiolane (IT), bifunctional derivatives of imidoesters (such as dimethyl adipimidate HCl), active esters (such as disuccinimidyl suberate), aldehydes (such as glutaraldehyde), bis-azido compounds (such as bis (p-azidobenzoyl) hexanediamine), bis-diazonium derivatives (such as bis-(p-diazoniumbenzoyl)-ethylenediamine), diisocyanates (such as toluene 2,6-diisocyanate), and bis-active fluorine compounds (such as 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene). For example, a ricin immunotoxin can be prepared as described in Vitetta et al., *Science* 238:1098 (1987). Carbon-14-labeled 1-isothiocyanatobenzyl-3-methyldiethylene triaminepentaacetic acid (MX-DTPA) is an exemplary chelating agent for conjugation of radionucleotide to the antibody. See WO94/11026. The linker may be a "cleavable linker" facilitating release of a cytotoxic drug in the cell. For example, an acid-labile linker, peptidase-sensitive linker, photolabile linker, dimethyl linker or disulfide-containing linker (Chari et al., *Cancer Res.* 52:127-131 (1992); U.S. Patent No. 5,208,020) may be used.

The immunuoconjugates or ADCs herein expressly contemplate, but are not limited to such conjugates prepared with cross-linker reagents including, but not limited to, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS,

LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC, and sulfo-SMPB, and SVSB (succinimidyl-(4-vinylsulfone)benzoate) which are commercially available (e.g., from Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A).

E. Methods and Compositions for Diagnostics and Detection

In certain embodiments, any of the anti-CD3 antibodies of the invention (e.g., bispecific anti-CD3 antibodies of the invention that bind to CD3 and a second biological molecule, e.g., a cell surface antigen, e.g., a tumor antigen, such as TDB antibodies of the invention or variants thereof) is useful for detecting the presence of CD3 in a biological sample. The term "detecting" as used herein encompasses quantitative or qualitative detection. In certain embodiments, a biological sample comprises a cell or tissue.

In one embodiment, an anti-CD3 antibody for use in a method of diagnosis or detection is provided. In a further aspect, a method of detecting the presence of CD3 in a biological sample is provided. In certain embodiments, the method comprises contacting the biological sample with an anti-CD3 antibody as described herein under conditions permissive for binding of the anti-CD3 antibody to CD3, and detecting whether a complex is formed between the anti-CD3 antibody and CD3. Such method may be an *in vitro* or *in vivo* method.

In certain embodiments, labeled anti-CD3 antibodies are provided. Labels include, but are not limited to, labels or moieties that are detected directly (such as fluorescent, chromophoric, electron-dense, chemiluminescent, and radioactive labels), as well as moieties, such as enzymes or ligands, that are detected indirectly, e.g., through an enzymatic reaction or molecular interaction. Exemplary labels include, but are not limited to, the radioisotopes ^{32}P, ^{14}C, ^{125}I, ^{3}H, and ^{131}I, fluorophores such as rare earth chelates or fluorescein and its derivatives, rhodamine and its derivatives, dansyl, umbelliferone, luceriferases, e.g., firefly luciferase and bacterial luciferase (U.S. Patent No. 4,737,456), luciferin, 2,3-dihydrophthalazinediones, horseradish peroxidase (HRP), alkaline phosphatase, β-galactosidase, glucoamylase, lysozyme, saccharide oxidases, e.g., glucose oxidase, galactose oxidase, and glucose-6-phosphate dehydrogenase, heterocyclic oxidases such as uricase and xanthine oxidase, coupled with an enzyme that employs hydrogen peroxide to oxidize a dye precursor such as HRP, lactoperoxidase, or microperoxidase, biotin/avidin, spin labels, bacteriophage labels, stable free radicals, and the like.

F. Pharmaceutical Formulations

Pharmaceutical formulations of an anti-CD3 antibody of the invention (e.g., bispecific anti-CD3 antibody of the invention that binds to CD3 and a second biological molecule, e.g., a cell surface antigen, e.g., a tumor antigen, such as a TDB antibody of the invention or variant thereof) are prepared by mixing such antibody having the desired degree of purity with one or more optional pharmaceutically acceptable carriers (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), in the form of lyophilized formulations or aqueous solutions. Pharmaceutically acceptable carriers are generally nontoxic to recipients at the dosages and concentrations employed, and include, but are not limited to: buffers such as phosphate, citrate, and other organic acids; antioxidants including ascorbic acid and methionine; preservatives (such as

octadecyldimethylbenzyl ammonium chloride; hexamethonium chloride; benzalkonium chloride; benzethonium chloride; phenol, butyl or benzyl alcohol; alkyl parabens such as methyl or propyl paraben; catechol; resorcinol; cyclohexanol; 3-pentanol; and m-cresol); low molecular weight (less than about 10 residues) polypeptides; proteins, such as serum albumin, gelatin, or immunoglobulins; hydrophilic polymers such as polyvinylpyrrolidone; amino acids such as glycine, glutamine, asparagine, histidine, arginine, or lysine; monosaccharides, disaccharides, and other carbohydrates including glucose, mannose, or dextrins; chelating agents such as EDTA; sugars such as sucrose, mannitol, trehalose or sorbitol; salt-forming counter-ions such as sodium; metal complexes (*e.g.* Zn-protein complexes); and/or non-ionic surfactants such as polyethylene glycol (PEG). Exemplary pharmaceutically acceptable carriers herein further include insterstitial drug dispersion agents such as soluble neutral-active hyaluronidase glycoproteins (sHASEGP), for example, human soluble PH-20 hyaluronidase glycoproteins, such as rHuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.). Certain exemplary sHASEGPs and methods of use, including rHuPH20, are described in US Patent Publication Nos. 2005/0260186 and 2006/0104968. In one aspect, a sHASEGP is combined with one or more additional glycosaminoglycanases such as chondroitinases.

Exemplary lyophilized antibody formulations are described in US Patent No. 6,267,958. Aqueous antibody formulations include those described in US Patent No. 6,171,586 and WO2006/044908, the latter formulations including a histidine-acetate buffer.

The formulation herein may also contain more than one active ingredients as necessary for the particular indication being treated, preferably those with complementary activities that do not adversely affect each other. For example, it may be desirable to further provide an additional therapeutic agent (e.g., a chemotherapeutic agent, a cytotoxic agent, a growth inhibitory agent, and/or an anti-hormonal agent, such as those recited herein above). Such active ingredients are suitably present in combination in amounts that are effective for the purpose intended.

Active ingredients may be entrapped in microcapsules prepared, for example, by coacervation techniques or by interfacial polymerization, for example, hydroxymethylcellulose or gelatin-microcapsules and poly-(methylmethacylate) microcapsules, respectively, in colloidal drug delivery systems (for example, liposomes, albumin microspheres, microemulsions, nano-particles and nanocapsules) or in macroemulsions. Such techniques are disclosed in *Remington's Pharmaceutical Sciences* 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).

Sustained-release preparations may be prepared. Suitable examples of sustained-release preparations include semipermeable matrices of solid hydrophobic polymers containing the antibody, which matrices are in the form of shaped articles, for example, films, or microcapsules.

The formulations to be used for *in vivo* administration are generally sterile. Sterility may be readily accomplished, e.g., by filtration through sterile filtration membranes.

G. Therapeutic Methods and Compositions

Any of the anti-CD3 antibodies of the invention (e.g., bispecific anti-CD3 antibodies of the invention that bind to CD3 and a second biological molecule, e.g., a cell surface antigen, e.g., a tumor antigen, such as TDB antibodies of the invention or variants thereof) may be used in therapeutic methods.

In one aspect, an anti-CD3 antibody for use as a medicament is provided. In further aspects, an anti-CD3 antibody for use in treating or delaying progression of a cell proliferative disorder (e.g., cancer) or an autoimmune disorder (e.g., arthritis) is provided. In certain embodiments, an anti-CD3 antibody for use in a method of treatment is provided. In certain embodiments, the invention provides an anti-CD3 antibody for use in a method of treating an individual having a cell proliferative disorder or an autoimmune disorder comprising administering to the individual an effective amount of the anti-CD3 antibody. In one such embodiment, the method further comprises administering to the individual an effective amount of at least one additional therapeutic agent, for example, as described below. In further embodiments, the invention provides an anti-CD3 antibody for use in enhancing immune function in an individual having a cell proliferative disorder or an autoimmune disorder. In certain embodiments, the invention provides an anti-CD3 antibody for use in a method of enhancing immune function in an individual having a cell proliferative disorder or an autoimmune disorder comprising administering to the individual an effective of the anti-CD3 antibody to activate effector cells (e.g., T cells, e.g., CD8+ and/or CD4+ T cells), expand (increase) an effector cell population, reduce a target cell (e.g., a cell expressing a second biological molecule recognized by an anti-CD3 antibody of the invention, such as a bispecific TDB antibody of the invention) population, and/or kill a target cell (e.g., target tumor cell). An “individual” according to any of the above embodiments may be a human.

In a further aspect, the invention provides for the use of an anti-CD3 antibody in the manufacture or preparation of a medicament. In one embodiment, the medicament is for treatment of a cell proliferative disorder (e.g., cancer) or an autoimmune disorder (e.g., arthritis). In a further embodiment, the medicament is for use in a method of treating a cell proliferative disorder or an autoimmune disorder comprising administering to an individual having a cell proliferative disorder or an autoimmune disorder an effective amount of the medicament. In one such embodiment, the method further comprises administering to the individual an effective amount of at least one additional therapeutic agent, for example, as described below. In a further embodiment, the medicament is for activating effector cells (e.g., T cells, e.g., CD8+ and/or CD4+ T cells), expanding (increasing) an effector cell population, reducing a target cell (e.g., a cell expressing a second biological molecule recognized by an anti-CD3 antibody of the invention, such as a bispecific TDB antibody of the invention) population, and/or killing target cells (e.g., target tumor cells) in the individual. In a further embodiment, the medicament is for use in a method of enhancing immune function in an individual having a cell proliferative disorder or an autoimmune disorder comprising administering to the individual an amount effective of the medicament to activate effector cells (e.g., T cells, e.g., CD8+ and/or CD4+ T cells), expand (increase) an effector cell population, reduce a target cell (e.g., a cell expressing a second biological molecule recognized by an anti-CD3 antibody of the invention, such as a bispecific TDB antibody of the invention) population, and/or kill a target cell (e.g., target tumor cell). An “individual” according to any of the above embodiments may be a human.

In a further aspect, the invention provides a method for treating a cell proliferative disorder (e.g., cancer) or an autoimmune disorder (e.g., arthritis). In one embodiment, the method comprises administering to an individual having such a cell proliferative disorder or an autoimmune disorder an effective amount of an

anti-CD3 antibody. In one such embodiment, the method further comprises administering to the individual an effective amount of at least one additional therapeutic agent, for example, as described below. An "individual" according to any of the above embodiments may be a human.

In a further aspect, the invention provides a method for enhancing immune function in an individual having a cell proliferative disorder or an autoimmune disorder in an individual having a cell proliferative disorder or an autoimmune disorder. In one embodiment, the method comprises administering to the individual an effective amount of an anti-CD3 antibody to activate effector cells (e.g., T cells, e.g., CD8+ and/or CD4+ T cells), expand (increase) an effector cell population, reduce a target cell (e.g., a cell expressing a second biological molecule recognized by an anti-CD3 antibody of the invention, such as a bispecific TDB antibody of the invention) population, and/or kill a target cell (e.g., target tumor cell). In one embodiment, an "individual" is a human.

In a further aspect, the invention provides a method for treating a hematological cancer, such as a B cell cancer (for example, mature B-cell lymphoma) by administering an effective amount of an anti-CD3 antibody of the invention, such as a bispecific TDB antibody of the invention, such as an anti-B cell targeting TDB, such as a CD20-TDB having an anti-CD3 arm and an anti-CD20 arm. In a further aspect of the embodiment, the mature B-cell lymphoma is a Non-Hodgkin's Lymphoma (NHL). In a further aspect of the embodiment, the NHL is selected from the group comprising: germinal-center B-cell-like (GCB) DLBCL, activated B-cell-like (ABC) DLBCL, follicular lymphoma (FL), mantle cell lymphoma (MCL), acute myeloid leukemia (AML), chronic lymphoid leukemia (CLL), marginal zone lymphoma (MZL), small lymphocytic leukemia (SLL), lymphoplasmacytic lymphoma (LL), Waldenstrom macroglobulinemia (WM), central nervous system lymphoma (CNSL), Burkitt's lymphoma (BL), B-cell prolymphocytic leukemia, Splenic marginal zone lymphoma, Hairy cell leukemia, Splenic lymphoma/leukemia, unclassifiable, Splenic diffuse red pulp small B-cell lymphoma, Hairy cell leukemia variant, Waldenström macroglobulinemia, Heavy chain diseases, α Heavy chain disease, γ Heavy chain disease, μ Heavy chain disease, Plasma cell myeloma, Solitary plasmacytoma of bone, Extraosseous plasmacytoma, Extranodal marginal zone lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma), Nodal marginal zone lymphoma, Pediatric nodal marginal zone lymphoma, Pediatric follicular lymphoma, Primary cutaneous follicle centre lymphoma, T-cell/histiocyte rich large B-cell lymphoma, Primary DLBCL of the CNS, Primary cutaneous DLBCL, leg type, EBV-positive DLBCL of the elderly, DLBCL associated with chronic inflammation, Lymphomatoid granulomatosis, Primary mediastinal (thymic) large B-cell lymphoma, Intravascular large B-cell lymphoma, ALK-positive large B-cell lymphoma, Plasmablastic lymphoma, Large B-cell lymphoma arising in HHV8-associated multicentric Castleman disease, Primary effusion lymphoma: B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and Burkitt lymphoma, and B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and classical Hodgkin lymphoma. In a preferred embodiment of the invention, the method comprises treating a cancer comprising germinal-center B-cell-like (GCB) DLBCL, activated B-cell-like (ABC) DLBCL, follicular lymphoma (FL), mantle cell lymphoma (MCL), acute myeloid leukemia (AML), chronic lymphoid leukemia (CLL), marginal zone lymphoma (MZL), small

lymphocytic leukemia (SLL), lymphoplasmacytic lymphoma (LL), Waldenstrom macroglobulinemia (WM), central nervous system lymphoma (CNSL), or Burkitt's lymphoma (BL).

In one embodiment, the method comprises administering to an individual having such a hematological cancer (for example, B cell cancer, for example, B cell lymphoma) an effective amount of an anti-CD3 antibody of the invention, such as a bispecific TDB antibody, such as a CD20 TDB comprising an anti-CD20 targeting arm and an anti-CD3 targeting arm. obinutuzumab. In one embodiment, a CD20 TDB is co-administered with obinutuzumab and rituximab.

In one further embodiment, the anti-CD3 antibody of the invention (for example, the CD20 TDB), with or without a CD20 monoclonal antibody, is administered with a further chemotherapy agent and/or an antibody-drug conjugate (ADC).

In one other embodiment the therapeutic agent is a biological modifier.

In a further aspect of the invention, the additional therapy comprises an anti-CD20 antibody. In one embodiment, the anti-CD20 antibody is rituximab. In one embodiment, the anti-CD20 antibody is a humanized B-Ly1 antibody. In one embodiment, the humanized B-Ly1 antibody is obinituzumab. In one embodiment, the anti-CD20 antibody is ofatumumab, ublituximab, and/or ibritumomab tiuxetan.

In a further aspect of the invention, the additional therapy comprises an alkylating agent. In one embodiment, the alkylating agent is 4-[5-[Bis(2-chloroethyl)amino]-1-methylbenzimidazol-2-yl]butanoic acid and salts thereof. In one embodiment, the alkylating agent is bendamustine.

In a further aspect of the invention, the additional therapy comprises a BCL-2 inhibitor. In one embodiment, the BCL-2 inhibitor is 4-(4-{[2-(4-chlorophenyl)-4,4-dimethylcyclohex-1-en-1-yl]methyl}piperazin-1-yl)-N-({3-nitro-4-[(tetrahydro-2H-pyran-4-ylmethyl)amino]phenyl}sulfonyl)-2-(1H-pyrrolo[2,3-b]pyridin-5-yloxy)benzamide and salts thereof. In one embodiment, the BCL-2 inhibitor is venetoclax (CAS#: 1257044-40-8).

In a further aspect of the invention, the additional therapy comprises a phosphoinositide 3-kinase (PI3K) inhibitor. In one embodiment, the PI3K inhibitor inhibits delta isoform PI3K (*i.e.*, P110δ). In some embodiments, the PI3K inhibitor is 5-Fluoro-3-phenyl-2-[(1S)-1-(7H-purin-6-ylamino)propyl]-4(3H)-quinazolinone and salts thereof. In some embodiments, the PI3K inhibitor is idelalisib (CAS#: 870281-82-6). In one embodiment, the PI3K inhibitor inhibits alpha and delta isoforms of PI3K. In some embodiments, the PI3K inhibitor is 2-{3-[2-(1-Isopropyl-3-methyl-1H-1,2–4-triazol-5-yl)-5,6-dihydrobenzo[f]imidazo[1,2-d][1,4]oxazepin-9-yl]-1H-pyrazol-1-yl}-2-methylpropanamide and salts thereof.

In a further aspect of the invention, the additional therapy comprises a Bruton's tyrosine kinase (BTK) inhibitor. In one embodiment, the BTK inhibitor is 1-[(3R)-3-[4-Amino-3-(4-phenoxyphenyl)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-1-yl]piperidin-1-yl]prop-2-en-1-one and salts thereof. In one embodiment, the BTK inhibitor is ibrutinib (CAS#: 936563-96-1).

In a further aspect of the invention, the additional therapy comprises thalidomide or a derivative thereof. In one embodiment, the thalidomide or a derivative thereof is (RS)-3-(4-Amino-1-oxo 1,3-dihydro-2H-isoindol- 2-yl)piperidine-2,6-dione and salts thereof. In one embodiment, the thalidomide or a derivative thereof is lendalidomide (CAS#: 191732-72-6).

In a further aspect of the invention, the additional therapy comprises one or more of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, or prednisolone (CHOP). In one embodiment, the additional therapy further comprises an anti-CD20 antibody as described above (*e.g.*, GA-101 and/or Rituxan®). Any of the above methods and therapies may be used, without limitation, for any cancer, including, for example, treatment of a B-cell cancer or breast cancer.

In a further aspect, the invention provides a method for treating HER2-positive cancers. In one embodiment, the method comprises administering to an individual having such a cancer an effective amount of an anti-HER2 antibody of the invention, such as a bispecific TDB antibody wih an anti-HER2 targeting arm and an anti-CD3 targeting arm. In a preferred embodiment, the HER2-TDB possesses an acceptable toxicity profile when administered in an effective dose in a patient. In one embodiment, the CD3 arm of the HER2-TDB with an acceptable toxicity profile is a low affinity CD3 arm. In one embodiment, the CD3 arm of the HER2-TDB with an acceptable toxicity profile is 40G5c.

In a preferable embodiment, the HER2-positive cancer is a HER2-positive breast cancer or HER2-positive gastric cancer. In one embodiment, a HER2 TDB is co-administered with one or more additional therapeutic agents that target the HER pathway. In one embodiment, the therapeutic agent that targets the HER pathway is selected from an EGFR inhibitor, a HER2 inhibitor, a HER3 inhibitor, and/or a HER4 inhibitor. In one embodiment, a HER2 TDB is co-administered with one or more additional therapeutic agents selected from trastuzumab (Herceptin®), T-DM1 (Kadcyla®) and pertuzumab (Perjeta®). In one embodiment, a HER2 TDB is co-administered with trastuzumab. In one embodiment, a HER2 TDB is co-administered with T-DM1. In one embodiment, a HER2 TDB is co-administered with pertuzumab. In one embodiment, a HER2 TDB is co-administered with trastuzumab and pertuzumab. In one embodiment, a HER2 TDB is co-administered with T-DM1 and pertuzumab.

In a further aspect, the invention provides pharmaceutical formulations comprising any of the anti-CD3 antibodies provided herein, e.g., for use in any of the above therapeutic methods. In one embodiment, a pharmaceutical formulation comprises any of the anti-CD3 antibodies provided herein and a pharmaceutically acceptable carrier. In another embodiment, a pharmaceutical formulation comprises any of the anti-CD3 antibodies provided herein and at least one additional therapeutic agent, for example, as described herein.

Antibodies of the invention can be used either alone or in combination with other agents in a therapy. For instance, an antibody of the invention may be co-administered with at least one additional therapeutic agent. In certain embodiments, an additional therapeutic agent is a chemotherapeutic agent, growth inhibitory agent, cytotoxic agent, agent used in radiation therapy, anti-angiogenesis agent, apoptotic agent, anti-tubulin agent, or other agent, such as a epidermal growth factor receptor (EGFR) antagonist (*e.g.*, a tyrosine kinase inhibitor), HER1/EGFR inhibitor (*e.g.*, erlotinib (Tarceva™), platelet derived growth factor inhibitor (*e.g.*, Gleevec™ (Imatinib Mesylate)), a COX-2 inhibitor (*e.g.*, celecoxib), interferon, cytokine, antibody other than the anti-CD3 antibody of the invention, such as an antibody that bind to one or more of the following targets ErbB2, ErbB3, ErbB4, PDGFR-beta, BlyS, APRIL, BCMA VEGF, or VEGF receptor(s), TRAIL/Apo2, PD-1, PD-L1, PD-L2, or another bioactive or organic chemical agent.

In some embodiments, the invention provides a method wherein the additional therapeutic agent is a glucocorticoid. In one embodiment, the glucocorticoid is dexamethasone.

Such combination therapies noted above encompass combined administration (where two or more therapeutic agents are included in the same or separate formulations), and separate administration, in which case, administration of the antibody of the invention can occur prior to, simultaneously, and/or following, administration of the additional therapeutic agent or agents. In one embodiment, administration of the anti-CD3 antibody and administration of an additional therapeutic agent occur within about one month, or within about one, two or three weeks, or within about one, two, three, four, five, or six days, of each other. Anti-CD3 antibodies of the invention (e.g., bispecific anti-CD3 antibodies of the invention that bind to CD3 and a second biological molecule, e.g., a cell surface antigen, e.g., a tumor antigen, such as a TDB antibody of the invention or variant thereof) can also be used in combination with radiation therapy.

An antibody of the invention (and/or any additional therapeutic agent) can be administered by any suitable means, including parenteral, intrapulmonary, and intranasal, and, if desired for local treatment, intralesional administration. Parenteral infusions include intramuscular, intravenous, intraarterial, intraperitoneal, or subcutaneous administration. In some embodiments, the antibody is administered by subcutaneous administration. In some embodiments, an anti-CD3 antibody administered by subcutaneous injection exhibits a less toxic response in a patient than the same anti-CD3 antibody administed by intravenous injection. Dosing can be by any suitable route, for example, by injections, such as intravenous or subcutaneous injections, depending in part on whether the administration is brief or chronic. Various dosing schedules including but not limited to single or multiple administrations over various time-points, bolus administration, and pulse infusion are contemplated herein.

Antibodies of the invention would be formulated, dosed, and administered in a fashion consistent with good medical practice. Factors for consideration in this context include the particular disorder being treated, the particular mammal being treated, the clinical condition of the individual patient, the cause of the disorder, the site of delivery of the agent, the method of administration, the scheduling of administration, and other factors known to medical practitioners. The antibody need not be, but is optionally formulated with one or more agents currently used to prevent or treat the disorder in question. The effective amount of such other agents depends on the amount of antibody present in the formulation, the type of disorder or treatment, and other factors discussed above. These are generally used in the same dosages and with administration routes as described herein, or about from 1 to 99% of the dosages described herein, or in any dosage and by any route that is empirically/clinically determined to be appropriate.

For the prevention or treatment of disease, the appropriate dosage of an antibody of the invention (when used alone or in combination with one or more other additional therapeutic agents) will depend on the type of disease to be treated, the type of antibody, the severity and course of the disease, whether the antibody is administered for preventive or therapeutic purposes, previous therapy, the patient's clinical history and response to the antibody, and the discretion of the attending physician. The antibody is suitably administered to the patient at one time or over a series of treatments.

As a general proposition, the therapeutically effective amount of the anti-CD3 antibody administered to human will be in the range of about 0.01 to about 100 mg/kg of patient body weight whether by one or more administrations. In some embodiments, the antibody used is about 0.01 to about 45 mg/kg, about 0.01 to about 40 mg/kg, about 0.01 to about 35 mg/kg, about 0.01 to about 30 mg/kg, about 0.01 to about 25 mg/kg, about 0.01 to about 20 mg/kg, about 0.01 to about 15 mg/kg, about 0.01 to about 10 mg/kg, about 0.01 to about 5 mg/kg, or about 0.01 to about 1 mg/kg administered daily, for example. In one embodiment, an anti-CD3 antibody described herein is administered to a human at a dose of about 100 mg, about 200 mg, about 300 mg, about 400 mg, about 500 mg, about 600 mg, about 700 mg, about 800 mg, about 900 mg, about 1000 mg, about 1100 mg, about 1200 mg, about 1300 mg or about 1400 mg on day 1 of 21-day cycles. The dose may be administered as a single dose or as multiple doses (e.g., 2 or 3 doses), such as infusions. For repeated administrations over several days or longer, depending on the condition, the treatment would generally be sustained until a desired suppression of disease symptoms occurs. One exemplary dosage of the antibody would be in the range from about 0.05 mg/kg to about 10 mg/kg. Thus, one or more doses of about 0.5 mg/kg, 2.0 mg/kg, 4.0 mg/kg, or 10 mg/kg (or any combination thereof) may be administered to the patient. Such doses may be administered intermittently, for example, every week or every three weeks (e.g., such that the patient receives from about two to about twenty, or, for example, about six doses of the anti-CD3 antibody). An initial higher loading dose, followed by one or more lower doses may be administered. The progress of this therapy is easily monitored by conventional techniques and assays.

In some embodiments, the methods may further comprise an additional therapy. The additional therapy may be radiation therapy, surgery, chemotherapy, gene therapy, DNA therapy, viral therapy, RNA therapy, immunotherapy, bone marrow transplantation, nanotherapy, monoclonal antibody therapy, or a combination of the foregoing. The additional therapy may be in the form of adjuvant or neoadjuvant therapy. In some embodiments, the additional therapy is the administration of small molecule enzymatic inhibitor or anti-metastatic agent. In some embodiments, the additional therapy is the administration of side-effect limiting agents (e.g., agents intended to lessen the occurrence and/or severity of side effects of treatment, such as anti-nausea agents, etc.). In some embodiments, the additional therapy is radiation therapy. In some embodiments, the additional therapy is surgery. In some embodiments, the additional therapy is a combination of radiation therapy and surgery. In some embodiments, the additional therapy is gamma irradiation. In some embodiments, the additional therapy may be a separate administration of one or more of the thereapeutic agents described above.

H. Articles of Manufacture

In another aspect of the invention, an article of manufacture containing materials useful for the treatment, prevention and/or diagnosis of the disorders described above is provided. The article of manufacture comprises a container and a label or package insert on or associated with the container. Suitable containers include, for example, bottles, vials, syringes, IV solution bags, etc. The containers may be formed from a variety of materials such as glass or plastic. The container holds a composition which is by itself or combined with another composition effective for treating, preventing and/or diagnosing the condition

and may have a sterile access port (for example the container may be an intravenous solution bag or a vial having a stopper pierceable by a hypodermic injection needle). At least one active agent in the composition is an antibody of the invention. The label or package insert indicates that the composition is used for treating the condition of choice. Moreover, the article of manufacture may comprise (a) a first container with a composition contained therein, wherein the composition comprises an antibody of the invention; and (b) a second container with a composition contained therein, wherein the composition comprises a further cytotoxic or otherwise therapeutic agent. The article of manufacture in this embodiment of the invention may further comprise a package insert indicating that the compositions can be used to treat a particular condition. Alternatively, or additionally, the article of manufacture may further comprise a second (or third) container comprising a pharmaceutically-acceptable buffer, such as bacteriostatic water for injection (BWFI), phosphate-buffered saline, Ringer's solution and dextrose solution. It may further include other materials desirable from a commercial and user standpoint, including other buffers, diluents, filters, needles, and syringes.

III. EXAMPLES

The following are examples of methods and compositions of the invention. It is understood that various other embodiments may be practiced, given the general description provided above.

Example 1. Generation of Anti-CD3 Antibodies

CD3ε Antigens

A. Bispecific human and cyno CD3ε + CD3γ fused to mouse IgG2a-Fc (CD3εγ-muFc)

cDNA encoding extracellular portions of human or cynomolgus monkey (cyno) CD3ε or CD3γ was fused at the C-terminus to a mouse IgG2a Fc to generate CD3-Fc fusions. The cDNAs encoding extracellular domains of human or cyno CD3ε and CD3γ were generated using total RNA from anti-CD3/anti-CD28-activated peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). Normal PBMCs were activated by plate-immobilized anti-CD3 and anti-CD28 in RPMI supplemented with 10% FBS for 72h. Total mRNA was isolated using an RNeasy mini kit from Qiagen. cDNA was cloned using gene-specific primers by RT-PCR into TOPO vectors using Taq polymerase-amplified PCR products following the protocol provided with the TOPO TA cloning kit from Invitrogen. The resulting fragments were introduced into a mammalian expression vector containing a murine IgG2a Fc domain by restriction-free subcloning using Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, Catalog # M0530L). The CD3 fragments were thus amplified with overlapping regions contained in the template plasmid to orient them directly downstream of the signal sequence and N-terminal to the murine Fc.

For both human and cyno constructs, the CD3ε-Fc containing plasmid was transiently co-expressed with the CD3γ-Fc containing plasmid in mammalian CHO cells. Heterodimers of CD3ε/γ were purified by Protein A-Sepharose (Pharmacia Biotech).

B. N-terminal peptide-KLH conjugates (CD3ε-KLH)

Peptide fragments containing N-terminal sequences of cyno and human CD3ε were synthesized. The fragments intended for immunization were conjugated to keyhole limpet hemocyanin (KLH), a widely used carrier protein for generating a substantial immune response. Appending the naturally occurring cysteine at position 28 for cyno and human CD3ε allowed for coupling of maleimide-activated KLH to the thiol-containing C-terminal cysteine.

C. Single chain CD3ε-26mer-CD3γ (CD3εγ)

The cDNAs encoding extracellular portions of human CD3ε and CD3γ subunits were generated by PCR. Amino acids 1-97 of human CD3ε and amino acids 1-81 of human CD3γ were connected using a flexible peptide linker of 26 amino acids to form a CD3ε-26mer-CD3γ construct (CD3εγ) (Figure 1). The construct was cloned into an expression vector with a His-tag for secretion from *E. coli* using the alkaline phosphotase promoter and the STIII secretion signal sequence. CD3εγ was purified on a Ni column and subsequently refolded. Properly folded CD3εγ was then purified using an OKT3 affinity column.

In addition for some binding experiments, commercial CD3ε was purchased from Creative Biomart, Shirley, New York 11967 (Catalog number CD3E-2194H).

Immunizations

A. Mouse immunizations

BALB/c or C57BL/6 mice were immunized (2 µg or 10 µg/injection per mouse). Antigens, suspended in monophosphoryl lipid A/trehalose dicorynomycolate adjuvant, were injected into the footpad at 3- to 4-day intervals for a total of 12-15 boosts. Three days after the final pre-fusion boost, lymphocytes from immunized mice spleens and lymph nodes were harvested. Isolated mouse lymphocytes were fused with SP2/0-Ag14 myeloma cells (American Type Culture Collection) by using the Cyto Pulse CEEF-50 apparatus (Cyto Pulse Sciences). Briefly, after washing twice with Cytofusion Medium C (Cat# LCM-C), the isolated spleen cells and SP2/0-Ag14 cells were mixed at a 1:1 ratio and then suspended at 10 million cells/ml in Cytofusion Medium C, electrofusion was performed according to manufacturer's guidance. Fused cells were cultured in ClonaCell-HY Medium C (Cat# 03803) overnight at 37°C in a 7% CO_2 incubator. Next day the fused cells were centrifuged and then suspended in 10 ml ClonaCell-HY Medium C and then gently mixed with 90 ml Methylcellulose-based ClonaCell-HY Medium D (Cat# 03804) containing HAT components. The cells were plated into OmniTray plates (Thermo Scientific) and allowed to grow in 37°C in a 7% CO_2 incubator. After 6-7 days incubation, single hybridoma clones were picked by ClonePix FL (Molecular Devices) and transferred into 96-well cell culture plates (#353075, Becton Dickinson) with 200 µL/well ClonaCell-HY Medium E (Cat# 03805). Hybridoma culture media were changed prior to ELISA screening.

B. Rabbit immunizations

Rabbit immunizations were performed using 0.5 mg/injection with CFA/IFA human and cyno CD3ε-KLH every 2 weeks for 5 injections (d0, d14, d28, d42, d56). Bleeds were taken on days 52 and 66.

PEG fusions and screening was performed as follows. Clones were screened for binding to the N-terminal portion of CD3ε conjugated to thyroglobulin (THY) by ELISA. All positive clones were also found to cross-react with cyno CD3ε by ELISA and 16 unique clones were selected for sub-cloning. Total RNA was extracted from frozen cell pellets and purified using a Qiagen RNeasy kit following manufacturer's instructions. First strand cDNA was synthesized using RT-PCR one-step (Qiagen). Rabbit VH and VL domains were further PCR amplified using a protocol described for generating rabbit immune libraries (Kontermann and Dubel. *Antibody Engineering*. 1: 115-123, 2010). Moderate degeneracy was designed to represent common rabbit germline immunoglobulin genes.

Antibody Screening

A. Mouse hybridoma screening

3 days after media change, hybridoma supernatants were screened by ELISA for binding to both human and cynoCD3ε, as described below. All ELISA positive clones were further screened by flow cytometry for binding to human Jurkat T cells, human PBMCs, and cyno PBMCs (Figures 2 and 3). Hybridoma supernatants were purified by Protein A affinity chromatography, then sterile filtered (0.2-μm pore size, Nalge Nunc International, NY, USA) and stored at 4°C in PBS. Purified mAbs were confirmed by ELISA before further testing in functional assays. mAb isotype was determined using a mouse monoclonal antibody isotyping kit from Roche Diagnostics Corporation.

The amino acid sequences of the light and heavy chain variable domains of the anti-CD3 antibodies 13A3, 72H6, and 19B1 are shown in Figure 4A. Figure 4A also delimits the HVR sequences for each of the three antibodies. Figures 4B, 4C, 5A, and 5B show additional amino acid sequences of the light and heavy chain variable domains of other anti-CD3 antibodies.

B. Screening following rabbit immunizations

Eight unique heavy chain sequences, and six unique light chain sequences were cloned out from the hybridoma cell lines. Figure 7 shows the heavy chain and light chain sequences for one of these antibodies, Rab17. High similarity in sequence led to the decision to focus on 6 heavy and light pairs. The 6 resulting antibodies were expressed as chimeric rabbit/human IgGs on a small scale (100 ml cultures of 293S), and screened for binding to CD3 epsilon by ELISA.

Antibody Characterization – Binding Affinity and T Cell Activation Activity Assays

A. CD3εγ binding ELISA assay

The CD3εγ binding ELISA assay was performed in 96-well microtiter ELISA plates (Greiner, Germany) coated with either human/cyno CD3ε N-terminal amino acids conjugated to THY or human/cyno

CD3ε/γ fused to murine Fc at 2 µg/ml in 0.05 M carbonate buffer (pH 9.6), 4°C overnight. After washing three times with wash buffer (0.05% Tween 20 in PBS), plates were blocked with 200 µL ELISA assay diluents with BSA. 100 µL of cultured supernatants or diluted purified mAbs were added and incubated for 1h at room temperature. The plates were washed three times and incubated with HRP conjugated Goat anti-mouse IgG Fc for 1 hour. After washing three times, bound enzyme was detected by addition of 100 µL/well TMB substrate (BioFX Laboratories, MD, USA) for 5 min. The reactions were stopped by adding 100 µL/well of stop reagent (BioFX, Laboratories, MD, USA) and detection of color at $A_{630\ nm}$.

B. Flow cytometry analysis

Human Jurkat T cells, human PBMCs, or cyno PBMCs were washed twice with FACS staining buffer (phosphate-buffered saline containing 1% fetal bovine serum) and then suspended in FACS staining buffer to final concentration of 5 x 10^6 cells/ml. 100 µl cells were added to U-bottom 96-well tissue culture plate (#353077, Becton Dickinson), and 100 µl hybridoma supernatants or diluted purified mAbs were added. After 30 min incubation on ice, cells were washed twice with FACS staining buffer and subsequently stained with FITC- or allophycocyanin (APC)-conjugated goat anti-mouse IgG antibody (#1012-11, Southern Biotech) at 1:300 dilution for 30 min. After washing twice with FACS staining buffer, cells were analyzed by FACSCalibur (BD Biosciences) flow cytometry. Data was analyzed using FlowJo software (Tree Star, Inc.).

C. Human T cell activation assay

Human blood was collected in heparinized syringes, and PBMC were isolated using Leucosep (Greiner Bio-one, cat#227290P) and Ficoll Paque Plus (GE Healthcare Biosciences, cat#95038-168), as recommended by the manufacture. Cells were washed in RPMI medium containing 10% FBS, supplemented with GlutaMax (Gibco, cat#35050-061), penicillin & streptomycin (Gibco, cat#15140-122), and ~0.2 million suspended cells were added to a 96-well U-bottom plate. Anti-CD3 antibodies were added at between 10 and 0.01 µg/ml. After culturing for ~20 hours, cells were washed with FACS buffer (0.5% BSA, 0.05% Na Azide in PBS). Cells were then stained with anti-CD69-FITC (BD, cat# 555530), anti-CD25-PE (BD, cat#555432) anti-CD4-APC (BD, cat#555349) or anti-CD8-APC (BD, cat#555369) in FACS buffer, washed with FACS buffer and suspend in 100ul of FACS buffer containing 1µg/ml Propidium Iodide. Data was collected on a FACSCalibur flow cytometer and analyzed using FlowJo. The extent of T cell activation was determined comparing the percentage of CD69+ and CD25+ population in CD4+ or CD8+ T cells.

D. Cyno T cell activation assay

Cyno blood was collected in heparinized tubes. Red blood cells were lysed twice with ACK red blood cell lysis buffer (0.874% NH4Cl, 0.1% KHCO3, 0.00368 EDTA Disodium). Cells were washed in RPMI medium containing 10% FBS, supplemented with GlutaMax (Gibco, cat#35050-061), penicillin & streptomycin (Gibco, cat#15140-122), and ~0.2 million suspended cells were added to a 96-well U-bottom plate. Anti-CD3 antibodies were added at 10 µg/ml. After culturing for ~20 hours, cells were washed with FACS buffer (0.5% BSA, 0.05% Na Azide in PBS). Cells were then stained with anti-CD69-FITC (BD, cat# 555530), anti-CD25-

PE (BD, cat#555432) anti-CD4-APC (BD, cat#551980) in FACS buffer, washed with FACS buffer and suspend in 100 µg of FACS buffer containing 1 µg /ml Propidium Iodide. Data was collected on a FACSCalibur flow cytometer and analyzed using FlowJo. The extent of T cell activation was determined by comparing the percentage of CD69+ and CD25+ population in CD4+ T cells.

Generation of Anti-CD3 Antibody Variants

A. Cloning and sequencing of mouse CD3εγ human/cyno cross-reactive hybridomas

Total RNA was extracted from mouse hybridoma cells with RNeasy kit (Qiagen), and first-strand cDNA was synthesized using a SuperScript III RT kit (Invitrogen). Antibody genes were amplified by error-proof Taq polymerase PCR with 5' degenerated primer mixture and 3' Cγ−, Cκ−, Cλ−specific primers. PCR products were purified and the variable regions of the antibody heavy and light chains were obtained by sequencing the PCR product. The variable regions of antibody heavy and light chains were digested with appropriate restriction enzymes and cloned into respective pRK expression vectors. The murine antibodies were expressed in 293 cells.

B. Humanization

Sequences of human/cyno CD3εγ cross-reactive hybridomas were aligned to the most homologous human consensus or germline light and heavy variable domains (Figure 7). A consensus sequence called mu40G5c was derived from light and heavy chain variable domains of related hybridoma clones (Figure 7). Hypervariable regions (HVRs) were engineered into light and heavy human acceptor frameworks to generate humanized CDR-grafts (see, e.g., Figures 8A-8F). Humanized variants were assessed in the form of Fab fragments or as IgG. VL domain positions 24-34 (L1), 50-56 (L2) and 89-97 (L3) and VH domain positions 26-35 (H1), 50-65 (H2) and 95-102 (H3) were used for the grafts (Figures 8A-8F). Additional variants that included various combinations of one or more mouse vernier positions were also generated and tested for binding affinity (see, e.g., Figures 9A-9F). Murine variable domain residues at select *vernier* positions were incorporated into a final humanized sequence based on their ability to improve binding affinity. The monovalent binding affinities for selected humanized antibodies for different CD3ε antigens are shown in Figure 10. The binding affinities for affinity variants of humanized anti-CD3 antibody 38E4 (38E4v1-38E4v9) and 40G5c are shown in Figure 11.

C. Paratope mapping

Each residue in HVR-L3 and HVR-H3 of hu38E4 was separately mutated to alanine using Kunkle mutagenesis. In addition, position 95 in HVR-H3 was also mutated to serine, threonine, or glutamate. Variants with these single point mutations were expressed as Fabs in HEK293 cells and initially screened with a single cycle kinetics method on a Biacore T100. Selected variants were also scaled up and purified for a conventional multi-cycle kinetics method. For single cycle kinetics, Biacore Series S CM5 sensor chips were immobilized with anti-human Fab antibodies (Human Fab capture kit, GE Healthcare). Each Fab was

captured from culture supernatant and the increasing concentrations (ranging from 3 nM to 250 nM in HBSP buffer) of human CD3εγ were injected sequentially at a flow rate of 30 µl/min in a single analysis cycle without regeneration of the surface in between injections; 10 min dissociation was acquired for each cycle. For conventional multi-cycle kinetics, human CD3εγ, cyno CD3εγ, or a 27-mer peptide were immobilized on Biacore Series S CM5 sensor chip using the amine coupling kit from Biacore. Serial 3-fold dilutions of each Fab variant were injected at a flow rate of 30 µl/min. Each sample was analyzed with a protocol of 3-minute association and 3-minute dissociation. In both methods, the Biacore chips were regenerated using 10 mM Glycine (pH 1.7). Binding response was corrected by blank subtraction and a 1:1 Languir model of simultaneous fitting of k_{on} and k_{off} was used for kinetics analysis. The effects of these mutations, summarized in Figure 12, indicate light chain residue R96 and heavy chain residues Y97, R99 and F100b play critical roles in the binding to CD3εγ.

D. CD3 epitope mapping

Alanine mutations were introduced into $CD3\varepsilon^{1-27}$-Fc in order to evaluate epitope recognition of N-terminal binding anti-CD3ε antibodies. Each $CD3\varepsilon^{1-27}$-Fc variant was immobilized on Nunc Maxisorp plates overnight in PBS at 2 µg/ml at 4°C. After blocking the plates with 2% powdered milk in PBS containing 0.05% Tween 20 for 1h, 100 µl of 3 nM anti-CD3ε was added to each well and allowed to bind for 1h at 25°C. After 6 washings with PBS containing 0.05% Tween 20, antibody binding was detected by the addition of anti-mouse IgG-HRP secondary antibody, as depicted in Figure 13A.

CD3εγ was sub-cloned into an M13 phagemid which contains a C-terminal gD tag followed by an amber stop codon so that it could be displayed on phage or expressed in a non suppressor strain of *E. coli*. This CD3εγ phagemid was used as a template for making single alanine mutations in CD3ε by Kunkel mutagenesis. Each CD3ε alanine mutant displayed on phage, was confirmed by DNA sequencing, isolated from a single colony, grown overnight in 2YT/Carb plus KO7 helper phage and purified by PEG precipitation. The effect of alanine mutation in CD3εγ on anti-CD3 antibody binding was assessed using a phage ELISA. Each anti-CD3 antibody was immobilized on a NUNC maxisorp plate at 2 µg/ml in PBS buffer overnight at 4°C. Purified phage supernatant displaying a CD3εγ alanine variant (1.0 OD_{450}) was added to the plate and allowed to bind at room temperature with shaking for 1 h. After washing, bound phage was detected with anti-M13-HRP (GE Healthcare cat # 45-001-419). Binding of each CD3εγ alanine variant was compared to wild-type CD3εγ phage binding (Figure 13B). Alanine variants that impacted anti-CD3 antibody binding, were further characterized by assessing binding as a function of phage concentration (Figure 13C).

To quantify the impact of alanine mutations in CD3 on antibody binding, selected CD3 alanine mutants were expressed in a non-supressor strain of *E. coli*. The secreted CD3εγ variants were captured from the crude periplasmic fraction using anti-CD3 antibody UCHT1v9. UCHT1v9 was immobilized on a CM5 serios S chip through amine coupling using the anti-human IgG (Fc) antibody capture kit (BR-1008-39) from GE Healthcare. SPR measurements were performed on the Biacore 4000 instrument, utilizing kinetic evaluation software. In order to measure monovalent binding affinities, anti-CD3 bispecific antibodies were

used in which one arm was the anti-CD3 to be tested and the arm recognized an irrelevant antigen. The bispecific anti-CD3 antibodies were passed over the captured supernatant in a concentration series of two-fold dilutions from 0.39 to 100 nM. The resulting kinetics (Figure 13D) were measured and calculated using Biacore 4000 BIAevaluation software (product code 28-9664-57).

E. Structural mapping of CD3ε binding site

1. Hu38E4.v1 Fab

Hu38E4.v1 Fab, dissolved in 0.15 M NaCl, 25mM tris, pH 7.5 at 10 mg/ml, and a 2-fold molar excess (1 mg) of CD3ε peptide, QDGNEEMGGITQTPYK (SEQ ID NO: 284) (Figure 14A), were mixed and subjected to crystallization trials. Initial screening was done with a sparse matrix of precipitants in a sitting drop vapor diffusion format. Optimized crystals grew from a 1:1 mixture with reservoir solution containing 70% v/v methyl-pentanediol, and 0.1 M HEPES buffer at pH 7.5. The reservoir was used as a cryoprotectant. The crystals were transferred to cryogenic temperature by sudden immersion into liquid nitrogen.

The diffraction data for hu38E4.v1 Fab and CD3ε peptide co-crystal were collected at Advanced Photon Source beam line 22ID, using a MAR300 CCD detector. The recorded diffractions were then integrated and scaled using the program HKL2000.

The structure was phased by molecular replacement (MR) method using program Phaser. The MR search model was a Fab subunit derived from a crystal structure of HGFA/Fab complex (PDB code: 2R0L). The CD3ε peptide was built into the structure based on a Fo-Fc map. The structure was subsequently refined with programs REFMAC5 and PHENIX using the maximum likelihood target functions, anisotropic individual B-factor refinement method, and TLS refinement method, to achieve convergence. The data and refinement statistics are show in Table 3A.

TABLE 3A. Data Collection and Refinement Statistics for hu38E4.v1/CD3ε Complex

Space group	P3221
Unit cell	a=73.2Å, b=73.2Å,c=183.7Å α=90° β=120° γ=90°
Resolution	50.0 - 1.95 Å
Total number of reflections	42632 (4188)[1]
Completeness (%)	100 (100)
Redundancy	19.7 (8.3)
I/σ	7.1 (3.0)
Rsym[2]	0.112 (0.812)
Resolution range	50 - 1.95 Å
Rcryst[3] / Rfree[4]	0.152/0.185
Non-hydrogen atoms	3960
Water molecules	446
Average B, Overall	21.97
Average B, Protein	20.63
Average B, Water	32.27
r.m.s.d. bond lengths	0.009 Å

r.m.s.d. angles	1.258°

[1]Values in parentheses for are of the highest resolution shell which is 2.02 Å – 1.95 Å.
[2]Rsym = $\Sigma|I_{hi} - I_h|/ \Sigma I_{hi}$, where I_{hi} is the scaled intensity of the *i*th symmetry-related observation of reflection *h* and I_h is the mean value.
[3]Rcryst = $\Sigma_h|F_{o,h} - F_{c,h}| / \Sigma_h F_{o,h}$, where $F_{o,h}$ and $F_{c,h}$ are the observed and calculated structure factor amplitudes for reflection *h*.
[4]Value of R_{free} is calculated for 5% randomly chosen reflections not included in the refinement.

The crystal structure of the hu38E4.v1 Fab/CD3ε peptide complex was determined at 1.9Å resolution. The structure revealed that the CD3ε peptide makes a small turn and inserts deeply into the cleft between heavy and light chains of the 38E4.v1 Fab (Figures 14B and 14C). Binding buries 666 Å^2 of solvent accessible surface area between the peptide and the Fab fragment and involves an intricate network of hydrophobic, hydrogen binding and ionic interactions (Figure 14D). The N-terminal pyroglutamate (pyroglu) ring packs against heavy chain Tyr33 and makes a hydrogen bond with heavy chain His35 in HVR-H1. The bulky side chain of residue F100b in HVR-H3 pushes His35 into a proper orientation for its interaction with pyroglu and explains the loss of binding observed when F100b is mutated to alanine, a small side chain residue. In addition, consistent with the alanine scanning results, R96 in CDR-L3 makes a critical hydrogen bond with the carboxyl group in the pyroglu, whereas Y97 in CDR-H3 makes a hydrogen bond with Met7 of the CD3ε peptide (Figure 14E). Interestingly, while alanine substitution at R99 in CDR-H3 has a dramatic effect on antigen binding, the structure reveals that this side chain points away from the CD3ε peptide and does not involve in any interactions with the peptide. Instead, R99 makes extensive contacts with several residues in CDR-H3, including a hydrogen bond with D101 and hydrophobic packing against Y100a that further impacts the vernier residue, LC Y49 (Figure 14F). These interactions are likely important for the support and overall arrangement of CDR loops in the 38E4.v1 Fab by organizing the critical central cleft between heavy and light chains to enable CD3ε peptide binding.

Figure 14G identifies all residues of the 38E4.v1 Fab that were determined to reside within 5 Å from the CD3ε peptide. These antigen contact residues are identical between hu38E4.v1 and hu40G5c, except that residue G96 of hu38E4.v1 is a serine residue (S96) in hu40G5 (see Figure 14H, which depicts the location of contact residue G96 of hu38E4.v1).

The contacts between anti-CD3 (38E4.v1) and the $CD3_{\varepsilon\gamma}$ peptide were calculated based on alanine scanning. The epitopes recognized by the 38E4v1 anti-CD3 are contacts with a distance of 3.5 Angstroms or shorter, as provided in Table 3B below. From this analysis, the CD3 epitopes Gln1 (PCA1, pyroglutamic acid), Asp2, Glu6, and Met7 were found to be important contact forming residues with the paratopes of the light chain and heavy chain variable regions of the CD3 antibody.

TABLE 3B. CD3 contacts for hu38E4.v1/CD3ε Complex

Antibody Chain	Residues	Atom name	Atom	CD3 peptide	Residues	Atom name	Atom	Distance
/L/	96(ARG)	NH2	N	**/A/**	**1(PCA)**	**O**	**O**	2.76
/H/	35(HIS)	NE2	N	/A/	1(PCA)	OE	O	2.85*

/L/	96(ARG)	NH1	N	**/A/**	**1(PCA)**	**O**	**O**	2.9
/L/	96(ARG)	CZ	C	/A/	1(PCA)	O	O	3.24
/H/	33(TYR)	CG	C	/A/	1(PCA)	OE	O	3.27
/L/	96(ARG)	NH2	N	/A/	1(PCA)	OE	O	3.28
/H/	100(TYR)	CD1	C	/A/	1(PCA)	O	O	3.33
/H/	33(TYR)	CB	C	/A/	1(PCA)	OE	O	3.34
/L/	96(ARG)	NH2	N	/A/	1(PCA)	CD	C	3.35
/H/	33(TYR)	CD2	C	/A/	1(PCA)	OE	O	3.44
/H/	50(TRP)	CH2	C	/A/	1(PCA)	N	N	3.45
/H/	33(TYR)	CD2	C	/A/	1(PCA)	CD	C	3.47
/H/	50(TRP)	CZ3	C	/A/	1(PCA)	N	N	3.48
/L/	**94(LEU)**	**N**	**N**	/A/	2(ASP)	OD1	O	2.71
/H/	50(TRP)	CH2	C	/A/	2(ASP)	OD1	O	3.23
/L/	92(PHE)	O	O	/A/	2(ASP)	CB	C	3.44
/H/	100(TYR)	CE1	C	/A/	2(ASP)	O	O	3.48
/L/	**91(SER)**	**O**	**O**	**/A/**	**3(GLY)**	**N**	**N**	2.88
/L/	27(ASN)d	ND2	N	**/A/**	**3(GLY)**	**O**	**O**	2.96
/L/	**92(PHE)**	**O**	**O**	**/A/**	**3(GLY)**	**N**	**N**	3.22
/L/	32(TYR)	OH	O	/A/	3(GLY)	O	O	3.3
/L/	32(TYR)	CZ	C	/A/	3(GLY)	O	O	3.42
/L/	32(TYR)	CE2	C	/A/	3(GLY)	O	O	3.42
/L/	91(SER)	O	O	/A/	3(GLY)	CA	C	3.49
/L/	**92(PHE)**	**O**	**O**	**/A/**	**4(ASN)**	**N**	**N**	2.81
/L/	27(ARG)f	NH1	N	**/A/**	**4(ASN)**	**O**	**O**	3.06
/L/	92(PHE)	O	O	/A/	4(ASN)	CB	C	3.11
/L/	92(PHE)	CZ	C	/A/	4(ASN)	OD1	O	3.43
/L/	32(TYR)	OH	O	/A/	6(GLU)	OE1	O	2.58*
/L/	30(LYS)	NZ	N	/A/	6(GLU)	OE2	O	2.74*
/L/	27(ARG)f	NH1	N	**/A/**	**6(GLU)**	**O**	**O**	2.77
/L/	27(ASN)d	ND2	N	**/A/**	**6(GLU)**	**O**	**O**	3.04
/L/	30(LYS)	NZ	N	/A/	6(GLU)	OE1	O	3.2
/L/	30(LYS)	CD	C	/A/	6(GLU)	OE1	O	3.35
/L/	30(LYS)	NZ	N	/A/	6(GLU)	CD	C	3.36
/H/	100(TYR)	CE2	C	/A/	6(GLU)	OE1	O	3.4
/H/	98(SER)	CA	C	/A/	6(GLU)	OE2	O	3.42
/H/	100(TYR)	OH	O	/A/	6(GLU)	CB	C	3.44
/L/	32(TYR)	CZ	C	/A/	6(GLU)	OE1	O	3.47
/H/	97(TYR)	OH	O	**/A/**	**7(MET)**	**N**	**N**	2.87
/L/	27(ARG)f	NE	N	**/A/**	**7(MET)**	**O**	**O**	2.95

/H/	97(TYR)	OH	O	/A/	7(MET)	CB	C	3.49
/L/	27(ARG)f	CD	C	/A/	7(MET)	O	O	3.5

*Represents hydrogen bonding between two sidechains.
The gray shaded cells represent reliable hydrogen bonding contacts.
The bolded contacts are hydrogen bonds formed between side chains and main chain backbones.

2. SP34v52 Fab

SP34v52 Fab was dissolved in 0.25 M NaCl, 25 mM MES pH 5.5 at 10 mg/mL. The initial crystallization screening was done with a sparse matrix (PEGII, Qiagen) screen in a sitting drop vapor diffusion format. A crystallization hit was found in a drop with the reservoir containing 0.2M $CaCl_2$, 0.1M HEPES pH 7.5, and 30% w/v PEG 4000. Optimized crystals grew from a mixture of 2 µL protein and 2 µL of reservoir solution containing 20-23% w/v PEG 3350, 0.1M HEPES pH 7.2, 0.1M $CaCl_2$. Hanging drop vapor diffusion method was used and the final crystallization drop was incubated at 18 °C.

The diffraction data for SP34v52 Fab were collected at Stanford Synchrotron Light Source beam line 12-2, using a PILATUS detector. The recorded diffractions were then integrated using program XDS and scaled using the program SCALA. The structure was phased by molecular replacement (MR) method using program Phaser. The MR search model was a Fab subunit derived from a crystal structure of HGFA/Fab complex (PDB Code: 2R0L). The CD3ε peptide was build into the structure based on a F_o-F_c map. The structure was subsequently refined with programs REFMAC5 and PHENIX using the maximum likelihood target functions, anisotropic individual B-factor refinement method, and TLS refinement method, to achieve convergence. The data and refinement statistics are shown in Table 4 below.

TABLE 4. Data Collection and Refinement Statistics for SP34v52

Space group	P622
Unit cell	a=b=146.3Å, c=80.1Å α=90° β=90° γ=120°
Resolution	50.0 - 2.50 Å
Total number of reflections	18004 (170)[1]
Completeness (%)	100 (100)
Redundancy	19.3 (19.7)
I/σ	24.0 (3.6)
Rsym[2]	0.127 (0.896)
Resolution range	50 - 2.50 Å
Rcryst[3] / Rfree[4]	0.152/0.185
Non-hydrogen atoms	3451
Water molecules	123
Average B, Overall	29.59
Average B, Protein	29.81
Average B, Water	22.47
r.m.s.d. bond lengths	0.007 Å
r.m.s.d. angles	1.163°

[1]Values in parentheses for are of the highest resolution shell which is 2.51 Å – 2.50 Å.
[2]Rsym = $\Sigma|I_{hi} - I_h|/ \Sigma I_{hi}$, where I_{hi} is the scaled intensity of the *i*th symmetry-related observation of reflection *h* and I_h is the mean value.

[3]Rcryst = $\Sigma_h|F_{o,h} - F_{c,h}| / \Sigma_h F_{o,h}$, where $F_{o,h}$ and $F_{c,h}$ are the observed and calculated structure factor amplitudes for reflection *h*.
[4]Value of R_{free} is calculated for 5% randomly chosen reflections not included in the refinement.

In Figures 14I -14L, the crystal structures of the hu38E4.v1 and SP34v52 Fabs were compared in the same orientation. When the CD3ε peptide was superimposed on the SP34v52 Fab with the same orientation as in the hu38E4.v1, clear clashes of the peptide with SP34v52 were observed (Figure 14L). HVR-H2 residues R50 and R52 of SP34v52, which were not present in either hu38E4.v1 or hu40G5c, were found to be important for the binding of CD3 by SP34v52 (Figure 14L). These data demonstrate that hu38E4.v1 and hu40G5c bind to CD3 in a manner distinct from that of SP34v52.

The crystal structure of the hu38E4.v1 in complex with the N-terminal peptide of $CD3_{\varepsilon\gamma}$ is illustrated in Figures 14M and 14N . Figure 14M provides a zoomed in view of the key intermolecular interactions involved in contacting the sixth residue in $CD3_{\varepsilon\gamma}$. In a zoomed out view, Figure 14N depicts a space filling model of the Fab/CD3 peptide complex where the fifth residue is completely pointing away from the interaction site. The sixth residue, as shown, is involved in the interactions with the Fab and points into the active site.

Example 2. Generation and Selection of T-cell Dependent Bispecific (TDB) Antibodies

One approach to harness the high cytotoxic potential of T cells in eradicating tumor cells has been the use of T-cell dependent bispecific (TDB) antibodies. Encouraging clinical responses have been reported with molecules such as B cell targeting blinatumomab, the CD19/CD3-bispecific BiTE antibody. However, the therapeutic promise of many reported bispecific antibody modalities has been limited by liabilities including unfavorable pharmacokinetics (PK), toxicity, and/or production issues. Accordingly, we initially generated and characterized anti-CD3 TDB antibodies having varied combinations of anti-CD3 and anti-tumor antigen (e.g., anti-CD20, anti-FcRH5, anti- HER2, anti-LYPD1, anti-LY6E, anti-LY6G6D, anti-PMEL17, anti-CD19, anti-CD22, anti-CD33, anti-CD79A, anti-CD79B, anti-EDAR, anti-GFRA1, anti-MRP4, anti-RET, anti-Steap1, anti-TenB2) arms, produced as full-length antibodies in the knob-into-hole format. Unexpectedly, we found that particular combinations (pairs) of anti-CD3 and anti-tumor antigen arms resulted in TDBs exhibiting favorable activity over other TDBs.

TDB antibodies were produced as full-length antibodies in the knob-into-hole format as human IgG1, as previously described (Atwell et al. *J. Mol. Biol.* 270: 26-35, 1997). Half antibodies were expressed in either *E. coli* or Chinese hamster ovary (CHO) cells, purified by Protein A-affinity chromatography, and the proper half antibody pairs were annealed *in vitro* as described previously (Spiess et al. *Nat. Biotechnol.* 2013). If TDB antibody production was carried out in CHO cells, the antibody may include an aglycosylation mutation, for example, at residue N297 (e.g., N297G), such that the TDB antibody was an effector-less variant and unable to initiate antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC). Figure 15 shows a schematic overview of CD3/CD20 TDB production.

After annealing, the CD3/CD20 TDBs were purified by Hydrophobic Interaction Chromatography (HIC) and characterized by analytical gel filtration, mass spectrometry, and polyacrylamide gel electrophoresis. The purified antibodies ran as a single peak (>99% of the signal) in gel filtration with less

than 0.2% aggregates. No homodimers were detected by mass spectrometry. The anti-CD20 arms tested in the generation of CD3/CD20 TDBs included 2H7v16, 2H7v114, 2H7v511, and GA101. The anti-CD3 arms tested in the generation of CD3/CD20 TDBs included UCHT1v1, UCHT1v9, UCHT1vM1, 72H6, 13A3, 30A1, 41D9a, SP34v52, 40G5c, 38E4v1-38E4v9, 21B2, 125A1, and 21A9. CD3/CD20 TDBs were tested for binding to CD3, as well as activity, as assessed by *in vitro* B cell killing assays and T cell activation assays.

A. Binding Affinity

Binding affinities for the each of the CD3/CD20 TDBs were tested by Biacore or FACS analysis, as described above for the anti-CD3 antibodies. Briefly, for Biacore binding assays, human CD3$\varepsilon\gamma$ was immobilized on Biacore Series S CM5 sensor chip using the amine coupling kit from Biacore and CD3/CD20 TDBs or Fab variants thereof were in the flow through. For FACS binding assays, either Bjab cells (for B cell antigens) or Jurkat cells (for CD3 antigen) were incubated with various concentrations of TDB antibodies at 4ºC for 30 minutes, then cells were washed and incubated with 2nd antibody (anti-huIgG-PE; BD Bioscience) for another 15 minutes, before cells were washed again and ready for FACS analysis. Figure 16 shows the results of *in vitro* FACS binding assays of CD3/CD20 TDBs. The results demonstrate that particular combinations of anti-CD3 antibody arm and anti-tumor antigen arm (e.g., anti-CD20 arm) result in TDB antibodies with more favorable binding properties. Figure 17 shows the monovalent and bivalent binding affinities for these particular CD3/CD20 TDBs. The particular pairing of 2H7v16 with anti-CD3 arms (e.g., UCHT1v9), for example, resulted in a CD3/CD20 TDB that displayed unexpectedly strong binding to both Bjab and Jurkat cells compared to the other tested CD3/CD20 TDBs having different anti-CD20 arms. The binding affinity of other CD3/CD20 TDBs having a 2H7v16 anti-CD20 arm and various anti-CD3 arms were also tested (see Figures 18-24).

B. In vitro B cell killing and T cell activation assays

The generated CD3/CD20 TDBs were also tested for their ability to support B cell killing and the activation of the cytotoxic effect of T cells. In these assays, B tumor cell lines (Bjab) were obtained from ATCC, and PBMCs were isolated from whole blood of healthy donors by Ficoll separation. If needed CD4+T and CD8+T cells were separated with Miltenyi kits according to manufacturer's instructions. Cells were cultured in RPMI1640 supplemented with 10%FBS (Sigma-Aldrich) at 37ºC in a humidified standard cell culture incubator. For Bjab cell killing assays, 20,000 Bjab cells were incubated with effector cells either as huPBMCs or purified T cells as indicated ratios per assay, in the presence of various concentrations of TDB antibodies for a time period as indicated per assay. For endogenous B cell killing assays, 200,000 huPBMCs were incubated with various concentrations of TDB antibodies for hours indicated per assay. At the end of each assay, live B cells were gated out as PI-CD19+ or PI-CD20+ B cells by FACS, and absolute cell count was obtained with FITC beads added to reaction mix as internal counting control. % of cell killing was calculated based on non-TDB treated controls. Activated T cells were detected by CD69 and CD25 surface expression.

The varied efficacies of the generated TDB antibodies with bispecificity for CD3 and a second biological molecule (in this instance, CD20), underscore the critical and unpredictable contributions of both antibody arms in the generation of an exemplary TDB possessing high efficacy (see Figures 25-49).

Example 3. Characterization of Exemplary CD3/CD20 TDBs (CD20 TDBs)

We further characterized two of the exemplary CD3/CD20 TDBs (CD20 TDBs) described above, which showed high efficacy in the *in vitro* B cell killing and T cell activation assays. The CD20 arm of each TDB antibody was anti-CD20 clone 2H7.v16 (see Figure 50), while the CD3 arm was clone UCHT1v9 (see, e.g., Zhu et al. *Int. J. Cancer*. 62: 319-324, 1995) or cyno cross-reactive clone 40G5c (see, e.g., Figure 51), which shares comparable activities.

Materials and Methods

A. Antibody production

T-cell dependent bispecific (TDB) antibodies were produced as full-length antibodies in the knob-into-hole format as human IgG1 as previously described (Atwell et al. *J. Mol. Biol.* 270: 26-35, 1997). Half antibodies were expressed in *E. coli* and thus aglycosylated, purified by Protein A-affinity chromatography, and the proper half antibody pairs were annealed *in vitro* as described previously (Spiess et al. *Nat. Biotechnol.* 2013). After annealing, the antibodies were purified by Hydrophobic Interaction Chromatography (HIC) and characterized by analytical gel filtration, mass spectrometry, and polyacrylamide gel electrophoresis. The purified antibodies ran as a single peak (>99% of the signal) in gel filtration with no detectable aggregates (Figure 52A), and no homodimers were detected by mass spectrometry (Figure 52B).

B. In vitro B cell killing and T cell activation assays

B tumor cell lines are obtained from ATCC, and PBMCs were isolated from whole blood of healthy donors by Ficoll separation. CD4+T and CD8+T cells were separated with Miltenyi kits according to manufacturer's instructions. Cells were cultured in RPMI1640 supplemented with 10%FBS (Sigma-Aldrich). For B cell killing assays, live B cells were gated out as PI-CD19+ B cells by FACS, and absolute cell count was obtained with FITC beads added to reaction mix as internal counting control. Activated T cells were detected by CD69 and CD25 surface expression. Intracellular Granzyme B induction was detected by FACS. Perforin concentration in media is detected by ELISA (eBioscience). All antibodies were purchased from BD Bioscience.

C. In vivo efficacy studies in murine models

Humanized NSG and SCID mice were purchased from Jackson Labs. Human CD20 transgenic mice and human CD3 transgenic mice were produced as previously described (Gong et al. *J. Immunol.* 174: 817-826, 2005 and de la Here et al. *J. Exp. Med.* 173: 7-17, 1991), and human CD20/CD3 double transgenic mice were produced by crossing the two single transgenic mice. Human lymphoma mouse models were generated by injecting 5 x 10^6 Bjab-luciferase cells alone or mixed with 10 x 10^6 human donor PBMCs in

HBSS subcutaneously into the right flanks of 40 female mice. Mice were treated intravenously with vehicle or 0.5 mg/kg CD20 TDB one hour post-inoculation and one week following the initial treatment. Tumors were measured 1-2 times per week, and body weights were measured twice per week up to 7 days following the final treatment. If no weight loss was observed, weights were no longer taken for a given animal. If weight loss was greater than 15% of the total body weight, affected mice were weighed daily, and euthanized (or brought to the attention of the veterinary staff) if weight loss exceeded 20%. Clinical observations were performed twice per week throughout the duration of the study to monitor the health of the animals; any animal with a tumor of a size or condition that may interfere with the health or activity of the animal was euthanized. Otherwise, animals were euthanized 6 months after the initial treatment or if the tumor became ulcerated or its volume exceeded 2500 mm^3.

Patient-derived chronic lymphocytic leukemia (CLL) mouse models were generated as previously described (Bagnara et al. *Blood.* 117: 5463-5472, 2011). Briefly, 5 x 10^5 activated T cells were purified from CLL PBMCs and injected retro-orbitally into NSG mice. Following T cell engraftment, 2 x 10^7 CLL PBMCs were injected retro-orbitally. After 14 days, circulation of transplanted B and T cells was confirmed by FACS analysis. Successfully engrafted animals were subsequently treated 3.5 weeks later with TDB antibodies administered intravenously by tail vein injection. Animals were euthanized 6 or 14 days after treatment. Whole blood was collected by puncture of the retro-orbital sinus using heparinized pipets and immediately transferred into heparinized tubes, while the animals were under anesthesia, or by terminal cardiac puncture, with a heparinized syringe after CO2 euthanasia. Spleens were collected after CO2 euthanasia. For every study, clinical observations were performed twice per week to monitor the health of the animals. Animal body weights were taken at least once a week. PBMCs were isolated after red blood cell lysis, and analyzed by FACS for B cells (muCD45+CD19+) and T cells (muCD90.2+CD4+, or muCD90.2+CD8+). All antibodies used are purchased from either BD Biosciences or eBiosciences.

D. PKPD study in cynomolgus monkeys

All cynomolgus monkey studies were conducted using purpose bred, naïve, cynomolgus monkeys of Chinese origin. For the single dose PKPD study, 3 male cynomolgus monkeys were administered a single slow bolus IV dose of 1mg/kg of CD20 TDB; for the repeat dose study, 4 cynomolgus monkeys were administered an IV slow bolus dose of 1mg/kg of CD20 TDB once weekly for a total of 4 dose. Whole blood or tissues was collected at selected time points for B cell and T cell count by FACS. Serum was collected, and stored at -70C until assayed using an ELISA to determine the amount of test article in each serum sample. Serum concentration-time profiles from each animal were used to estimate pharmacokinetic (PK) parameters using WinNonlin software (Pharsight; Mountain View, CA).

High quality CD20 TDB produced as a full length, humanized IgG with conventional antibody PK property

To explore targeting properties that could affect B-cell targeting TDB potency including antigen identity, size of the extracellular domain, and epitope distance from the membrane, we created over 40

different TDBs targeting epitopes on CD3ε, CD19, CD20, CD22, CD79a, and CD79b. Representative results are shown in Figure 56I. We found that the most potent TDBs were those that targeted cancer target antigens with small extracellular domains (ECDs) and epitopes close to the target cell membrane. Among the best targets were CD20, CD79a, and CD79b with potencies around 10 ng/ml or 67 pM for killing of normal donor B cells by autologous T cells.

Anti-CD20/CD3 TDB (CD20-TDB) is described here as a proof of concept molecule showcasing the pharmacological activity of these B-cell targeting TDBs. CD20 TDBs were produced as full-length, fully humanized IgGs with natural antibody architecture from bacteria, free of homodimers and aggregates (Figure 52). The pharmacokinetic (PK) property of CD20 TDB in rats, a non-binding species, resembles that of other human IgG antibodies, with a half-life of about 7 days (Figure 53).

B cell killing with CD20 TDB is T cell dependent via the granzyme-perforin pathway

To assess CD20 TDB as a potential therapy for cell proliferative disorders, such as CD20+ B cell malignancies, we first investigated its mechanism of action as a T cell-recruiting bispecific antibody. Distinct from ADCC activity, which is the main mechanism of action for classic monoclonal antibody therapy, CD20 TDB doesn't require the Fc region for its activity. F(ab')2 portion of CD20 TDB retained the same potency as the full-length IgG CD20 TDB in B cell killing (Figure 54A). CD20 TDB is a conditional agonist, requiring target expression, T cells, and antibody for activity. B cell killing activity of CD20 TDB is T cell-dependent, as no B cell killing was detected with PBMCs depleted of CD3+ T cells (Figure 54B). Target expression is required for T cell activation, as no CD20 expression results in no activated T cells (Figure 54C). CD20 TDB is able to activate both CD4+ and CD8+T cells as measured by the induction of both CD69 and CD25 on T cells (Figure 54D). Comparable B cell killing can be achieved with either T cells as effectors, while CD8+T cells appear to be more potent in BJAB cell killing, as CD8+T cells resulted in higher extent of cell killing than equal number of CD4+ T cells (Figure 54C). However, Granzyme upregulation is more prevalent within CD8+T cells (Figure 54E), as well as higher levels of perforin and Granzymes A and B (not shown) release associated with CD8+T cells was detected in the media by ELISA (Figure 54F). Activated T cells are capable of proliferation (Figure 55). Overall T cell count, however, didn't increase significantly after 24 hours in the presence of CD20 TDB and B cells without cytokine supplement *in vitro*, likely due to culture conditions. Robust T cell expansion was indeed observed *in vivo* from efficacy studies with murine models and in cynomolgus monkeys (Figures 58A and 67C).

CD20 TDB potent in killing B leukemia/lymphoma cells, and in autologous B cell killing *in vitro*

B cell killing potency of CD20 TDB was also tested with more than a dozen B leukemia/lymphoma cell lines *in vitro*. To assess the potency of the CD20-TDB, 8 lines were selected that represent cells with a wide range of CD20 expression level (Figure 56B). The dose-response B cell killing curves are shown with the 8 cell lines, with PBMC isolated from healthy donor as effector cells (Figure 56A). Significantly, CD20-TDB had no activity against SU-DHL1 cells that are devoid of CD20 expression. The potency of the CD20-TDB was somewhat correlated with the various levels of surface CD20 detected by flow cytometry (56A). .

Nonetheless, CD20 TDB is potent in killing all 8 lines in a dose-dependent manner, with EC50 ranging from 0.38 to 11ng/ml for 24 hour assay. The extent of cell killing varies somehow from 60 to 90% with up to 1000ng/ml TDB in a 24 hour assay (Figure 56C). In general, complete B cell killing can be achieved with higher antibody concentration or extended assay time. SU-DHL-1 cells are included in the killing assay as a CD20 negative control, where no cell killing is observed demonstrating the requirement for target expression for CD20 TDB activity. Activity of CD20 TDB appears to require very low level of target expression, as Nalm-6 and SC-1 cells shown here all have very low CD20 surface expression (Figure 56B). Monovalent binding affinity of CD20 TDB for CD20 is weaker than bivalent binding affinity of the parental anti-CD20, with a K_D of 54 nM determined by scatchard. Taken together, the K_D value and CD20 TDB B cell killing potency, receptor occupancy required for CD20 TDB activity is only less than 0.1%. TDBs generated to target different B cell antigens are also effective in mediating B cell killing as shown in Figure 56D, where TDBs targeting 5 different B cell antigens, including a CD20 TDB (TDB A: 2H7v16/UCHT1v9), killed 75% to 90% of B cells. CD20 TDB can further mediate the killing of additional B lymphoma lines with variable CD20 surface antigen expression (Figure 56E).

CD20 TDB is also highly potent in autologous B cell killing, tested with human PBMCs isolated from peripheral blood of healthy donors (Figure 56F). Shown in Figure 56F are the dose-responsive killing curves for 8 random donors, as well as a summary plot for EC50 and extent of B cell killing (Figure 56G) with 1000ng/ml antibody in a 24 hour assay for 30 donors. Out of the 30 samples tested, 57 to 96% of B cells were killed with up to 1000ng/ml antibody within 24 hours, with EC50 ranging from 0.43 to 135ng/ml with a median value of less than 3ng/ml. The extent of B cell killing within 24 hours by CD20 TDB is very comparable or higher than B cell killing by an anti-CD3/anti-CD19 scFv (Figure 56H).

CD20 TDB is potent in depleting B cells *in vivo* in murine models

As our tested CD20 TDB does not recognize murine CD20 and CD3 antigens, we took advantage of human CD20 and human CD3 transgenic mice (described above) to produce human CD3/CD20 double transgenic mice for subsequent efficacy studies *in vivo*. As shown in Figure 57A, human CD3/CD20 double transgenic mice express huCD3$_\varepsilon$ on the surface of CD4+ and CD8+ T cells in addition to huCD20 on the surface of CD19+ B cells at detectable levels compared to human derived T and B cells. With human CD20 transgenic mice, only rituximab is able to deplete B cells, as CD20 TDB cannot engage murine T cells without human CD3 expression (Figure 57B). While with human CD3/CD20 double transgenic mice, CD20 TDB is able to engage murine T cells expressing huCD3, and is potent in depleting murine B cells expressing huCD20 (Figure 57C). CD20 TDB appears to be more potent in depleting B cells *in vivo*, as fewer B cells are detected in mouse spleens 7 days after a single IV dose of CD20 TDB at 0.5mg/kg, compared to after a single dose of rituximab at 10mg/kg. A HER2 TDB, which has the same CD3 arm while with the other arm binds to HER2, was used as an isotype control here, and showed no activity here in cell depletion.

To explore the lowest efficacious dose for CD20 TDB in depleting B cells with human CD3/CD20 double transgenic mice, mice were treated with a single dose of CD20 TDB starting at 0.5mg/kg down to 0.00005mg/kg. Then B cell count in blood was monitored on D1 (24 hours after dose), D8, and D15.

Decreased B cell count was observed on D1, and B cell depletion was sustained up to D15 following CD20 TDB treatment (Figure 58A). Consistent with this observation of B cell count in blood, near complete B cell depletion in mouse spleens was achieved at D7 after a single dose of 0.5mg/kg, while a lower dose of 0.05mg/kg resulted in spleen B cell depletion partially and approximated an ED50 dose level (Figure 58B). A time-course study with the double transgenic mice revealed that B cell depletion is near complete in spleens as early as 3 days after single dose treatment at 0.5mg/kg, without significant sign of B cell recovery until D14 (Figure 58A). As seen in Figure 58C, CD20 TDB mediates B cell depletion in the periphery of double transgenic huCD20/huCD3, which is detected in the blood as early as two hours after treatment and maintained for up to seven days post treatment. Furthermore, activated CD8+ and CD4+ T cells are detectable in the blood within two hours of CD20 TDB administration and then decline by two days post-treatment (Figure 58D).

Further, CD20 TDB depleted marginal zone B cells (MZB) (Figure 59A and Figure 59B) as efficiently as follicular B cells (FOB) (Figure 59A and Figure 59C) in mouse spleens, after a single IV dose of 0.5mg/kg. We observed that splenic B cells declined ~ 50% from baseline by day 1 (24 hours post dose) and continued to decline rapidly to reach a nadir on day 3 that was maintained throughout the study. This is apparently different from previous report with rituximab, where microenvironment is thought to play a role in rituximab effectiveness, suggesting different mode of action for CD20 TDB *in vivo* than that for rituximab. Murine T cell activation is usually observed as soon as 30 minutes after CD20 TDB treatment in blood, and mostly within the first 24 hours in spleen (Figures 59D and 59E). Following T cell activation, increase in T cell count was observed around D2-D3 (Figure 59D and 59E), as a result of cell proliferation. By day 2 the majority of T cells were no longer CD69-positive, although levels of CD69+CD8+ cells continued to range from 10-30% for the remainder of the two week study. However, possibly due to activation induced cell death, T cell count tends to decrease following the expansion phase. T cell count will recover eventually after TDB treatment, suggesting no inhibitory effect of CD20 TDB treatment in murine T cell regeneration.

Humanized NSG mice were also used to further validate CD20 TDB potency in B cell depletion in murine models, and in a repeat dose setting. The actual mice enrolled in the study shown in Figures 60A-60D had 35-80 % human CD45+ cells in peripheral blood, and the range of CD4+, CD8+, and CD20+ cells were 12-25, 2.1-8.7, and 32-60 % respectively (percentage reported as out of viable leukocyte gate). Representative examples of this baseline characterization are shown in Figure 60E. Levels of CD3 and CD20 target antigens from these mice were compared to that of normal human donors and were found to be not significantly different (Figure 60F). Shown in Figure 59, humanized NSG mice were treated with 3 weekly doses of CD20 TDB at 0.5mg/kg. B cells were depleted in blood at D7, with almost no B cells detected at D21 (Figure 60A). Robust B cell depletion was also observed in spleens of the TDB treated mice at D21 (Figure 60B). Furthermore, treatment of humanized NSG mice with CD20 TDB stimulated T cell proliferation and led to B cell depletion as shown in Figure 60C. For CD8+T cells, their cell counts increased up to 10-fold in blood at D7, and returned to baseline or lower at D14 and D21 (Figure 60D). Similar trend was also observed for CD4+T cells.

CD20 TDB is potent in killing CLL B cells *in vitro* and *in vivo*

We also tested CD20 TDB potency in killing B leukemia cells with autologous T cells from CLL patients, where B tumor burden is usually high while T cell count is low and T cell function could be potentially compromised (Riches et al. *Semin. Cancer Biol.* 20(6): 431-438, 2010). PBMCs isolated from peripheral blood of nine CLL patients were incubated with a single high dose of 1000 ng/mL CD20 TDB for up to 48 hours. As shown in Figure 61A, CD20 TDB is potent in killing CLL B cells with autologous T cells. For the 2 samples shown, B leukemia tumor burden is 70% with 8.4% CD8+T cells in PBMCs for patient sample #1, and 80% with 4.4% CD8+T cells for patient sample #2. CD20 TDB apparently can achieve efficient B cell killing with very low effector to target ratios (1:8 and 1:18 with the 2 samples shown here). Killing of CLL B cells with autologous T cells by CD20 TDB is highly correlated with CD8+T cell count (Figure 61B). We found T cell content varied significantly (between 0.4 and 8% of mononuclear cells), and strikingly, we observed that the extent of B cell cytolysis compared to pretreatment values was highly correlated to T cell content. By supplementing purified CD8+T cells to CLL PBMCs, where very few autologous T cells are available, B leukemia cells were efficiently killed by CD20 TDB in a T cell dependent manner (Figure 61C).

CD20 TDB is also potent in depleting CLL leukemia cells engrafted in mice (Figure 62A). In brief, NSG mice were grafted with patient leukemia cells subsequent to engraftment of patient-derived autologous activated T cells, and treatment is initiated following confirmed establishment of the leukemic graft. IHC staining of representative examples of mouse spleens showed successful engraftment of B leukemia cells and autologous T cells from CLL patients in NSG mice. After a single dose of CD20-TDB treatment at 0.1 or 0.5mg/kg, few B cells could be detected. B cell depletion was also observed with rituximab treatment, while no B cell depletion is detected with HER2-TDB as an isotype control. (Figure 62B).

In the context of tumor progression, CD20 TDB treatment is effective in preventing the growth of B-cell lymphoma tumors in the presence of human donor PBMCs. SCID (severe combined immune deficiency) mice transplanted with human Bjab cells developed detectable tumors when treated with vehicle or CD20 TDB alone by day 12 post-inoculation. Further, transplantation of PBMCs alone delayed tumor outgrowth, but these mice developed detectable tumors by day 25 post-inoculation. Thus, CD20 TDB is also effective in preventing tumor growth *in vivo* in the presence of PBMC effector cells (Figure 63).

CD20 TDB potency requires very low CD20 expression level

In addition to the different requirement for antibody Fc region for CD20 TDB activity comparing to conventional anti-CD20, and possibly different dependence on tumor microenvironment, CD20 TDB also appears to require a lower level of antigen expression for efficient B cell killing. For Bjab cells, which have high level of CD20 expression (Figure 64A), comparable cell killing were accomplished with rituximab and CD20 TDB (Figure 64B). However, Nalm-6, SC-1, and OCI-Ly19 cells with much reduced level of CD20 expression (Figure 64A) were only killed by CD20 TDB, while no cell killing was detected with rituximab (Figure 64C). Estimated CD20 copy number for these CD20-low cell lines is less than 500, based on scatchard and FACS binding data in comparison to BJAB cells (data not shown). In addition, monovalent binding affinity of CD20-TDB for CD20 is ~50-100 nM, significantly less than 1-5 nM affinity of rituximab (both

measured by scatchard). Taken together, the potency of CD20-TDB is consistent with the notion that TCR triggering only requires low receptor occupancy of 10-100 molecules (Purbhoo, M.A., et al. *Nat Immunol* 5:524-530, 2004; Irvine, D.J.,et al. *Nature* 419:845-849, 2002; Sykulev, Y., et al. *Immunity* 4:565-571, 1996).

CD20 TDB is active in presence of rituximab and steroid

Since rituximab and its combination with chemotherapy are widely used in treating B cell malignancies in the clinic, it's important to explore how CD20 TDB can be used within this context, as CD20 TDB and rituximab both target the same antigen. We took advantage of rituximab-DANA, an effector-less rituximab variant (rituximab containing substitutions of residues 265 and 297 to alanine (DANA mutations described in US Patent Nos. 7,332,581 and 8,219,149)), which only binds to CD20 without B cell killing activity, as tested in human CD20/CD3 double transgenic mice (Figure 64D). Pretreatment of normal donor B-cell target cells with this inert rituximab molecule that competes with CD20-TDB binding had a remarkably minimal effect in blunting the activity of CD20-TDB. At concentrations up to to 250µg/ml rituximab-DANA (a 5000-fold excess over the 42ng/ml EC50 dose level), we observed only modest shifts in the dose-response curves *in vitro* (less than 7-fold shift at the EC50, 42 versus 320 ng/ml). Remarkably, CD20 TDB is still active in this setting. Although the EC50 for CD20-TDB was increased up to ~7-fold with higher rituximab-DANA concentration, the extent of B cell killing is not significantly changed ,(Figure 65A). This is consistent with our previous findings that very low antigen expression level, or very low receptor occupancy, is required for CD20 TDB potency. The *in vitro* observations were recapitulated *in vivo* in CD3/CD20 dual transgenic mice which were pretreated with 2 or 10 mg/kg of the rituximab-DANA protein and subsequently challenged with CD20-TDB. Here we show *in vivo* that CD20 TDB is still active in depleting B cells in mice pre-treated with rituximab-DANA (Figure 66). These results indicate great versatility in prospective combination therapies for B cell malignancies.

CD20 TDB is a T cell recruiting antibody, and its potency is dependent on activating T cells. It was also explored to see whether steroid pre-treatment, which could potentially impact T cell immune response, would affect CD20 TDB activity. *In vitro* CD20 TDB was still active in killing B cells in the presence of high concentration of dexamethasone (Figure 65B).

Pre-clinical validation of CD20 TDB as a potential therapy for CD20+B cell malignancies in cynomolgus monkeys

Pilot PKPD study for CD20 TDB was also conducted in cynomolgus monkeys. In a single dose study, where 3 animals were treated once intravenously with 1mg/kg CD20 TDB, complete B cell depletion were observed in blood (Figure 67A), as well as in spleens and lymph nodes (Figures 67B and 67C), 7 days after antibody treatment. The historic vehicle controls are shown as the mean and standard deviation of 4 vehicle-treated animals (Figure 67D). No apparent T-cell loss was observed, as both CD8+ T cells and CD4+ T cells were at comparable or higher level to controls, when calculated as % of lymphocytes. T cell activation was detected in blood 4 hours after dosing. No T cell loss was observed, and apparently higher CD8+T cell count was detected in blood 7 days after treatment (Figure 67A).

Long-term effect of CD20 TDB treatment on immune cells was also tested with a 4-week repeat dose study followed by an 8-week recovery period. In blood from 4 treated animals with a weekly dose of 1mg/kg, B and T cell counts, as well as CD20 TDB serum concentration, were measured and plotted for each individual animal over 77 days (Figure 68A). In all 4 animals, B cells were not detected in blood shortly after treatment, and didn't come back as long as CD20 TDB serum concentration remained above 100 ng/ml (animal 4502 versus animals 4001, 4002, and 4503). CD8+T cell counts, as well as that of CD4+T cells to a lesser extent, significantly increased after the first dose, and gradually returned to within 25-150% of baseline values.. Taken together, CD20 TDB is highly active in depleting B cells, without compromising T cells.

The PK property of CD20 TDB was also summarized in Figure 68B, with CD20 TDB serum concentration measured from both studies. As shown for the repeat-dose study, CD20 TDB maintained good exposure throughout, with CL at about 17ml/day/kg during the first dose (D0-D7). Target mediated clearance appears to be higher during the first dose (D0-D7), as CL value decreased to about 6ml/day/kg during the fourth dose (D21-28).

Combination of CD20 TDB with PD-L1 antagonist in a syngeneic tumor model

In vivo efficacy of a CD20 TDB in combination with a PD-L1 antagonist (a murine IgG2a isotype anti-PD-L1 antibody, 25A1, with DANA mutations) in a syngeneic tumor model was also tested. In this study, A20-huCD20 mouse B lymphoma cells which express human CD20 and mouse PD-L1 on their cell surface were utilized for generating a syngeneic tumor model (see, e.g., Figure 69A). The CD20 TDB used was a murine IgG2a isotype 2H7v16/2C11 TDB produced in knob-in-hole (K&H) format (see, e.g., Atwell et al., *J Mol Biol.*, 270:26-35, 1997), wherein the "knob" arm is anti-CD20 2H7v16 and the "hole" arm is anti-CD3 2C11 (Leo et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 84:1374-8, 1987). The PD-L1 antagonist used was a murine IgG2a isotype anti-PD-L1 antibody with DANA Fc mutations (substitution of residues 265 and 297 to alanine; see, e.g., US Patent Nos. 7,332,581 and 8,219,149).

On Day -7, 65 Balb/C mice were inoculated subcutaneously into the right unilateral-thoracic area with 2.5 million A20pRK-CD20-GFP cells in HBSS in a volume of 100 µl (not to exceed 200 µl). The mice were allowed to grow tumors. The mice were then weighed and measured 1-2 times per week until tumors achieved a mean tumor volume of approximately 100-200 mm^3 (approximately 7 days after inoculation). The animals were then divided into the following four treatment groups: Group 1: 2.5 million A20/CD20, Vehicle, qwx3, IV, n=9; Group 2: 2.5 million A20/CD20, anti-CD20xCD3 K&H TDB (2H7v16-2C11 murine IgG2), 0.5 mg/kg, qwx3, IV, n=9; Group 3: 2.5 million A20/CD20, aPDL1 (25A1, mIgG2a DANA), 10 mg/kg, tiwx3, IP, n=9; and Group 4: 2.5 million A20/CD20, aPDL1 (25A1, mIgG2a DANA), 10 mg/kg, tiwx3, IP + anti-CD20xCD3 K&H TDB (2H7-2C11 murine IgG2), 0.5 mg/kg, qwx3, IV, n=9. Mice not recruited into one of the above treatment groups due to dissimilar tumor volume were euthanized. Treatment began on Day 0, and all antibody dosing was conducted intravenously in a volume of 100 ml as described above.

Tumors were measured 1-2 times per week. Body weights were measured two times per week up to 7 days after the final treatment. If no weight loss was observed, weights were no longer taken. If weight loss was observed to be >15%, affected mice were weighed daily and euthanized if weight loss was greater than

or equal to 20%. For the entire study, clinical observations were performed twice per week to monitor the health of the animals, and any animal with a tumor which was of a size or condition that may interfere with the health or activity of the animal was be euthanized.

As depicted in Figure 69B, the combined treatment of CD20 TDB with anti-PD-L1 antibody (Group 4) exhibited an unexpected and synergistic effect in inhibiting tumor growth when compared to treatment with CD20 TDB, anti-PD-L1 antibody, or vehicle alone.

Combination of CD20 TDB with PD-1 antagonist in a syngeneic tumor model

Additionally, the *in vivo* efficacy of a CD20 TDB in combination with a PD-1 antagonist (a murine IgG2 isotype anti-PD1 antibody, 8F11, with DANA mutations) was also tested in the A20/huCD20 syngenic B lymphoma mouse model. In this study, the CD20 TDB used was a murine IgG2a isotype 2H7v16/2C11 TDB, and the PD-1 antagonist used was a murine IgG2 isotype anti-PD-1 antibody with DANA Fc mutations.

A20 mouse B lymphoma cells were transfected to express human CD20 and GFP and subsequently single cell sorted for clonal selection and expansion for implantation. Female Balb/c mice (Charles River; Hollister, CA) 8-10 weeks old were inoculated subcutaneously in the right unilateral thoracic region with 2.5 million A20.hCD20-GFP cells. When tumors reached a mean tumor volume of 100-200 mm^3, mice were recruited and randomized into one of four treatment groups (n=9 mice/group) and antibody treatment started on the following day 1: Group 1 (2.5 million A20/CD20, vehicle, qwx3, IV); Group 2 (2.5 million A20/CD20, anti-CD20xCD3 K&H TDB (2H7v16-2C11 murine IgG2), 0.5 mg/kg, qwx3, IV); Group 3 (2.5 million A20/CD20, anti-PD1 (8F11, mIgG2a DANA), 10 mg/kg, tiwx3, IP); and Group 4 (2.5 million A20/CD20, anti-PD1 (8F11, mIgG2a DANA), 10 mg/kg, tiwx3, IP + anti-CD20xCD3 K&H TDB (2H7v16-2C11 murine IgG2), 0.5 mg/kg, qwx3, IV).

The mice were treated with vehicle or CD20 TDB at 0.5mg/kg weekly IV for 3 weeks, and/or anti-PD-1 antibody at 10mg/kg IV for the first dose, followed by IP dosing 3 times a week for 3 weeks. (N=9 mice/group)

As depicted in Figures 108A and 108B, the combined treatment of CD20 TDB with anti-PD-1 antibody (Group 4) exhibited an unexpected and synergistic effect in inhibiting tumor growth when compared to treatment with CD20 TDB, anti-PD-1 antibody, or vehicle alone.

Example 4. Generation and Characterization of Exemplary CD3/FcRH5 TDBs (FcRH5 TDBs)

We also explored the capacity of TDB antibodies to recruit the cytotoxic activities of T cells in eradicating tumor cells by recognition of a different cell surface antigen, FcRH5. To this end, we generated and characterized bispecific anti-CD3 antibodies having an anti-CD3 arm and an anti-FcRH5 arm (FcRH5 TDBs). As described above, the FcRH5 TDBs were produced as full-length antibodies in the knob-into-hole format as human IgG1, as previously described (Atwell et al. *J. Mol. Biol.* 270: 26-35, 1997). Half antibodies were expressed in *E. coli*, purified by Protein A-affinity chromatography, and the proper half antibody pairs were annealed *in vitro* as described previously (Spiess et al. *Nat. Biotechnol.* 2013). After annealing, the FcRH5 TDBs were purified by Hydrophobic Interaction Chromatography (HIC) and characterized by

analytical gel filtration, mass spectrometry, and polyacrylamide gel electrophoresis, as described above. The anti-FcRH5 arm used in the generation of FcRH5 TDBs was that of anti-FcRH5 antibody 1G7, comprising (a) a VH domain comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 268 and (b) a VL domain comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 269. The anti-CD3 arms tested in the generation of FcRH5 TDBs included UCHT1v9, 40G5c, and 38E4v1.

The specific FcRH5 TDBs were tested for binding to CD8+ T cells (CD3 binding), as well as activity, as assessed by *in vitro* cytotoxicity assays and T cell activation assays.

A. Binding Affinity

Binding affinities for the each of the FcRH5 TDBs were tested FACS analysis, as described above for the CD20 TDBs. Briefly, for FACS binding assays, CD8+ T cells were incubated with various concentrations of FcRH5 TDB antibodies at 4ºC for 30 minutes, then cells were washed and incubated with 2nd antibody (anti-huIgG-PE; BD Bioscience) for another 15 minutes, before cells were washed again and ready for FACS analysis. Figure 70 shows the results of *in vitro* FACS binding assays of FcRH5 TDBs. The results demonstrate that the particular combination of anti-CD3 antibody arm, 38E4v1, pair with the anti-FcRH5 arm, 1G7, result in an FcRH5 antibody with higher binding affinity for effector cells.

B. In vitro MOLP-2 target cell killing and T cell activation assays

The generated FcRH5 TDBs were also tested for their ability to support killing of FcRH5-expressing MOLP-2 target cells and the activation of the cytotoxic effect of T cells. *In vitro* cytotoxicity was monitored by flow cytometery. Target cells were labeled with CFSE according to manufacturer's protocol (Invitrogen, #C34554). The carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE)-labeled target cells and purified CD8+ T cells from human PBMC were mixed in a 3:1 ratio, with or without TDB for 48 hours. The cells were resuspended in equal volume of PBS + 2% FBS + 1 mM EDTA + propidium iodine (PI). Flow cytometry analysis was done on a FACSCalibur in automation format. The number of live target cells was counted by gating on CFSE+/PI negative cells. The percentage of cytotoxicity was calculated as follows: % cytotoxicity (live target cell number w/o TDB – live target cell number w/TDB) / (live target cell number w/o TDB) x 100. As depicted in Figures 71A and 71B, FcRH5 TDBs with UCHT1v9 or 38E4v1 for their anti-CD3 arm showed robust *in vitro* MOLP-2 target cell killing compared to the FcRH5 TDB having 40G5c as its anti-CD3 arm.

When tested for T cell activation assays, Figures 72A-72D show that FcRH5 TDBs with UCHT1v9 or 38E4v1 for their anti-CD3 arm were capable of robustly inducing T cell activity *in vitro*, compared to the FcRH5 TDB having 40G5c as its anti-CD3 arm. In these assays, target cells and purified CD8+ T cells were mixed in the presence or absence of TDB and T cell activation was analyzed by flow cytometry. At the end of the incubation, cells were stained with CD8-FITC (BD Bioscience, 555634) CD69-PE (BD Bioscience, 555531) and CD107a-Alexa-Fluor647 (eBioscience, 51-1079). Alternatively, after surface stained with CD8-FITC and CD69-PE, cells were fixed and permeabilized with Cytofix/CytoPerm solution (BD Bioscience, 554722) and intracellular stained with anti-granzyme B-Alexa-Fluor647 (BD Bioscience, 560212). The T cell

activation was evaluated by the percentage of CD8+CD69+, CD8+CD107a+, and CD8+CD69+GranzymeB+ cells.

Example 5. Generation and Characterization of Exemplary CD3/HER2 TDBs (HER2 TDBs)

We also explored the capacity of TDB antibodies to recruit the cytotoxic activities of T cells in eradicating tumor cells by recognition of a different cell surface antigen, HER2. To this end, we generated and characterized bispecific anti-CD3 antibodies having an anti-CD3 arm and an anti-HER2 arm (HER2 TDBs). As described above, the HER2 TDBs were produced as full-length antibodies in the knob-into-hole format as human IgG1, as previously described (Atwell et al. *J. Mol. Biol.* 270: 26-35, 1997). Half antibodies were expressed in either *E. coli* or Chinese hamster ovary (CHO) cells, purified by Protein A-affinity chromatography, and the proper half antibody pairs were annealed *in vitro* as described previously (Spiess et al. *Nat. Biotechnol.* 2013). If TDB antibody production was carried out in CHO cells, the antibody included an aglycosylation mutation, for example, at residue N297 (e.g., N297G), such that the TDB antibody was an effector-less variant and unable to initiate antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC). After annealing, the HER2 TDBs were purified by Hydrophobic Interaction Chromatography (HIC) and characterized by analytical gel filtration, mass spectrometry, and polyacrylamide gel electrophoresis, as described above. One anti-HER2 arm used in the generation of HER2 TDBs was that of anti-HER2 antibody hu4D5, comprising (a) a VH domain comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 270 and (b) a VL domain comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 271. Additional HER2 TDBs were generated to target different regions of the extracellular domain (ECD) of HER2. An anti-HER2 antibody, 2C4 was used as an anti-Her2 arm comprising (a) a VH domain comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 593 and (b) a VL domain comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 594. Another anti-HER2 antibody used as an anti-HER2 arm was that of anti-HER2 antibody, 7C2 comprising (a) a VH domain comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 595 and (b) a VL domain comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 596. Other anti-HER2 arms used in the generation of HER2 TDBs included hu4D5 affinity variants, hu4D5.91A and hu4D5.Y100A (described in US 7,435,797).

The specific HER2 TDBs were tested for binding to CD8+ T cells (CD3 binding) and SKBR3 cells (Her2 binding), as well as activity, as assessed by *in vitro* cytotoxicity assays and T cell activation assays.

A. Binding Affinity

Binding affinities for each of the HER2 TDBs were tested by FACS analysis, as described above for the CD20 TDBs. Briefly, for FACS binding assays, Jurkat cells (for CD3 antigen), human CD8+ cells (for CD3 antigen), or SKBR3 (for Her2 antigen) were incubated with various concentrations of HER2 TDB antibodies at 4ºC for 30 minutes, then cells were washed and incubated with 2nd antibody (anti-huIgG-PE, BD Bioscience; or anti-huIgG-AlexaFluor647, Southern Biotech) for another 15 minutes, before cells were washed again and ready for FACS analysis. The geo mean of fluorescence was read by flow cytometry. Figures 73, 76A, 78A-78C, 79A, and 80A-80B show the results of *in vitro* FACS binding assays of HER2 TDBs. Multiple HER2 arms that bind to different regions of HER2 were tested in combination with multiple

CD3 arms that bind to various regions of CD3ε to characterize the binding properties of each combination. Figure 76A provides the crystal structure of the HER2 ECD and that of $CD3_{\varepsilon}$ and highlights the regions to which the different HER2 and CD3 arms bind for each. The hu4D5 HER2 antibody is known as trastuzumab and binds to an epitope in domain IV of HER2 that is the protein region closest to the cellular membrane. The recombinant humanized monoclonal antibody 2C4 (rhuMAb 2C4) is also known as pertuzumab that binds to an epitope in domain II of HER2 that is 50 Angstroms from where hu4D5 binds. Pertuzumab (PERJETA®, Genentech, Inc, South San Francisco) represents the first in a new class of agents known as HER dimerization inhibitors (HDI) and functions to inhibit the ability of HER2 to form active heterodimers or homodimers with other HER receptors (such as EGFR/HER1, HER2, HER3 and HER4) (Harari and Yarden. *Oncogene* 19:6102-6114, 2000; Yarden and Sliwkowski. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2:127-137, 2001; Sliwkowski. *Nat. Struct. Biol.* 10:158-159, 2003; Cho et al. *Nature* 421:756-60, 2003; and Malik et al. *Pro. Am. Soc. Cancer Res.* 44:176-177, 2003). Anti-HER2 murine antibody 7C2 binds to an epitope in domain I of HER2 (PCT Publication No. WO 98/17797) that is 100 Angstroms away from the HER2 region bound by hu4D5 (Figure 76A).

Additionally, the binding affinity of HER2 TDB was tested with multiple anti-CD3 arms. One of the given anti-HER2 arms was combined with high affinity human CD3 targeting arms such as SP34 and 38E4v1. Other HER2 TDB combinations included the low affinity human CD3 targeting arms 40G5c or the murine CD3 targeting arm of 2C11. UCHT1v9 for its anti-CD3 arm and hu4D5 for its anti-HER2 arm, herein referred to as HER2 TDB (UCHT1v9/hu4D5) or HER2 TDB, was compared to the anti-HER2 antibody, trastuzumab, and the trastuzumab-Fab fragments in a competitive Scatchard assay (Ramirez-Carrozzi et al. *Nature Immunology*. 12: 1159-1166, 2011). In this assay, binding to SKBR-3 was determined by competition binding of ^{125}I-trastuzumab Fab with trastuzumab, trastuzumab-Fab, or bispecific HER2 TDB. Figure 74A shows the results of the *in vitro* competitive Scatchard assay of HER2 TDB.

B. In vitro SKBR3 and MCF7 target cell killing and T cell activation assays

The HER2 TDB combinations of one of the three anti-HER2 arms (hu4D5, 2C4, and 7C2) with either the high affinity 38E4v1 or low affinity 40G5c anti-CD3 arm were tested *in vitro* for their ability to mediate target cell killing of HER2-expressing SKBR3 or MCF7 cells (Figure 77). The *in vitro* activity the hu4D5 TDBs with either anti-CD3 arm proved to be more effective than the 2C4 and 7C2 TDBs in mediating maximal SKBR3 and MCF7 cell killing as measured by their EC50 (Figure 78). This killing activity was also dependent on the CD3 arm utilized. The combination of the anti-CD3 arm 38E4v1 with any one of the anti-HER2 hu4D5, 2C4, or 7C2 arms was more efficacious than that of the 40G5c HER2 TDB combinations (Figure 79). Further testing of the 6 HER2 TDB combinations revealed that their target cell killing activity is not dependent on the level of HER2 expression in target cells. Figure 80 shows that the HER2 TDBs were not selective for high HER2 expressing SKBR3 target cells over low HER2 expressing MCF7 target cells. The activity of the HER2 TDB was instead dependent on the affinity of the anti-HER2 arm for HER2 (Figure 81). The low HER2

affinity TDBs retained activity on low HER2-expressing MCF7 cells and were not able to selectively kill HER2 amplified SKBR3 cells (Figure 82).

The HER2 TDBs were also assayed for the specificity of the anti-HER2 arm for their respective HER2 epitopes. The killing activity of the hu4D5-40G5c HER2-TDB was limited when combined with increasing concentrations of Trastuzumab (hu4D5). However, the efficacy of trastuzumab is not affected by the combination of the hu4D5 TDB with the hu4D5 antibody (Figure 83). By contrast, target cell killing as mediated by 2C4-40G5c or 7C2 38E4v1 as blocked by co-administration of the bivalent monospecific antibodies pertuzumab (2C4) or 7C2, respectively (Figure 83). When additional anti-HER2 arms were tested in multiple affinity assays, all clones demonstrating high or medium HER2 TDB activity competed with trastuzumab or pertuzumab (Figure 84). For identification of candidate TDBs to be assayed *in vivo*, high (38E4v1, 38E4 , and SP34) and low (40G5c and 2C11) affinity CD3 arms were tested *in vitro* with mouse-derived humanized CD3+ T cells in combination with hu4D5, 2C4, and 7C2 anti-HER2 arms (Figures 85-86). From this assay, three candidate TDBs were selected based on their killing activity for further characterization *in vivo*: hu4D5-SP34, hu4D5-2C11, and 2C4-38E4. The treatment of HER2-expressing tumor-bearing animals with the hu4D5-2C11 HER2 TDB resulted in an increase in CD45+ and CD8+ cells in the tumor as early as 4 hours post-treatment. Upon further analysis, HER2-TDB treated tumors revealed an increase in IFNγ+ and PD1+ CD8+ T cells as well as an increased presence of T regulatory (Treg) cells (Figure 87B). The detection of increased immune infiltrates in tumors was also correlated with a decrease in the tumor volume of HER2-TDB treated animals as compared to vehicle control treatment (Figure 87A). In Figure 88A, the anti-HER2 arm hu4D5 combined with the low affinity anti-CD3 arm, 2C11 or high affinity anti-CD3 arm, SP34, both resulted in tumor regression in transgenic HER2 mice. However, this response was not observed with the lower affinity 2C4 anti-HER2 arm combined with the 38E4 high affinity anti-CD3 arm (Figures 88A-88B).

HER2 TDB was also compared to bivalent trastuzumab and trastuzumab-Fab fragments for its ability to directly inhibit SKBR3 proliferation. HER2-expressing SKBR3 target cells were plated in 96-well plates at a density of 5×10^3 cells/well and incubated overnight for cell attachment before treatment with the designated antibody or fragment antibody. Cell proliferation/viability was analyzed after 6 days of treatment by CELLTITERGLO® Luminescent Cell Viability Assay (Promega, Madison, WI). The results of this assay are shown in Figure 74B. Additionally, an *in vitro* cytotoxicity assay was performed with trastuzumab, trastuzumab produced in *E. coli*, and HER2 TDB to measure their ability to induce NK cell-mediated antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) (Jefferis *Trends in Pharmacological sciences*. 30: 356-362, 2009; Simmons et al. *Journal of Immunological Methods*. 263: 133-147, 2002). Antibodies produced in *E. coli* are not glycosylated, which results in impaired FcγR binding, which is required to mediate ADCC. The cytotoxicity assay was performed as in Junttila et al. (*Cancer Research.* 70: 4481-4489, 2010) with a Cytotoxicity Detection Kit; LDH (Roche, Mannheim, Germany). Briefly, lysed cells were detected by lactate dehydrogenase (LDH) release following 4 hours of treatment with the specified antibody. The results are shown in Figure 74C.

The generated HER2 TDBs were also tested for their ability to support killing of HER2-expressing SKBR3 target cells and the activation of the cytotoxic effect of T cells. *In vitro* cytotoxicity was monitored by flow cytometry. Target cells were labeled with carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) according to manufacturer's protocol (Invitrogen, #C34554). The CFSE -labeled target cells and purified CD8+ T cells from human PBMC were mixed in certain E:T ratio (as indicated in figure legends), with or without TDB for 24 hours. At the end of the incubation, the cells were lifted by trypsin and collected from the plate. The cells were resuspended in equal volume of PBS + 2% FBS + 1 mM EDTA + propidium iodine (PI). Flow cytometry analysis was done on a FACSCalibur in automation format. The number of live target cells was counted by gating on CFSE+/PI negative cells. The percentage of cytotoxicity was calculated as follows: % cytotoxicity (live target cell number w/o TDB – live target cell number w/TDB) / (live target cell number w/o TDB) x 100. As depicted in Figure 75, HER2 TDB showed robust *in vitro* SKBR3 target cell killing compared to the HER2 TDB having either hu4D5 affinity variant 91A or Y100A as its anti-HER2 arm (EC50 of hu4D5/ UCHT1v9 TDB = 0.1 ng/ml; hu4D5.91A/ UCHT1v9 TDB = 25.5 ng/ml; hu4D5.Y100A/ UCHT1v9 TDB = not able to be determined).

Additionally, the binding affinity of anti-HER2 hu4D5 variant (.4 nM) to the HER2 extracellular domain (ECD) is higher than the HER2 arms 2C4 (2.0 nM) and 7C2 (1.7 nM), which is shown in Figure 76B. Furthermore, Figure 76C shows the hu4D5 HER2-TDB is a more potent mediator of MCF7 target cell killing than the 2C4 HER2-TDB and the 7C2 HER2-TDB. The kinetics of the killing induced by HER2 TDB were additionally assayed. As seen in Figure 94A, no significant killing activity was detected at 4-12 hours. Robust killing was detected at 24 hours and killing activity increased over time. As shown in Figures 90A – 90C and 92C, further comparison of anti-CD3 arms of the hu4D5 HER2-TDB demonstrated the effectiveness of the differing clones in mediating the killing of HER2-expressing SKBR3 cells. In particular, two HER2 TDBs, hu4D5/38E4c and hu4D5/40G5c, were surprisingly as effective or better in mediating target cell killing than the HER2 TDB hu4D5/SP34 (Figures 90B and 90C).

When tested for T cell activation assays, Figure 89 shows that HER2 TDB was capable of robustly inducing T cell activity *in vitro*, compared to the HER2 TDB having either hu4D5 affinity variant 91A or Y100A as its anti-HER2 arm. Three anti-CD3 arms (SP34, 38E4c, and 40G5c) of the hu4D5 HER2-TDB assayed displayed differing binding affinities for the CD3 antigen on human CD8+ T cells, as seen in Figure 91A. Nonetheless, all three HER2-TDBs were able to mediate CD8+ T-cell activation (Figure 91B). Additional analysis of the ability of the 38E4 and 38E4c anti-CD3 arms of the hu4D5 HER2-TDB to mediate CD8+ T cell activation is shown in Figure 92D. The kinetics of the T cell activation induced by HER2 TDB was further assayed. Early signs of T cell activation (CD69) appeared 4h after HER2 TDB treatment was initiated. However, late activation markers (extracellular CD107a) were detected later at the 24 hour time point (Figure 94A). Additionally, T cell activation was not detected after 48 hours when CD8+ cells were incubated with HER2 TDB or target cells that do not express human HER2 (BJAB cells). A robust T cell activation was seen when HER2+ SKBR3 cells were used as targets accompanied by release of cytotoxic granules (Figure 93A).

We also tested the ability of HER2 TDB to induce killing of BT474 target cells and activate T cells was assayed for the following five ratios of effector CD8+ T cells to target cells: 1:5, 1:2, 1:1, 3:1, and 5:1.

This experiment reveals the cytotoxicity measured by LDH release was significantly reduced by effector cell titration; however even with an E:T ratio of ≤1:1, a weak LDH signal and robust activation of T cells was detected (Figure 94B).

In these assays, target cells and purified CD8+ T cells were mixed in the presence or absence of TDB and T cell activation was analyzed by flow cytometry. At the end of the incubation, cells were stained with CD8-FITC (BD Bioscience, 555634) CD69-PE (BD Bioscience, 555531) and CD107a-Alexa-Fluor647 (eBioscience, 51-1079). Optionally, cells were stained with CD8-FITC and CD69-PE, where T cell activation was evaluated by the percentage of CD8+CD69+ in CD8+ cells. Alternatively, after surface stained with CD8-FITC and CD69-PE, cells were fixed and permeabilized with Cytofix/CytoPerm solution (BD Bioscience, 554722) and intracellular stained with anti-granzyme B-Alexa-Fluor647 (BD Bioscience, 560212). The T cell activation was evaluated by the percentage of CD8+CD107a+ cells.

Another measure for T cell-mediated cytotoxicity for HER2 TDB (UCHT1v9/hu4D5) measured is a granule exocytosis assay. Figure 93B shows the results for soluble perforin (Cell Sciences), granzyme A and granzyme B (eBioscience) detected from growth media by ELISA according to manufacturer's protocols. In this assay, a control TDB (10 ng/ml), one that shares the same CD3-arm as HER2 TDB but has an irrelevant target arm, or HER2 TDB (10 ng/ml) was utilized. The antibodies were individually incubated for 18 hours with SKBR3 target cells and effector peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), which were separated from the blood of healthy volunteers using lymphocyte separation medium (MP Biomedicals, Solon, OH). *In vitro* cytotoxicity was measured by LDH release as described above. A series of apoptotic assays were performed with HER2 TDB (1 ng/ml), effector PBMCs, and SKBR3 target cells. After 24 hours of treatment, granule exocytosis coincided with significant HER2 TDB induced elevation of caspase 3/7 activity (CASPASE-GLO® 3/7 assay, Promega), apoptosis (Cell Death Detection ELISA^{plus} assay, Roche) and cytotoxicity as measured by lactate dehydrogenase (LDH) release, which is described above (Figure 93C).

The ability of HER2 TDB to induce killing of HER2 or vector-transfected 3T3 cells was measured by the aforementioned LDH cytotoxicity assay, where no killing of vector-transfected 3T3-cells was detected after 19 hours; in contrast, the HER2 transfected 3T3-cells were very efficiently killed (Figure 93D). The killing assay was modified to block the HER2 arm binding using trastuzumab Fab (1μg/ml) or soluble HER2 extracellular domain (HER2 ECD) (1 μg/ml) and resulted in the efficient inhibition of the killing activity after 24 hours (Figure 93E). To confirm T cell dependence of killing, CD3+ cells were depleted from the PBMC using CD3+ MicroBeads from Miltenyi (#130-050-101). Figure 93F shows the depletion resulted in loss of target cell killing activity after 19 hours as assessed by FACS analysis in the presence of HER2 TDB.

HER2 TDB induces T cell proliferation

To investigate whether HER2 TDB induces T cell proliferation, CD8+ T cells, target cells (SKBR3) and 0.1 μg/ml HER2 TDB were co-cultured, followed by T cell culture in absence of target cells and HER2 TDB. Proliferation of T cells was measured at day 3 by flow cytometry as a dilution of CFSE in CD8+/PI- cells with cell divisions. After 3 days, 75% of the T cells pulsed with HER2 TDB and target cells had undergone a cell division as shown in Figure 95A. HER2 TDB induced T cell number was assayed for by labeling purified

CD8+ T cells with CFSE according to the manufacturer's protocol (Invitrogen, #C34554). CFSE-labeled CD8+ T cells were incubated with target cells in the presence or absence of TDB for 19 hours. T cells were collected, washed, and cultured for 2-7 days (RPMI+10% FBS). Live CD8+ cell number (CD8+/PI-) and the percentage of CFSE dim cells was detected by FACS. In Figure 95B, the cell number did not increase. Further supplementing the growth media with IL-2 (20 ng/ml) provided a survival signal to CD8+ cells, and a robust T cell proliferation was detected in the T cells, but only if they were exposed to both HER2 TDB and target cells (Figure 95C). Importantly, no bystander effect on non-target expressing cells was detected in conditions where most HER2+ cells in the same culture were killed. HER2 TDB induced proliferation and polyclonal expansion of T cells, which may be critical for amplification of tumor-infiltrating lymphocytes.

HER2 TDB activity correlates with the target cell HER2 expression level

To investigate the relationship between target copy number and TDB activity, a panel of cancer cell lines with pre-determined number of HER2-receptors on the cell membrane was selected (Aguilar et al. *Oncogene*. 18:6050-62, 1999). HER2 protein expression levels in a HER2 negative cell line (BJAB LUC), 3 HER2 low cell lines (MDA435, MDA231, MCF7), and 3 HER2 amplified/overexpressing cell lines (MD453, SKBR3, BT474) were detected by Western blot (Figure 96A). HER2-negative, HER2-low, and HER2-overexpressing cell lines were incubated with HER2 TDB and with effector PBMCs at a ratio of E:T 25:1 for 26 hours. At this timepoint, cytotoxicity was detected using the LDH release assay. Figure 96B shows the HER2 amplified/overexpressing cells were significantly more sensitive to the TDB mediated killing (p=0.015, t-test) and were efficiently lysed at femtomolar to low picomolar concentrations (EC50=0.8-3 pM). Cell lines expressing low levels of HER2 were significantly less sensitive to HER2 TDB antibody (EC50=33-51 pM). As low as <1000 copies of target antigen was sufficient to support T cell killing.

For the studies performed in Figures 96C-96D, the MCF7cell line or the BJAB cell line was co-targeted with SKBR3 cells in the presence of HER2 TDB in the same killing assay. In this assay, MCF7 or BJAB cells were labeled with CFSE and mixed with SKBR3 and PBMC (E:T 20:1) followed by 19 hours treatment with HER2 TDB. Cells were stained with anti-HER2 APC and PI. Figure 96C shows the percentage of living SKBR3 (HER2 high, PI-) and MCF7 (CFSE+. PI-) cells detected by FACS and normalized to fluorescent beads. No killing of MCF7 cells was detectable at the EC50 for SKBR3 killing. The percentage of living SKBR3 (HER2 high, PI-) and BJAB (CFSE+ PI-) cells detected by FACS and normalized to fluorescent beads is shown. No significant killing of BJAB cells was detectable at any HER2 TDB concentration (Figure 96D).

Very low target occupancy is sufficient for TDB activity

Next, the HER2 occupancy at EC50 for HER2 TDB was calculated using formula $[D]/[D]+K_D$ (where the D = drug and K_D for HER2 TDB was 5.4 nM). HER2 copy number was previously reported (Aguilar et al. Oncogene. 18: 6050-6062, 1999). EC50 values were calculated from dose response data in Figure 97B. Figure 96E shows that in all tested cell lines less than 1% target occupancy was sufficient for efficient killing. In the case of the high HER2 expressing cell lines, the required occupancy was even lower (0.01-0.05%).

The calculated absolute number of HER2 TDB bound to HER2 at the EC50 was as low as 10-150 in the low expressing cell lines. These results showcase the extreme potency of HER2 TDB and are consistent with studies of TCR triggering, which suggest as few as 1-25 TCRs need to be engaged to trigger T cell responses (Irvine et al. *Nature*. 419: 845-849, 2002; Purbhoo et al. *Nature Immunology*. 5: 524-530, 2004; Sykulev et al. *Immunity*. 4: 565-571, 1996). The potency of HER2 TDB was consistently in the low picomolar to femtomolar range. Furthermore, as few as 10-500 HER2-bound TDBs were sufficient to induce significant *in vitro* cytotoxicity. As few as ~1000 copies of HER2 on the plasma membrane were sufficient to induce killing. These studies also demonstrated a correlation between target expression levels and *in vitro* sensitivity to HER2 TDB.

HER2 TDB is efficient in killing of HER2+ cancer cells refractory to anti-HER2 therapies

Next, cell lines that have previously been shown to express high levels of HER2 but are insensitive to the direct cellular effects of trastuzumab and lapatinib *in vitro* were examined (Junttila et al., *Cancer Cell*, 15:429-40, 2009; Junttila et al. *Breast Cancer Res Treat*, 2010). For some cell lines, activation of the PI3K pathway due to acquired activating mutations in the PI3K catalytic subunit (KPL4, HCC202) or by PTEN loss (HCC1596) may cause resistance. A panel of six cell lines (5 breast, 1 lung) was assayed for LDH release as a measure of cytotoxicity in the presence of effector PBMCs at a ratio of 10:1and HER2 TDB for 19 hours. The EC50 for HER2 TDB mediated killing was in the femtomolar or low picomolar range (Figure 97A). Parental and T-DM1 resistant BT474-M1 clones were treated with T-DM1 for 3 days. At this timepoint, cell viability was measured using CELLTITERGLO® (Figure 97B). Sensitivity of the cell lines to T-DM1 has been previously reported (Junttila et al. *Breast Cancer Res Treat*. 2010; Lewis Phillips et al. *Cancer Research.* 68: 9280-9290, 2008). By comparison, parental and T-DM1 resistant BT474-M1 clones were treated with HER2 TDB in the presence of effectors CD8+ T cells at a ratio of 3:1 for 24 hours. Cytotoxicity was detected using FACS assay (Figure 97C). In addition, HER2 TDB was effective in killing HER2+ lung cancer cells. Using two independent cell line models KPL4 and BT474, (Figure 97B-97C), acquired resistance to T-DM1 did not affect the sensitivity to HER2 TDB.

Recruitment of T cell killing activity with HER2 TDB is dependent on HER2 expression, but independent of HER2 signaling pathway, which suggests that HER2 TDB may be efficient in treatment of tumors that are refractory to current anti-HER2 therapies. In accordance, data demonstrated equal activity in treatment of multiple trastuzumab/lapatinib resistant cell lines compared to sensitive cells. Resistance in these cells is generated by various mechanisms affecting HER2 pathway. Data presented here suggest that switching to alternative mechanism of action by using HER2 TDB may broadly enable overcoming resistance to antibody-drug conjugates (e.g., T-DM1), targeted small molecule inhibitors (e.g., lapatinib) and therapeutic monoclonal antibodies that block the pathway signaling (e.g., trastuzumab).

Pharmacokinetics of HER2 TDB in rat

To assess the pharmacokinetic (PK) profile of HER2 TDB, Sprague-Dawley rats were utilized. Animals were separated into the following two groups: Group 1: HER2 TDB (10 mg/kg, single IV, n = 4);

Group 2: trastuzumab (10 mg/kg, single IV, n = 4). Samples were taken from 4 rats per group at time points through 35 days post dose. Approximately 0.2 ml of whole blood was collected via the jugular vein (under CO_2/O_2 anesthesia). The samples were allowed to clot and centrifuged under refrigeration (5°C for 10 minutes at 2000 x g) to obtain serum. Serum samples were assayed for human IgG by ELISA, where Donkey anti-huFc coated to microtiter plate was used to capture the humanized anti HER2 antibodies in circulation and goat anti-huFc-HRP (mouse adsorbed) for detection. PK parameters were determined with a 2-compartment method (Model 7) using WINNONLIN®, version 5.2.1 (Pharsight Corp., Mountain View, CA). HER2 TDB does not cross react with rat CD3 or rat HER2 and displayed a biphasic disposition typical of an IgG1 with a short distribution phase and slow elimination phase (Figure 98). Both the clearance and half-life of HER2 TDB were similar to trastuzumab, and within expected range of a typical IgG1 in rats.

HER2 TDB inhibits tumor growth *in vivo* in immuno-compromised mice

In vivo efficacy of HER2 TDB was tested in NOD-SCID mice, which lack endogenous functional T and B cells and have reduced levels of NK, DC, and macrophage cell types. In this experiment, NOD/SCID mice (NOD.CB17-*Prkdcscid*/J, Jackson Labs West) were implanted with 0.36mg, 60 day sustained release estrogen pellets (Innovative Research of America) 1 to 3 days prior to cell inoculation, subcutaneously over the opposite flank of tumor inoculation. On Day 0, 5×10^6 MCF7-neo/HER2 cells were injected either alone or together with 10×10^6 unstimulated human PBMC from one of two healthy donors (PBMC 1, 2) in HBSS-matrigel in the right 2/3 mammary fat-pad. Inoculated mice were divided into the following five groups: Group 1: Vehicle (control TDB, 0.5 mg/kg, qwk x 3, IV, starting on day 0, n=5-10); Group 2: PBMC(1) (PBMC (1) + control TDB, 0.5 mg/kg, qwk x 3, IV, starting on day 0, n=5-10); Group 3: PBMC (1) + HER2 TDB (PBMC (1) + HER2 TDB, 0.5 mg/kg, qwk x 3, IV, starting on day 0, n=5-10); Group 4: PBMC(2) (PBMC (2) + control TDB, 0.5 mg/kg, qwk x 3, IV, starting on day 0, n=5-10); and Group 5: PBMC (2) + HER2 TDB (PBMC (2) + HER2 TDB, 0.5 mg/kg, qwk x 3, IV, starting on day 0, n=5-10). The first treatments were administered 2 hours post-inoculation. Tumor volumes from individual mice and fitted tumor volumes of treatment groups are presented in Figure 99A, where HER2 TDB prevented growth of HER2 expressing tumors.

The dependency of HER2 TDB on human PBMCs was further tested in a similar immune-compromised mouse model. Again, 5×10^6 MCF7-neo/HER2 cells were injected either alone or together with 10×10^6 unstimulated human PBMC from a healthy donor (PBMC 3) in HBSS-matrigel in the right 2/3 mammary fat-pad, and the first treatments were administered 2 hours post-inoculation. In Figure 100A, inoculated mice were divided into the following two groups: Group 1: Untreated (n=7); Group 2: HER2 TDB (HER2 TDB, 0.5 mg/kg, qwk x 3, IV, starting on day 0, n=7). In Figure 100B, inoculated mice were divided into the following three groups: Group 1: Untreated (n=7); Group 2: PBMC(3) (PBMC (3) + vehicle, 0.5 mg/kg, qwk x 3, IV, starting on day 0, n=7); Group 3: PBMC(3) + control TDB (PBMC(3) + control TDB-2C11, 0.5 mg/kg, qwk x 3, IV, starting on day 0, n=7). The resulting tumor volume measurements reveal no effect on the tumor growth in control TDB-treated animals.

HER2 TDB causes regression of large mammary tumors in huHER2 transgenic mice

To model the activity of HER2 TDB in immuno-competent mice, human MMTV-huHER2 transgenic mice were used (Finkle et al*. Clinical Cancer Research*. 10: 2499-2511; 2004), and a surrogate HER2 TDB comprising a murine IgG2A CD3 reactive antibody clone 2C11 (Leo et al. *Proc Natl Acad Sci USA*. 84: 1374-1378, 1987) was generated to avoid immune response towards the TDB. For expression as muIgG2a, equivalent knob-into-hole mutations (Atwell et al. *J Mol Biol.* 270: 26-35, 1997) were introduced into the Fc region, as well as D265A and N297G (EU numbering) to abolish effector function. In muIgG2a HER2 TDBs the "knob" arm is murine anti-HER2 hu4D5 and the "hole" is either chimeric anti-murine CD3 2C11 (Leo et al. *Proc Natl Acad Sci USA*. 84: 1374-1378, 1987) (TDB 2C11/hu4D5) or mouse anti-hu CD3 SP34 (Pessano et al. *The EMBO Journal.* 4: 337-344, 1985) (TDB SP34/hu4D5). The muIgG2a bispecific antibodies were expressed in CHO cells and assembled by *in vitro* assembly. Bispecific antibodies were purified from contaminants by hydrophobic interaction chromatography (HIC) as described elsewhere (Speiss et al. *Nat Biotechnology.* 31: 753-758, 2013). The resulting material was analyzed for endotoxin levels using an ENDOSAFE® portable test system (Charles River, USA) and when needed, the endotoxin content was reduced by washing the protein with 0.1% TRITON™ X-114. The *in vitro* activity of hu4D5/2C11-TDB was similar to human CD3 reactive HER2 TDB (Figure 101).

In Figures 99B-99D, MMTV-huHER2 transgenic animals with established mammary tumors were divided into the following two groups: Group 1: Vehicle (0.5 mg/kg, qwk x 5, IV, starting on day 0, n=7); and Group 2: HER2 TDB (HER2 TDB (2C11/hu4D5), 0.5 mg/kg, qwk x 5, IV, starting on day 0, n=7). Figure 99B shows regression was detected in 57% mice and 43% mice had no detectable tumor following treatment. Figure 99C shows HER2 TDB (2C11/hu4D5) resulted in more than 50% tumor regression, with the exception of one tumor. Responders included tumors that were >1000 mm^3 at the start of the treatment as observed in Figure 99D. In a similar experiment two control TDBs were utilized where one is a CD3-arm control TDB, one with the murine specific CD3 arm switched to the human specific CD3 arm (HER2 TDB (SP34/hu4D5)), and one is a control TDB, one that shares the same CD3-arm as HER2 TDB (2C11/hu4D5) but has an irrelevant target arm (CTRL TDB-2C11). In Figure 99E, MMTV-huHER2 transgenic animals with established mammary tumors were divided into the following two groups: Group 1: CD3-arm control TDB (HER2 TDB (SP34/hu4D5), 0.5 mg/kg, qwk x 5, IV, starting on day 0, n=5); and Group 2: control TDB (control TDB-2C11, 0.5 mg/kg, qwk x 5, IV, starting on day 0, n=5). The growth of MMTV-huHER2 transgenic tumors was not affected by control TDBs.

The HER2 TDB was further tested for *in vivo* efficacy in huCD3 transgenic mice. Human CD3ε transgenic mice have been previously described ((huCD3 transgenic), de la Hera et al. *J Exp Med.* 173: 7-17, 1991). In this study, 0.1 million CT26-HER2 cells were injected subcutaneously into huCD3 transgenic mice. Once the CT26-HER2 tumors were established, animals were divided into the following two groups: Group 1: Vehicle (0.5 mg/kg, qwk x 3, IV, starting on day 0,n=7); Group 2: HER2 TDB (HER2 TDB (SP34/hu4D5), 0.5 mg/kg, qwk x 3, IV, starting on day 0, n=7). HER2 TDB inhibited the growth of established tumors, but the effect was transient and no complete responses were seen (Figure 99F). The study demonstrated the potent *in vivo* activity of HER2 TDB, including dramatic responses in MMTV-huHER2 transgenic mice.

In a similar experiment, *in vivo* efficacy of the mouse reactive HER2 TDB (2C11/hu4D5) was tested in Balb/c mice. Again, syngeneic tumors were established in Balb/c mice by injecting $1x10^5$ CT26-HER2 cells subcutaneously. Tumor-bearing animals were divided into one of the following four groups: Group 1: Vehicle (0.5 mg/kg, qwk x 3, IV, starting on day 0,n=10); Group 2: HER2 TDB (HER2 TDB (2C11/hu4D5), 0.5 mg/kg, qwk x 3, IV, starting on day 0, n=10); Group 3: control TDB (CTRL TDB (2C11/hu4D5), 0.5 mg/kg, qwk x 3, IV, starting on day 0, n=10); and Group 4: TDM-1 (TDM-1, 15 mg/kg, qwk x 3, IV, starting on day 0, n=10). Figure 99G shows that despite incomplete responses, HER2 TDB significantly prolonged the time to tumor progression (Log-Rank p-value < 0.0001). By contrast, the control TDB with an irrelevant tumor arm had no effect on tumor growth. In addition, the tumors were insensitive to TDM-1.

HER2 TDB inhibits growth of established tumors in immuno-competent mice

Human CD3ε transgenic mice (de la Hera et al. *J Exp Med.* 173: 7-17, 1991) were used to model the activity of HER2 TDB in immuno-competent mice. In this experiment, huCD3 transgenic T cells were extracted from spleens of huCD3 transgenic and BALB/c mice or from the peripheral blood of healthy human donors. Cells were stained with mouse or human CD8 and either human CD3 (clone UCHT1) in Figure 101A or mouse CD3 (clone 2C11) in Figure 101B. CD8+ cells were detected by flow cytometry. Figure 101A shows huCD3 transgenic T cells express human CD3 at approximately 50% of the level of human T cells, and Figure 101B shows huCD3 transgenic T cells express murine CD3 at approximately 50% of the level of BALB/c mice.

Next, huCD3 transgenic T cells were assayed for their ability to kill human HER2 expressing CT26 target cells *in vitro.* In this study, T cells were extracted from spleens of huCD3 transgenic mice, BALB/c mice or from peripheral blood from healthy human donors. *In vitro* killing activity of CT26-HER2 cells was tested using human CD3-specific HER2 TDB (UCHT1v9/hu4D5) in Figure 102A or mouse CD3-specific HER2 TDB (2C11/hu4D5) in Figure 102B. Effector T cells were added at a ratio of 20:1 to target cells in the presence of the designated HER2 TDB for 40 hours. *In vitro* cytotoxicity was monitored by flow cytometry. Although killing activity of mouse splenic T cells (EC50 = 2.4 ng/ml) was consistently lower compared to human peripheral T cells (EC50 = 0.4 ng/ml), huCD3 transgenic T cells killed human HER2 expressing target cells *in vitro* as seen in Figure 102A. The mouse specific HER2 TDB (2C11/hu4D5) induced target cell killing by T cells from both huCD3 transgenic (EC50 = 11 ng/ml) and BALB/c (EC50 = 10 ng/ml) mice as seen in Figure 102B.

The T cell dependency of the anti-tumor activity of HER2 TDB was further assayed in a syngeneic tumor model. As described above, $1x10^5$ CT26-HER2 cells were injected subcutaneously into BALB/c mice. Mice with established tumors were divided into one of following two groups: Group 1: Vehicle (n=10); Group 2: HER2 TDB (SP34/hu4D5) (HER2 TDB (SP34/hu4D5), 0.5 mg/kg, qwx3, IV, n=10). Figure 103 shows the activity of HER2 TDB was dependent on T cells, since HER2 TDB had no effect in non-huCD3 transgenic mice. This study demonstrated huCD3 transgenic mice can be used as a novel efficacy model for the huCD3 targeting molecules.

Example 6. Generation and Characterization of Exemplary CD3/LYPD1 TDBs (LYPD1 TDBs)

We also explored the capacity of TDB antibodies to recruit the cytotoxic activities of T cells in eradicating tumor cells by recognition of a different cell surface antigen, LYPD1. To this end, we generated and characterized bispecific anti-CD3 antibodies having an anti-CD3 arm and an anti-LYPD1 arm (LYPD1 TDBs). As described above, the LYPD1 TDBs were produced as full-length antibodies in the knob-into-hole format as human IgG1, as previously described (Atwell et al. *J. Mol. Biol.* 270: 26-35, 1997). Half antibodies were expressed in either *E. coli* or Chinese hamster ovary (CHO) cells, purified by Protein A-affinity chromatography, and the proper half antibody pairs were annealed *in vitro* as described previously (Spiess et al. *Nat. Biotechnol.* 2013). If TDB antibody production was carried out in CHO cells, the antibody included an aglycosylation mutation, for example, at residue N297 (e.g., N297G), such that the TDB antibody was an effector-less variant and unable to initiate antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC). After annealing, the LYPD1 TDBs were purified by Hydrophobic Interaction Chromatography (HIC) and characterized by analytical gel filtration, mass spectrometry, and polyacrylamide gel electrophoresis, as described above. The anti-LYPD1 arm used in the generation of LYPD1 TDBs was that of anti-LYPD1 antibody YWO.49.H6, comprising (a) a VH domain comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 272 and (b) a VL domain comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 273. The anti-CD3 arms tested in the generation of LYPD1 TDBs included UCHT1v9, 40G5, SP34, and 38E4v1.

The specific HER2 TDBs were tested for binding to CD8+ T cells (CD3 binding), as well as activity, as assessed by *in vitro* cytotoxicity assays and T cell activation assays.

A. Binding Affinity

Binding affinities for the each of the LYPD1 TDBs were tested FACS analysis, as described above for the CD20 TDBs. Briefly, for FACS binding assays, CD8+ T cells were incubated with various concentrations of LYPD1 TDB antibodies at 4ºC for 30 minutes, then cells were washed and incubated with 2nd antibody (anti-huIgG-PE; BD Bioscience) for another 15 minutes, before cells were washed again and ready for FACS analysis. Figure 104 shows the results of *in vitro* FACS binding assays of LYPD1 TDBs. The binding studies showed that LYPD1 TDBs having either UCHT1v9 or 38E4v1 as their anti-CD3 arm demonstrated a higher binding affinity for result effector cells.

B. In vitro OVCAR3.Luc target cell killing and T cell activation assays

The generated LYPD1 TDBs were also tested for their ability to support killing of LYPD1-expressing OVCAR3.Luc target cells and the activation of the cytotoxic effect of T cells. *In vitro* cytotoxicity was monitored by flow cytometry. Target cells were labeled with CFSE according to manufacturer's protocol (Invitrogen, #C34554). The carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE)-labeled target cells and purified CD8+ T cells from human PBMC were mixed in a 3:1 ratio, with or without TDB for 48 hours. The cells were resuspended in equal volume of PBS + 2% FBS + 1 mM EDTA + propidium iodine (PI). Flow cytometry analysis was done on a FACSCalibur in automation format. The number of live target cells was counted by gating on CFSE+/PI negative cells. The percentage of cytotoxicity was calculated as follows: % cytotoxicity

(live target cell number w/o TDB – live target cell number w/TDB) / (live target cell number w/o TDB) x 100. As depicted in Figure 105, LYPD1 TDBs with UCHT1v9, 38E4v1, or SP34 for their anti-CD3 arm showed robust *in vitro* OVCAR3.Luc target cell killing compared to the LYPD1 TDB having 40G5 as its anti-CD3 arm.

When tested for T cell activation assays, Figure 106 shows that LYPD1 TDBs with 38E4v1, and, to a lesser extent, UCHT1v9 and SP34, for their anti-CD3 arm were capable of robustly inducing T cell activity *in vitro*, compared to the LYPD1 TDB having 40G5c as its anti-CD3 arm. In these assays, target cells and purified CD8+ T cells were mixed in the presence or absence of TDB and T cell activation was analyzed by flow cytometry. At the end of the incubation, cells were stained with CD8-FITC (BD Bioscience, 555634) CD69-PE (BD Bioscience, 555531) and CD107a-Alexa-Fluor647 (eBioscience, 51-1079). Alternatively, after surface stained with CD8-FITC and CD69-PE, cells were fixed and permeabilized with Cytofix/CytoPerm solution (BD Bioscience, 554722) and intracellular stained with anti-granzyme B-Alexa-Fluor647 (BD Bioscience, 560212). The T cell activation was evaluated by the percentage of CD8+CD69+ and CD8+CD25+ cells.

Other Embodiments

Although the foregoing invention has been described in some detail by way of illustration and example for purposes of clarity of understanding, the descriptions and examples should not be construed as limiting the scope of the invention. The disclosures of all patent and scientific literature cited herein are expressly incorporated in their entirety by reference

Señor
DIRECTOR DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
E. S. D.

REF: Expediente No. **NC2018/0009175**,

RESPUESTA A EXAMEN DE FONDO

JUAN PABLO CADENA SARMIENTO, portador de la tarjeta profesional No. 57.492 del C.S.J., obrando como apoderado de la sociedad solicitante me permito dar respuesta al Oficio No. 3746 relacionado con la patentabilidad de la presente invención y notificado el 31 de mayo de 2019.

- Presento un nuevo capitulo descriptivo en donde las modalidades han sido restringidas al anticuerpo de la invención. Para mayor claridad de su despacho, estamos adjuntando igualmente el pliego en inglés y en español con control de cambios en donde se pueden ver los cambios hechos al documento.

En vista de lo anteriormente expuesto, respetuosamente solicito el retiro de las objeciones de la presente solicitud y la concesión del privilegio solicitado, ya que en opinión del solicitante cumple con todos los requisitos establecidos en la Decisión 486.

Anexos

- Nuevo pliego reivindicatorio.

Atentamente,

JUAN PABLO CADENA SARMIENTO
T.P. No. 57.492 del C.S.J.
C.C. 80.410.337 de Usaquén
Calle 70 A No. 4 – 41

ANTICUERPOS ANTI-CD3 Y MÉTODOS DE USO

ÁREA DE LA INVENCIÓN

La presente invención se relaciona con los anticuerpos 3 (CD3) de los anti-cúmulos de diferenciación y los métodos para utilizarlos.

ANTECEDENTES

Los trastornos de proliferación celular, como el cáncer, se caracterizan por el crecimiento incontrolado de las subpoblaciones celulares. Son la causa principal de muerte en los países desarrollados y la segunda causa principal de muerte en los países en desarrollo, con más de 12 millones de nuevos casos de cáncer diagnosticados y con 7 millones de muertes por cáncer cada año. El Instituto Nacional del Cáncer estima que más de 500.000 estadounidenses morirán de cáncer en 2013, que representará casi una de cada cuatro muertes en el país. Debido a que la población de la tercera edad ha crecido, la incidencia de cáncer ha aumentado al mismo tiempo, pues la probabilidad de padecer de cáncer es más de dos veces superior luego de los setenta años. Por lo tanto, el cuidado del cáncer representa una carga social significativa y cada vez mayor.

Los enfoques de larga data para tratar el cáncer incluyen la quimioterapia, la radioterapia y la cirugía para extirpar los tumores sólidos. Recientemente, se han desarrollado inmunoterapias basadas en anticuerpos biespecíficos. Esos anticuerpos biespecíficos son capaces de unir simultáneamente los antígenos de la superficie celular con las células citotóxicas y las células cancerosas, con la intención de que la célula citotóxica unida destruya la célula cancerosa unida. Los anticuerpos biespecíficos existentes que se encuentran actualmente bajo ensayo clínico para el tratamiento contra el cáncer se ven limitados por sus vidas medias reducidas o su eficacia variable. Por lo tanto, existe una necesidad insatisfecha en el campo para el desarrollo de anticuerpos biespecíficos efectivos para utilizarlos en el tratamiento contra el cáncer.

RESUMEN

La presente invención se relaciona con los anticuerpos 3 (CD3) de los anti-cúmulos de diferenciación y los métodos para utilizarlos.

En un caso, la invención presenta un anticuerpo anti-CD3, donde el anticuerpo anti-CD3 comprende un dominio de unión que consta de las siguientes seis regiones hipervariables (RHV): (a) una RHV-H1 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 1; (b) una RHV-H2 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 2; (c) una RHV-H3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 3; (d) una RHV-L1 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 4; (e) una RHV-L2 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 5; y (f) una RHV-L3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 6. En algunas representaciones, el dominio de unión comprende (a) un dominio de cadena pesada

variable (VH) que consta de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una identidad de secuencia del 95% con la secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 184; (b) un dominio de cadena liviana variable (VL) que consta de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una identidad de secuencia del 95% con la secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 185; o (c) un dominio de VH como en (a) y un dominio de VL como en (b). En algunas representaciones, el dominio de VH comprende la secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 184. En algunas representaciones, el dominio de VL comprende la secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 185. En algunas representaciones, el dominio de unión comprende (a) un dominio de cadena pesada variable (VH) que consta de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una identidad de secuencia del 95% con la secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 186; (b) un dominio de cadena liviana variable (VL) que consta de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una identidad de secuencia del 95% con la secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 187; o (c) un dominio de VH como en (a) y un dominio de VL como en (b). En algunas representaciones, el dominio de VH comprende la secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 186. En algunas representaciones, el dominio de VL comprende la secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 187.

En otro caso, la invención presenta un anticuerpo anti-CD3, donde el anticuerpo anti-CD3 se une con un epítopo del CD3 que consta de residuos de aminoácidos Glu6 de CD3. En algunos casos, la invención presenta un anticuerpo anti-CD3, donde el epítopo además consta de uno o más residuos de aminoácidos seleccionados del grupo formado por Gln1, Asp2 y Met7 de CD3. En otro caso, la invención presenta un anticuerpo anti-CD3, donde el epítopo consta de residuos de aminoácidos Gln1, Asp2 y Glu6 de CD3. En algunos casos, la invención presenta un anticuerpo anti-CD3, donde el epítopo consta de residuos de aminoácidos Gln1, Asp2, Glu6 y Met7 de CD3. En otro caso, la invención presenta un anticuerpo anti-CD3, donde el epítopo no consta de residuos de aminoácidos Glu5 de CD3. En otro caso más, la invención presenta un anticuerpo anti-CD3, donde el epítopo no consta de residuos de aminoácidos Gly3 y Glu5 de CD3. En algunos casos, la invención presenta un anticuerpo anti-CD3, donde el epítopo consta de residuos de aminoácidos Gln1, Asp2, Glu6 y Met7 de CD3.

En casos relacionados, la invención presenta un anticuerpo anti-CD3 que une dicho epítopo y que es un anticuerpo multiespecífico. En algunas representaciones, el anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo biespecífico. En algunas representaciones, el anticuerpo biespecífico comprende un segundo dominio de unión que se une con una segunda biomolécula, donde la segunda biomolécula es un antígeno de la superficie celular. En algunas representaciones, el antígeno de la superficie celular es un antígeno tumoral. En algunas representaciones, el antígeno tumoral se selecciona de un grupo que consta de CD20; FcRH5 (5 similar al receptor de Fc); HER2; LYPD1; Ly6G6D (antígeno de linfocito 6 complejo, locus G61); Ly6-D, MEGT1); PMEL17 (homólogo de plata; SILV;

D12S53E; PMEL17; (SI); (SIL); ME20; gp100); Ly6E (antígeno de linfocito 6 complejo, locus E; Ly67, RIG-E, SCA-2, TSA-1); CD19; CD33; CD22 (isoforma CD22-B del receptor de la célula B isoform); CD79a (CD79A, CD79a, alfa asociada a la inmunoglobulina; BMPR1B (receptor de proteína morfogenética ósea de tipo IB); CD79b (CD79B, CD79β, 1 Gb (beta asociada a la inmunoglobulina), B29); EDAR (Receptor de la Ectodisplasina A); GFRA1 (GDNF-Ra1); MRP4 (Proteína 4 de Resistencia a Multidrogas); RET; STEAP1 (antígeno epitelial de seis dominios transmembrana de la próstata); TENB2 (proteoglicano transmembranal putativo); E16 (LAT1, SLC7A5); 0772P (CA125, MUC16); MPF (MPF, MSLN, SMR, factor potenciador de megacariocitos, mesotelina); Napi2b (NAPI-2B, NPTIIb, SLC34A2, transportador de soluto familia 34 (fosfato de sodio), miembro 2, transportador 3b de fosfato dependiente del sodio de tipo II); Sema 5b; PSCA hlg (2700050C12Rik, C530008O16Rik, RIKEN cDNA 2700050C12, gen RIKEN cDNA 2700050C12); ETBR (Receptor de la endotelina tipo B); MSG783 (RNF124, proteína hipotética FLJ20315); STEAP2; TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, receptor de potencial transitorio, subfamilia M, miembro 4); CRIPTO (CR, CR1, CRGF, CRIPTO, TDGF1, teratocarcinoma-derivado del factor de crecimiento); CD21 (CR2 (Receptor del complemento 2) o C3DR (C3d/Receptor del virus de Epstein-Barr) o Hs.73792); FcRH2 (IFGP4, IRTA4, SPAP1A (proteína 1a con anclaje de fosfatasa que contiene dominio SH2), SPAP1B, SPAP1C); NCA; MDP; IL20Rα; Brevican; EphB2R; ASLG659; PSCA; GEDA; BAFF-R (receptor del factor activador de la célula B, receptor BLyS 3, BR3); CXCR5 (Receptor 1 del linfoma de Burkitt; HLA-DOB (Subunidad Beta de molécula II de clase MHC); P2X5 (Receptor purinérgico P2X, canal iónico regulado por ligando 5; CD72 (Antígeno de diferenciación de célula B CD72, Lyb-2); LY64 (Antígeno de linfocito 64 (RP105), proteína de membrana de tipo 2 de la familia rica en leucina (LRR)); FcRH1 (Proteína 1 similar al receptor Fc); IRTA2 (Receptor de la superfamilia de inmunoglobulina, translocación asociada 2); TMEFF1; TMEM46 (compuesto homólogo de shisa 2 (Xenopus laevis); SHISA2); LGR5 (rica en leucina-receptor 5 acoplado a proteínas G; GPR49, GPR67); LY6K (antígeno de linfocito 6 complejo, locus K; LY6K; HSJ001348; FLJ35226); GPR19 (receptor acoplado a proteínas G 19; Mm 4787); GPR54 (receptor KISS1; KISS1R; GPR54; HOT7T175; AXOR12); ASPHD1 (dominio aspartato beta-hidroxilasa que contiene 1; LOC253982); Tirosinasa (TYR; OCAIA; OCA1A; tirosinasa; SHEP3); TMEM118 (proteína del dedo anular, transmembrana 2; RNFT2; FLJ14627); GPR172A (receptor acoplado a proteínas G 172A; GPCR41; FLJ11856; D15Ertd747e); GPC3 (Glipicano 3); CLL1 (molécula 1 tipo lectina de Tipo C); B7-H4 (B7x; B7S1); RNF43 (Proteína del dedo anular 43); CD70; CXORF61 (Cromosoma X con marco abierto de lectura 61); HAVCR1; Epirregulina; Amfirregulina; EGFR ; EGFR-L858R; EGFR-L861Q; EGFR-G719A; EGFR-G719S; EGFR-G719C; EGFR-T790M; EGFR-S768I; adipofilina; AIM-2; ALDH1A1; alfa-actinina-4; alfa-fetoproteína; ARTC1; B-RAF; BAGE-1; BCLX (L); proteína de fusión BCR-ABL (b3a2); 8; CD45; Cdc27; CDK4; CDKN2A; CEA; CLPP; COA-1; CPSF; Cw6; ciclina D1; Ciclina-A1; proteína de fusión dek-can; DKK1; DR1; DR13; EFTUD2; Factor de Elongación 2; ENAH (hMena); EpCAM; EphA3; proteína de fusión ETV6-AML1; EZH2; FLT3-ITD;

FN1; G250; MN; CAIX; GAGE-1;2;8; GAGE-3;4;5;6;7; glipicano-3; GnTVf; gp100 / Pmel17; GPNMB; HERV-K-MEL; hsp70-2; IDO1; IGF2B3; IL13Ralf2; Esterasa carboxilo intestinal; K-ras; Calicreína 4; KIF20A; KK-LC-1; KM-HN-1; LAGE-1; LDLR-fucosiltransferasa AS proteína de fusión; Lengsin; M-CSF; MAGE-A1; MAGE-A10; MAGE-A12; MAGE-A2; MAGE-A3; MAGE-A4; MAGE-A6; MAGE-A9; MAGE-C1; MAGE-C2; mamaglobina-A; MART2; MCSP; mdm-2; ME1; Melan-A / MART-1; Meloe; MMP-2; MMP-7; MUC1; MUC5AC; mucina; MUM-1f; MUM-2; MUM-3; Clase de miosina I; N-ras; NA88-A; neo-PAP; NFYC; NY-BR-1; NY-ESO-1/LAGE-2; OA1; OGT; OS-9; p53; PAP; PAX5; PBF; proteína de fusión pml-RARalfa; PRAME; PRDX5; PSMA; PTPRK; RAB38 / NY-MEL-1; RAGE-1; RBAF600; RGS5; RhoC; RNF43; RU2AS; SAGE; secernin 1; SIRT2; SNRPD1; SOX10; Sp17; SSX-2; SSX-4; STEAP1; survivina; proteína de fusión SYT-SSX1 o -SSX2; TAG-1; TAG-2; Telomerasa; TGF-betaRII; TRAG-3; Triosa fosfato isomerasa; TRP-1 / gp75; TRP-2; TRP2-INT2; tirosinasa; VEGF; WT1; XAGE-1b/GAGED2a; y SLC53SLC35D3. En algunas representaciones, el antígeno tumoral se selecciona de un grupo que consta de CD20, FcRH5, HER2, LYPD1, LY6G6D, PMEL17, LY6E, CD19, CD33, CD22, CD79A, CD79B, EDAR, GFRA1, MRP4, RET, Steap1, y TenB2. En las representaciones preferidas, el antígeno tumoral se selecciona de un grupo que consta de CD20, HER2, FcRH5 y LYPD1.

En algunas representaciones, el dominio de unión de cualquiera de los anticuerpos anti CD3 precedentes se une a un polipéptido CD3 humano o a un polipéptido CD3 de macaco cangrejero. En algunas representaciones, el polipéptido CD3 humano o el polipéptido CD3 de macaco cangrejero es un polipéptido CD3ε humano o polipéptido CD3ε de macaco cangrejero, respectivamente. En algunas representaciones, el polipéptido CD3 humano o el polipéptido CD3 de macaco cangrejero es un polipéptido CD3γ humano o polipéptido CD3γ de macaco cangrejero, respectivamente.

En algunas representaciones, cualquiera de los anticuerpos anti CD3 precedentes une el polipéptido CD3ε humano con un Kd de 250 nM o menos. En algunas representaciones, el anticuerpo anti CD3 une el polipéptido CD3ε humano con un Kd de 100 nM o menos. En algunas representaciones, el anticuerpo anti CD3 une el polipéptido CD3ε humano con un Kd de 15 nM o menos. En algunas representaciones, el anticuerpo anti CD3 une el polipéptido CD3ε humano con un Kd de 10 nM o menos. En algunas representaciones, el anticuerpo anti CD3 une el polipéptido CD3ε humano con un Kd de 5 nM o menos.

En algunas presentaciones, cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 anteriores puede comprender una mutación en el lugar de la glicosilación. En algunas representaciones, la mutación en el lugar de la glicosilación es una mutación de sustitución. En algunas representaciones, la mutación de sustitución se produce en el residuo de los aminoácidos N297, L234, L235, y/o D265 (numeración UE). En algunas representaciones, la mutación de sustitución se selecciona del grupo que consta de N297G, N297A, L234A, L235A y D265A. En algunas representaciones, la mutación de sustitución es una mutación de N297G. En algunas representaciones, la mutación en el lugar de la glicosilación reduce la función efectora del anticuerpo anti-CD3. En algunas representaciones, la mutación en el lugar de la glicosilación reduce la función efectora

del anticuerpo anti-CD3. En algunas representaciones, un anticuerpo anti-CD3 consta de una mutación de sustitución en la región Fc que reduce la función efectora.

En algunas representaciones, cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 precedentes pueden ser monoclonales, humanos, humanizados o quiméricos. En algunas representaciones, cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 precedentes puede ser un fragmento de anticuerpos que une el CD3. En algunas representaciones, el fragmento de anticuerpos se selecciona del grupo que consta de los fragmentos Fab, Fab'-SH, Fv, scFv, y $(Fab')_2$. En otras representaciones, el anticuerpo anti-CD3 es un anticuerpo de cuerpo entero. En algunas representaciones, el anticuerpo anti-CD3 es un anticuerpo IgG (por ej., un anticuerpo IgG1, IgG2 o IgG3). En algunas representaciones, el anticuerpo anti-CD3 es un anticuerpo monoespecífico. En algunas representaciones, el anticuerpo anti-CD3 es un anticuerpo captador biespecífico de células T (BITE®).

En algunas representaciones, el anticuerpo anti-CD3 es un anticuerpo multiespecífico. En algunas representaciones, el anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo biespecífico. En algunas representaciones, el anticuerpo biespecífico comprende un segundo dominio de unión que se une con una segunda biomolécula, donde la segunda biomolécula es un antígeno de la superficie celular. En algunas representaciones, el antígeno de la superficie celular es un antígeno tumoral. En algunas representaciones, el antígeno tumoral se selecciona de un grupo que consta de CD20; FcRH5 (5 similar al receptor de Fc); HER2; LYPD1; Ly6G6D (antígeno de linfocito 6 complejo, locus G61); Ly6-D, MEGT1); PMEL17 (homólogo de plata; SILV; D12S53E; PMEL17; (SI); (SIL); ME20; gp100); Ly6E (antígeno de linfocito 6 complejo, locus E; Ly67, RIG-E, SCA-2, TSA-1); CD19; CD33; CD22 (isoforma CD22-B del receptor de la célula B isoform); CD79a (CD79A, CD79a, alfa asociada a la inmunoglobulina; BMPR1B (receptor de proteína morfogenética ósea de tipo IB); CD79b (CD79B, CD79β, 1 Gb (beta asociada a la inmunoglobulina), B29); EDAR (Receptor de la Ectodisplasina A); GFRA1 (GDNF-Ra1); MRP4 (Proteína 4 de Resistencia a Multidrogas); RET; STEAP1 (antígeno epitelial de seis dominios transmembrana de la próstata); TENB2 (proteoglicano transmembranal putativo); E16 (LAT1, SLC7A5); 0772P (CA125, MUC16); MPF (MPF, MSLN, SMR, factor potenciador de megacariocitos, mesotelina); Napi2b (NAPI-2B, NPTIIb, SLC34A2, transportador de soluto familia 34 (fosfato de sodio), miembro 2, transportador 3b de fosfato dependiente del sodio de tipo II); Sema 5b; PSCA hlg (2700050C12Rik, C530008O16Rik, RIKEN cDNA 2700050C12, gen RIKEN cDNA 2700050C12); ETBR (Receptor de la endotelina tipo B); MSG783 (RNF124, proteína hipotética FLJ20315); STEAP2; TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, receptor de potencial transitorio, subfamilia M, miembro 4); CRIPTO (CR, CR1, CRGF, CRIPTO, TDGF1, teratocarcinoma-derivado del factor de crecimiento); CD21 (CR2 (Receptor del complemento 2) o C3DR (C3d/Receptor del virus de Epstein-Barr) o Hs.73792); FcRH2 (IFGP4, IRTA4, SPAP1A (proteína 1a con anclaje de fosfatasa que contiene dominio SH2), SPAP1B, SPAP1C); NCA; MDP; IL20Rα; Brevican; EphB2R; ASLG659; PSCA; GEDA; BAFF-R (receptor del factor activador de la célula B, receptor BLyS 3, BR3); CXCR5 (Receptor 1

del linfoma de Burkitt; HLA-DOB (Subunidad Beta de molécula II de clase MHC); P2X5 (Receptor purinérgico P2X, canal iónico regulado por ligando 5; CD72 (Antígeno de diferenciación de célula B CD72, Lyb-2); LY64 (Antígeno de linfocito 64 (RP105), proteína de membrana de tipo 2 de la familia rica en leucina (LRR)); FcRH1 (Proteína 1 similar al receptor Fc); IRTA2 (Receptor de la superfamilia de inmunoglobulina, translocación asociada 2); TMEFF1; TMEM46 (compuesto homólogo de shisa 2 (Xenopus laevis); SHISA2); LGR5 (rica en leucina-receptor 5 acoplado a proteínas G; GPR49, GPR67); LY6K (antígeno de linfocito 6 complejo, locus K; LY6K; HSJ001348; FLJ35226); GPR19 (receptor acoplado a proteínas G 19; Mm 4787); GPR54 (receptor KISS1; KISS1R; GPR54; HOT7T175; AXOR12); ASPHD1 (dominio aspartato beta-hidroxilasa que contiene 1; LOC253982); Tirosinasa (TYR; OCAIA; OCA1A; tirosinasa; SHEP3); TMEM118 (proteína del dedo anular, transmembrana 2; RNFT2; FLJ14627); GPR172A (receptor acoplado a proteínas G 172A; GPCR41; FLJ11856; D15Ertd747e); GPC3 (Glipicano 3); CLL1 (molécula 1 tipo lectina de Tipo C); B7-H4 (B7x; B7S1); RNF43 (Proteína del dedo anular 43); CD70; CXORF61 (Cromosoma X con marco abierto de lectura 61); HAVCR1; Epirregulina; Amfirregulina; EGFR ; EGFR-L858R; EGFR-L861Q; EGFR-G719A; EGFR-G719S; EGFR-G719C; EGFR-T790M; EGFR-S768I; adipofilina; AIM-2; ALDH1A1; alfa-actinina-4; alfa-fetoproteína; ARTC1; B-RAF; BAGE-1; BCLX (L); proteína de fusión BCR-ABL (b3a2); 8; CD45; Cdc27; CDK4; CDKN2A; CEA; CLPP; COA-1; CPSF; Cw6; ciclina D1; Ciclina-A1; proteína de fusión dek-can; DKK1; DR1; DR13; EFTUD2; Factor de Elongación 2; ENAH (hMena); EpCAM; EphA3; proteína de fusión ETV6-AML1; EZH2; FLT3-ITD; FN1; G250; MN; CAIX; GAGE-1;2;8; GAGE-3;4;5;6;7; glipicano-3; GnTVf; gp100 / Pmel17; GPNMB; HERV-K-MEL; hsp70-2; IDO1; IGF2B3; IL13Ralf2; Esterasa carboxilo intestinal; K-ras; Calicreína 4; KIF20A; KK-LC-1; KM-HN-1; LAGE-1; LDLR-fucosiltransferasa AS proteína de fusión; Lengsin; M-CSF; MAGE-A1; MAGE-A10; MAGE-A12; MAGE-A2; MAGE-A3; MAGE-A4; MAGE-A6; MAGE-A9; MAGE-C1; MAGE-C2; mamaglobina-A; MART2; MCSP; mdm-2; ME1; Melan-A / MART-1; Meloe; MMP-2; MMP-7; MUC1; MUC5AC; mucina; MUM-1f; MUM-2; MUM-3; Clase de miosina I; N-ras; NA88-A; neo-PAP; NFYC; NY-BR-1; NY-ESO-1/LAGE-2; OA1; OGT; OS-9; p53; PAP; PAX5; PBF; proteína de fusión pml-RARalfa; PRAME; PRDX5; PSMA; PTPRK; RAB38 / NY-MEL-1; RAGE-1; RBAF600; RGS5; RhoC; RNF43; RU2AS; SAGE; secernin 1; SIRT2; SNRPD1; SOX10; Sp17; SSX-2; SSX-4; STEAP1; survivina; proteína de fusión SYT-SSX1 o -SSX2; TAG-1; TAG-2; Telomerasa; TGF-betaRII; TRAG-3; Triosa fosfato isomerasa; TRP-1 / gp75; TRP-2; TRP2-INT2; tirosinasa; VEGF; WT1; XAGE-1b/GAGED2a; y SLC35D3. En algunas representaciones, el antígeno tumoral se selecciona de un grupo que consta de CD20, FcRH5, HER2, LYPD1, LY6G6D, PMEL17, LY6E, CD19, CD33, CD22, CD79A, CD79B, EDAR, GFRA1, MRP4, RET, Steap1, y TenB2.

En algunas representaciones, el antígeno tumoral es HER2 y el segundo dominio de unión comprende las siguientes seis RHV: (a) una RHV-H1 que consiste en la secuencia de aminoácidos con N.° de ID de SEC: 169; (b) una RHV-H2 que consiste en una secuencia

de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 170; (c) una RHV-H3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 171; (d) una RHV-L1 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 172; (e) una RHV-L2 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 173; y (f) una RHV-L3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.° de ID de SEC.: 174. En algunas representaciones, el segundo dominio de unión comprende (a) un dominio de VH que consta de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una identidad de secuencia del 95% con la secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 270; (b) un dominio de VL que consta de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una identidad de secuencia del 95% con la secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 271; o (c) un dominio de VH como en (a) y un dominio de VL como en (b). En algunas representaciones, el dominio de VH comprende la secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 270. En algunas representaciones, el dominio de VL comprende la secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 271.

En algunos casos, la invención presenta un anticuerpo anti-CD3, donde el anticuerpo anti-CD3 comprende un segundo dominio de unión que consta de: (a) un dominio de VH que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 270 y (b) un dominio de VL que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 271.

En otro caso, la invención presenta un anticuerpo anti-CD3, donde el anticuerpo anti-CD3 comprende un brazo anti-CD3 que contiene un primer dominio de unión, el cual consta de: (a) un dominio de VH que consiste de una secuencia de aminoácidos con N.° de ID de SEC.: 184 y (b) un dominio de VL que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 185, y un brazo anti-CD20 que comprende un segundo dominio de unión, el cual consta de: (a) un dominio de VH que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 266 y (b) un dominio de VL que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 267.

En otro caso, la invención presenta un anticuerpo anti-CD3, donde el anticuerpo anti-CD3 comprende un brazo anti-CD3 que contiene un primer dominio de unión, el cual consta de: (a) un dominio de VH que consiste de una secuencia de aminoácidos con N.° de ID de SEC.: 184 y (b) un dominio de VL que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 185, y un brazo anti-CD20 que comprende un segundo dominio de unión, el cual consta de: (a) un dominio de VH que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 266 y (b) un dominio de VL que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 267, en el cual el anticuerpo anti-CD3 contiene una mutación por sustitución de N297G.

En otro caso, la invención presenta un anticuerpo anti-CD3, donde el anticuerpo anti-CD3 comprende un brazo anti-CD3 que contiene un primer dominio de unión, el cual consta de: (a) un dominio de VH que consiste de una secuencia de aminoácidos con N.° de ID de SEC.: 184 y (b) un dominio de VL que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 185, y un brazo anti-CD20 que comprende un segundo dominio de unión,

el cual consta de: (a) un dominio de VH que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 266 y (b) un dominio de VL que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 267, donde (a) el brazo anti-CD3 comprende mutaciones por sustitución de T366S, L368A, Y407V y N297G y (b) el brazo anti-CD20 comprende mutaciones por sustitución de T366W y N297G.

En algunas versiones, cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 antes mencionados puede comprender uno o más dominios constantes de cadenas pesadas, donde el o los dominios constantes de cadenas pesadas son seleccionados de un primer dominio CH1 ($CH1_1$), un primer dominio CH2 ($CH2_1$), un primer dominio CH3 ($CH3_1$), un segundo dominio CH1 ($CH1_2$), un segundo dominio CH2 ($_2$) y un segundo dominio CH3 ($CH3_2$). En algunas versiones, al menos uno de los dominios constantes de cadenas pesadas está emparejado con otro dominio constante de cadenas pesadas. En algunas versiones, los dominios $CH3_1$ y $CH3_2$ comprenden una protuberancia o una cavidad, donde la protuberancia o cavidad en el dominio $CH3_1$ puede posicionarse en la cavidad o la protuberancia respectiva del dominio $CH3_2$. En algunas versiones, los dominios $CH3_1$ y $CH3_2$ se encuentran en una interfaz entre las mencionadas protuberancia y cavidad. En algunas versiones, los dominios $CH2_1$ y $CH2_2$ comprenden una protuberancia o una cavidad, donde la protuberancia o cavidad en el dominio $CH2_1$ puede posicionarse en la cavidad o la protuberancia respectiva del dominio $CH2_2$. En algunas versiones, los dominios $CH2_1$ y $CH2_2$ se encuentran en una interfaz entre las mencionadas protuberancia y cavidad.

En algunas versiones, la vida media de cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 antes mencionados puede ser de aproximadamente 7 días.

En algunas versiones, la invención presenta un inmunoconjugado que comprende cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 antes mencionados conjugado a un agente citotóxico. También se proporciona una composición que comprende cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 antes mencionados. En algunas versiones, la composición también comprende un portador, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptado. En algunas versiones, la composición es de carácter farmacéutico. En algunas versiones, la composición también comprende un antagonista de unión al eje PD-1 o un agente clínico adicional. En otro caso, la invención presenta un ácido nucleico aislado que codifica cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 que se revelan en el presente, y que comprende un vector (p. ej. un vector de expresión) para expresar el anticuerpo.

En otro caso, la invención presenta células anfitrionas que comprenden los ácidos nucleicos o vectores antes mencionados. En algunas versiones, la célula anfitriona es una célula mamífera (p. ej. una célula (CHO) del ovario de un hámster chino). En otras versiones, la célula anfitriona es una célula procariota (p. ej. una célula de *E. coli*). También se proporciona un método para producir cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 antes mencionados, cual método implica cultivar las células anfitrionas que producen el anticuerpo anti-CD3 y recuperar el anticuerpo anti-CD3 de la célula anfitriona o el medio de cultivo.

En algunos casos, cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 antes mencionados puede

utilizarse como medicamento. En algunas versiones, cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 puede utilizarse para tratar o dilatar la progresión de un trastorno proliferativo de células o de un trastorno autoinmunológico en un sujeto que requiera tal tratamiento. En algunas versiones, cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 puede utilizarse para mejorar la función inmunitaria de un sujeto que padezca un trastorno proliferativo de células o un trastorno autoinmunológico.

En algunos casos, la invención presenta el uso de cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 antes mencionados para fabricar un medicamento para tratar o dilatar la progresión de un trastorno proliferativo de células o un trastorno autoinmunológico. En algunos casos, la invención presenta el uso de cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 antes mencionados para fabricar un medicamento para mejorar la función inmunitaria de un sujeto que padece un trastorno proliferativo de células o un trastorno autoinmunológico.

Otro aspecto de la invención es un método para tratar o dilatar la progresión de un trastorno proliferativo de células o de un trastorno autoinmunológico en un paciente que requiera tal tratamiento. El método consiste en administrar al sujeto una cantidad efectiva de cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 antes mencionados. En otro caso, la invención presenta un método para mejorar la función inmunológica de un sujeto que padece un trastorno proliferativo de células o un trastorno autoinmunológico. El método consiste en administrar al sujeto cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 antes mencionados. En algunas versiones, el anticuerpo anti-CD3 se une a (a) una molécula CD3 ubicada en una célula efectora inmune Y (b) una segunda molécula biológica ubicada en una célula diana distinta de la célula efectora inmune. En algunas versiones, el anticuerpo anti-CD3 activa la célula efectora inmune luego de unirse a (a) y (b). En algunas versiones, la célula efectora inmune activada puede provocar un efecto citotóxico o un efecto apoptótico en la célula diana. En algunas versiones, el anticuerpo anti-CD3 se administra al sujeto en una dosis de entre 0,01 MG/KG y 10 mg/kg, aproximadamente. En algunas versiones, el anticuerpo anti-CD3 se administra al sujeto en una dosis de entre 0,1 mg/kg y 10 mg/kg, aproximadamente. En algunas versiones, el anticuerpo anti-CD3 se administra al sujeto en una dosis de alrededor de 1 mg/kg. En algunas versiones, el anticuerpo anti-CD3 es administrado por vía subcutánea, intravenosa, intramuscular, tópica, oral, transdérmica o intraperitoneal; por órbita, por implantación, por inhalación o por vía intratecal, intraventricular o intranasal. En algunas versiones, el anticuerpo anti-CD3 se administra por vía subcutánea. En algunas versiones, el anticuerpo anti-CD3 se administra por vía intravenosa.

En algunas versiones, el anticuerpo anti-CD3 comprende un brazo anti-HER2 que contiene una mutación por sustitución de N297G. En algunas versiones, el anticuerpo anti-CD3 comprende un brazo anti-CD3 que contiene una o varias mutaciones por sustitución de T366S, L368A, Y407V o N297G y un brazo anti-HER2 que contiene una o varias mutaciones por sustitución de N297G, N297A, L234A, L235A o D265A. En algunas representaciones, el anticuerpo comprende un brazo anti-CD3 que contiene una

mutación por sustitución de N297G. En algunas representaciones, el anticuerpo anti-CD3 comprende un brazo anti-HER2 que contiene mutacion(es) por sustitución de T366S, L368A, Y407V y/o N297G y un brazo anti-CD3 que contiene mutacion(es) por sustitución de N297G, N297A, L234A, L235A y/o D265A.

En algunas versiones, el método también implica administrar al paciente un glucocorticoide. En algunas versiones, el glucocorticoide es seleccionado de un grupo compuesto por dexametasona, hidrocortisona, cortisona, prednisolona, prednisona, metilprednisolona, triamcinolona, parametasona, betametasona, fludrocortisona y ésteres, sales y complejos de esos compuestos. En algunas versiones, el glucocorticoide es dexametasona. En algunas versiones, el glucocorticoide es un éster, una sal o un complejo de dexametasona farmacéuticamente aceptado.

En algunas versiones, el método también implica administrar rituximab al paciente.

En algunas versiones, el método también implica administrar obinutuzumab al paciente.

En algunas versiones, el método también implica administrar al paciente un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC por sus siglas en inglés).

En cualquiera de los usos o métodos mencionados anteriormente, el trastorno proliferativo de células puede ser cáncer. En algunas versiones, el cáncer es seleccionado del grupo que comprende cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón no microcítico, linfoma no Hodgkin (NHL por sus siglas en inglés), linfoma de células B, leucemia de células B, mieloma múltiple, cáncer renal, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer de cabeza y cuello, melanoma, cáncer de ovario, mesotelioma, gliobastoma, linfoma difuso de células B grandes, linfoma de células semejantes a la célula B activada, linfoma folicular, linfoma de células de manto, leucemia mieloide aguda, leucemia linfoide crónica, linfoma de zona marginal, leucemia linfocítica de célula pequeña, linfoma linfoplasmacítico, macroglobulinemia de Waldenstrom, linfoma del sistema nervioso central, linfoma de Burkitt, linfoma prolinfocítico de células B, linfoma esplénico de zona marginal, leucemia de células vellosas, linfoma o leucemia esplénico, linfoma esplénico difuso de linfocitos pequeños de pulpa roja, variante de leucemia de células vellosas, macroglobulinemia de waldenstrom, enfermedades de cadenas pesadas, enfermedad de cadenas alfa, enfermedad de cadenas gamma, enfermedad de cadenas mu, mieloma de células plasmáticas, plasmocitoma óseo solitario, plasmocitoma extraóseo, linfoma de tejido linfoide asociado a mucosa, linfoma de zona marginal nodal, linfoma de zona marginal nodal pediátrico, linfoma folicular pediátrico, linfoma primario cutáneo de células del centro folicular, linfoma de células grandes B rico en células T/ histiocitos, linfoma primario del sistema nervioso central, linfoma cutáneo primario, linfoma difuso de células B grandes positivo al virus de Epstein-Barr del anciano, linfoma difuso de células grandes asociado con inflamación crónica, granulomatosis linfomatoide, linfoma primario mediastinal de células B grandes, linfoma intravascular de células B grandes, linfoma anaplásico ALK positivo, linfoma plasmablástico, linfoma de células grandes B originado en enfermedad de Castleman asociado a HHV-8, linfoma de efusion primaria: linfoma de células B, inclasificable, con características intermedias entre

linfoma difuso de células B grandes y linfoma de Burkitt, y linfoma de células B, inclasificable, con características intermedias entre linfoma difuso de células B grandes y linfoma clásico de Hodgkin. En algunas versiones, el cáncer preferente es el linfoma de células B semejantes a las del centro germinal (GCB), linfoma de células semejantes a la célula B activada (ABC), linfoma folicular (FL), linfoma de células de manto (MCL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfoide crónica (CLL), linfoma de zona marginal (MZL), leucemia linfocítica de célula pequeña (SLL), linfoma linfoplasmacítico (LL), macroglobulinemia de Waldenstrom (WM), linfoma del sistema nervioso central (CNSL) o linfoma de Burkitt (BL).

En cualquiera de los usos o métodos mencionados anteriormente, el trastorno autoinmunológico puede ser seleccionado de un grupo compuesto por artritis reumatoide, artritis juvenil reumatoide, lupus sistémico eritomatoso (SLE), granulomatosis de Wegener, enfermedad inflamatoria intestinal, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), púrpura trombocitopénica trombótica (TTP), trombocitopenia autoinmune, esclerosis múltiple, psoriasis, nefropatía por IgA, polineuropatía asociada a IgM, miastenia gravis, vasculitis, diabetes mellitus, síndrome de Raynaud, síndrome de Sjögren, glomerulonefritis, neuromielitis óptica (NMO) y neuropatía igG.

En otro caso, la invención presenta un kit que contiene: (a) una composición que consta de cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 antes mencionados y (b) un paquete inserto que contiene instrucciones para administrar la composición a un paciente para tratar o dilatar la progresión de un trastorno proliferativo de células.

En cualquiera de los usos o métodos antes mencionados, el paciente puede ser un humano.

Descripción breve de los dibujos

La FIGURA 1 muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena simple de CD3EG humano con una secuencia enlace 26mero utilizado en experimentos de mapeo de epítopos de CD3 (N.° de ID de Sec.: 282).

La FIGURA 2A es una tabla que resume la caracterización de clones hibridoma selectos. La tabla resume los resultados del método ELISA de unión CD3 utilizando CD3ε^{1-27}-Fc de humano y de macaco; ensayos de unión de FACS utilizando células T jurkat humanas, PBMCs humanas y de macacos; experimentos de activación de células T utilizando análisis FACS, y experimentos de determinación de isotipos.

La FIGURA 2B es una tabla que resume las afinidades de unión (valores Kd) de clones hibridoma seleccionados para antígenos humanos CD3εγ comerciales.

La FIGURA 3A es una tabla que resume la caracterización de hibridomas selectos. La tabla resume los resultados del método ELISA de unión CD3 utilizando CD3ε^{1-27}-Fc de humano y de macaco; ensayos de unión de FACS utilizando células T jurkat humanas, PBMCs humanas y de macacos; experimentos de activación de células T utilizando

análisis FACS, y experimentos de determinación de isoptipos.

Las FIGURAS 3B y 3C son tablas que reducen las afinidades de unión (valores Kd) de clones hibridoma seleccionados.

La FIGURA 4A muestra las secuencias de aminoácidos de dominios variables de cadena ligera de los anticuerpos anti-CD3. Las secuencias HVR están delimitadas para las casillas designadas para cada anticuerpo.

La FIGURA 4B muestra las secuencias de aminoácidos de dominios variables de cadena ligera de los anticuerpos anti-CD3.

La FIGURA 4C muestra las secuencias de aminoácidos de dominios variables de cadena pesada de los anticuerpos anti-CD3.

La FIGURA 5A muestra las secuencias de aminoácidos de dominios variables de cadena ligera de los anticuerpos anti-CD3.

La FIGURA 5B muestra las secuencias de aminoácidos de dominios variables de cadena pesada de los anticuerpos anti-CD3.

La FIGURA 6A muestra las secuencias de aminoácidos de dominios variables de cadena ligera de los anticuerpos anti-CD3 21A9 y Rab17.

La FIGURA 6B muestra las secuencias de aminoácidos de dominios variables de cadena pesada de los anticuerpos anti-CD3 21A9 y Rab17.

La FIGURA 7 es una alineación de secuencias de dominios variables de cadena ligera (parte superior) y dominios variables de cadena pesada (parte inferior) de secuencias de aminoácidos de anticuerpos anti-CD3 que muestran la secuencia de consenso, 40G5c, derivada de los anticuerpos clónicos relacionados.

La FIGURA 8A es una alineación de secuencias de dominios variables de cadena ligera (parte superior) y dominios variables de cadena pesada (parte inferior) de secuencias de aminoácidos de anticuerpos anti-CD3 13A3 y una variante humanizada (hu13A3).

La FIGURA 8B es una alineación de secuencias de dominios variables de cadena ligera (parte superior) y dominios variables de cadena pesada (parte inferior) de secuencias de aminoácidos de anticuerpos anti-CD3 30A1 y una variante humanizada (hu30A1).

La FIGURA 8C es una alineación de secuencias de dominios variables de cadena ligera (parte superior) y dominios variables de cadena pesada (parte inferior) de secuencias de aminoácidos de anticuerpos anti-CD3 41D9a y una variante humanizada (hu41D9a).

La FIGURA 8D es una alineación de secuencias de dominios variables de cadena ligera (parte superior) y dominios variables de cadena pesada (parte inferior) de secuencias de aminoácidos de anticuerpos anti-CD3 SP34 y una variante humanizada (huSP34).

La FIGURA 8E es una alineación de secuencias de dominios variables de cadena ligera (parte superior) y dominios variables de cadena pesada (parte inferior) de secuencias de aminoácidos de anticuerpos anti-CD3 38E4 y una variante humanizada (hu38E4).

La FIGURA 8F es una alineación de secuencias de dominios variables de cadena ligera (parte superior) y dominios variables de cadena pesada (parte inferior) de secuencias de aminoácidos de anticuerpos anti-CD3 40G5 y una variante humanizada (hu40G5).

La FIGURA 9A es una tabla que resume las variantes humanizadas seleccionadas del

anticuerpo anti-CD3 13A3 y sus afinidades de unión, determinadas mediante el uso de CD3ε comercial (Creative Biomart, Shirley, NY; N.° de catálogo CD3E-2194H).

La FIGURA 9B es una tabla que resume las variantes humanizadas seleccionadas del anticuerpo anti-CD3 30A1 y sus afinidades de unión, determinadas mediante el uso de CD3ε comercial (Creative Biomart, Shirley, NY; N.° de catálogo CD3E-2194H).

La FIGURA 9C es una tabla que resume las variantes humanizadas seleccionadas del anticuerpo anti-CD3 41D9a y sus afinidades de unión, determinadas mediante el uso de CD3ε comercial (Creative Biomart, Shirley, NY; N.° de catálogo CD3E-2194H).

La FIGURA 9D es una tabla que resume las variantes humanizadas del anticuerpo anti-CD3 SP34 y sus afinidades de unión, determinadas mediante el uso de CD3ε comercial (Creative Biomart, Shirley, NY; N.° de catálogo CD3E-2194H).

La FIGURA 9E es una tabla que resume las variantes humanizadas seleccionadas del anticuerpo anti-CD3 38E4 y sus afinidades de unión, determinadas mediante el uso de CD3ε comercial (Creative Biomart, Shirley, NY; N.° de catálogo CD3E-2194H).

La FIGURA 9F es una tabla que resume las variantes humanizadas seleccionadas del anticuerpo anti-CD3 40G5c y sus afinidades de unión, determinadas mediante el uso de CD3ε comercial (Creative Biomart, Shirley, NY; N.° de catálogo CD3E-2194H).

La FIGURA 10 es una tabla que resume la afinidad de unión de los anticuerpos anti-CD3 humanizados para varios antígenos CD3ε.

La FIGURA 11 es una tabla que resume la afinidad de los anticuerpos anti-CD3 humanizados 38E4v1 a 38E4v9 y 40G5C, según mediciones Biacore con CD3εγ humano en chip y anticuerpos anti-CD3 en flujo continuo.

La FIGURA 12A es una tabla que resume las afinidades de unión relativas para mutaciones de alanina, serina, treonina o glutamato de los anticuerpos anti-CD3 38E4v1humanizados con una sola mutación en HVR-L3 o en HV3-H3, en comparación con 38E4v1 utilizando análisis kinético Biacore de siglo único o el convencional de ciclo múltiple.

La FIGURA 12B muestra las secuencias de aminoácidos HVR-L3 (parte superior) y HVR-H3 (parte inferior) del anticuerpo anti-CD3 humanizado 38E4v1.

La FIGURA 13A consiste en una serie de gráficos que muestran la unión relativa del anticuerpo anti-CD3 señalado con las variantes de alanina de $CD3\varepsilon^{1-27}$-Fc.

La FIGURA 13B es un gráfico que muestra la fracción relativa de mutantes fagémidos por barrido de alanina unidos a anticuerpos anti-CD3 38E4.v1, 40G5c y SP34.v52, en comparación con la unión de fago CD3εγ de tipo salvaje.

La FIGURA 13C consiste en una serie de gráficos que muestran la relativa afinidad de los anticuerpos anti-CD3 38E4.v1, 40G5c y SP34.v52 con mutantes fagémidos por barrido de alanina CD3εγ seleccionados como función de la concentración de fago.

La FIGURA 13D consiste en una serie de tablas que muestran las afinidades de unión relativas de los anticuerpos anti-CD3 SP34.v52 y 38E4v1 con mutantes CD3εγ por barrido de alanina, según las mediciones Biacore. NB = Unión no detectable.

La FIGURA 14A muestra la secuencia del polipéptido CD3ε 16mero utilizado en pruebas

de cocristalización con 38E4.v1 Fab.

Las FIGURAS 14B A 14F consisten en una serie de representaciones de la estructura cristalina que muestran diferentes panoramas respecto del complejo péptido hu38E4.v1 Fab/CD3ε.

La FIGURA 14G es una alineación de secuencias de dominios variables de cadena ligera (parte superior) y dominios variables de cadena pesada (parte inferior) de secuencias de aminoácidos de anticuerpos anti-CD3 hu40G5c y hu38E4.v1, con residuos de cada anticuerpo que son importantes para unir CD3 (residuos de contacto) en la alineación. Dichos residuos se encuentran dentro de 5 Å del péptido CD3, conforme se determinó por medio de análisis cristalográficos. Δ denota posiciones de vernier (como referencia consultar, p. ej. Foote and Winter. *JMB.* 224: 487, 1992); * denota intracciones FW-HVR (como referencia consultar, p. ej., Padlan et al. *Mol. Immunol*. 31: 169, 1994); * denota intracciones VH-VL (como referencia consultar, p. ej., Padlan et al. *Mol. Immunol*. 31: 169, 1994).

La FIGURA 14H es una representación de la estructura de cristal del polipéptido CD3ε unido por hu38E4.v1 Fab. Todos los residuos de contacto antígenos se muestran en amarillo. Todos los residuos de contacto son iguales entre hu38E4.v1 y hu40G5, excepto que G96 (marcado en naranja) es S96 en hu40G5.

Las FIGURAS 14I y 14J son representaciones de diagramas de Richardson de la estructura de cristal de hu38E4.v1 Fab y SP34v52 Fab, respectivamente, en la misma orientación, superpuestas con la región VL con un RMS = 2,24.

La FIGURA 14K es un modelo de relleno que representa el hu38E4.v1 Fab complejado con el péptido CD3ε N-terminal unido en la grieta entre las cadenas pesadas (cian) y ligeras (violeta).

La FIGURA 14L es un modelo de relleno que representa el SP34v52 con el péptido CD3ε N-terminal, superpuesto en la misma orientación que en el complejo CD3ε/hu38E4.v1 Fab descripto en la Figura 14K. Los residuos R50 Y R52 (en naranja) de HVR-H2 de SP34v52 Fab son importantes para la unión de CD3. Los choques claros del péptido CD3 con SP34v52 Fab se indican mediante flechas.

La FIGURA 14M es una representación de la estructura de cristal de hu38E4.v1 complejado con el péptido N-terminal de CD3εγ e ilustra las principales interacciones intermoleculares que intervienen en el primer residuo piroglutamina y el sexto residuo (E6) en CD3εγ. Las potenciales uniones de hidrógeno se muestran como líneas discontinuas.

La FIGURA 14N es un modelo de relleno que representa el hu38E4.v1 Fab complejado con el péptido CD3εγ N-terminal unido en la grieta entre las cadenas pesadas (cian) y ligeras (violeta). El quinto residuo (E5), como se ilustra, apunta al lado contrario del sitio interactivo que contiene el secto residuo (E6) del complejo péptido CD3εγ N-terminal y Fab.

La FIGURA 15 describe una generalización esquemática de la formación del anticuerpo TDB. El TDB particular que se describe se muestra como un TDB en toda su extensión en

formato botón en ojal, que puede tener una mutación por glicosilación si es producido por una célula eucariota (p. ej. una célula CHO). En un formato alternativo, es posible que el botón esté presente en el brazo anti-CD3, y es posible que el ojal esté presente en el brazo del antígeno anti-tumoral. También es posible que este formato posea una mutación por glicosilación, si se produjera por una célula eucariota (p. ej. una célula CHO).

La FIGURA 16 consta de gráficos que muestran los resultados FACS de ensayos de unión *in vitro* de distintos TDBs CD3/CD20 con diferentes combinaciones de brazos anti-CD3 de series UCHT1 y brazos anti-CD20 de series 2H7. A la izquierda, unión de línea celular Bjab (unión CD20). A la derecha, unión con células Jurkat (unión CD3).

La FIGURA 17 consta de un conjunto de tablas que resumen las afinidades de unión monovalentes (parte superior) y bivalentes como valores Kd para varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones brazos anti-CD3 de series UCHT1 y brazos anti-CD20 de series 2H7.

La FIGURA 18 consta de un gráfico que muestra los resultados de los ensayos de FACS de unión de células Jurkat *in vitro* (unión CD3) de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16.

La FIGURA 19 consta de un gráfico que muestra los resultados de los ensayos de FACS de unión de células Jurkat *in vitro* (unión CD3) de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16.

La FIGURA 20 consta de un gráfico que muestra los resultados de los ensayos de FACS de unión de células Bjab *in vitro* (unión CD20) de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16.

Las FIGURAS 21A y 21B constan de gráficos que muestran los resultados de los ensayos de FACS de unión de células Jurkat *in vitro* (unión CD3) de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16.

La FIGURA 21C es una tabla que resume la CE50 (µg/ml) para cada TDB CD3/CD20 probado en las Figuras 21A y 21B.

Las FIGURAS 22A y 22B constan de gráficos que muestran los resultados de los ensayos de FACS de unión de células Bjab *in vitro* (unión CD20) de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16.

La FIGURA 23 consta de un gráfico que muestra los resultados de los ensayos de FACS de unión de células Jurkat *in vitro* (unión CD3) de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16.

La FIGURA 24 es una tabla que resume las afinidades de unión de varios TDBs y Fabs CD3/CD20, según las mediciones realizadas mediante análisis Biacore con CD3εγ humano en chip y TDB o Fab CD3/CD20 en flujo constante.

La FIGURA 25A es un gráfico que muestra el porcentaje de activación de células T, según las mediciones de expresión de superficie de CD69 y CD25, luego de 24 de incubación de TDBs CD3/CD20 específicos (serie 2H7) con 20.000 células Bjab y células hu CD8+ T purificadas 5 veces.

La FIGURA 25B es un gráfico que muestra el porcentaje de destrucción de Bjab relativo al control sin tratamiento TDB, luego de 24 horas de incubación de TDBs CD3/CD20 específicos (serie 2H7) con 20.000 células Bjab y células hu CD8+ T purificadas 5 veces, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 26A es un gráfico que muestra el porcentaje de activación de células T, según las mediciones de expresión de superficie de CD69 y CD25, luego de 24 horas de incubación de TDBs CD3/CD20 específicos (serie 2H7) con 200.000 células PBMC humanas por pozo.

La FIGURA 26B es un gráfico que muestra el porcentaje de eliminación de células B endógenas relativo al control sin tratamiento TDB, luego de 24 horas de incubación de TDBs CD3/CD20 específicos (serie 2H7) con 200.000 células PBMC humanas por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 27A es un gráfico que muestra el porcentaje de activación de células T, según las mediciones de expresión de superficie de CD69 y CD25, luego de 24 horas de incubación de TDBs CD3/CD20 específicos (serie UCHT1) con 20.000 células Bjab y células hu CD8+ T purificadas 5 veces.

La FIGURA 27B es un gráfico que muestra el porcentaje de destrucción de Bjab relativo al control sin tratamiento TDB, luego de 24 horas de incubación de TDBs CD3/CD20 específicos (serie UCHT1) con 20.000 células Bjab y células hu CD8+ T purificadas 5 veces, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 28A es un gráfico que muestra el porcentaje de activación de células T, según las mediciones de expresión de superficie de CD69 y CD25, luego de 24 horas de incubación de TDBs CD3/CD20 específicos (serie UCHT1) con 200.000 células PBMC humanas por pozo.

La FIGURA 28B es un gráfico que muestra el porcentaje de eliminación de células B endógenas relativo al control sin tratamiento TDB, luego de 24 horas de incubación de TDBs CD3/CD20 específicos (serie UCHT1) con 200.000 células PBMC humanas por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 29A es un gráfico que muestra el porcentaje de eliminación de células B endógenas relativo al control sin tratamiento TDB, luego de 24 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #3) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 29B es un gráfico que muestra el porcentaje de eliminación de células B endógenas, según las mediciones de expresión de superficie de CD69 y CD25, luego de 24 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2h7V16, con 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #3) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 30A es un gráfico que muestra el porcentaje de eliminación de células B endógenas relativo al control sin tratamiento TDB, luego de 24 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo

anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #4) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 30B es un gráfico que muestra el porcentaje de eliminación de células B endógenas, según las mediciones de expresión de superficie de CD69 y CD25, luego de 24 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #4) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 31A es un gráfico que muestra el porcentaje de eliminación de células B endógenas relativo al control sin tratamiento TDB, luego de 24 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #2) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 31B es un gráfico que muestra el porcentaje de activación de células T, según las mediciones de expresión de superficie de CD69 y CD25, luego de 24 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC de macaco (aisladas del Donante #2) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 32A es un gráfico que muestra el porcentaje de eliminación de células B endógenas relativo al control sin tratamiento TDB, luego de 24 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC de macaco (aisladas del Donante #3) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 32B es un gráfico que muestra el porcentaje de activación de células T, según las mediciones de expresión de superficie de CD69 y CD25, luego de 24 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC de macaco (aisladas del Donante #3) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 33A es un gráfico que muestra el porcentaje de destrucción de Bjab relativo al control sin tratamiento TDB, luego de 24 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC de macaco por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 33B es un gráfico que muestra el porcentaje de activación de células T, según las mediciones de expresión de superficie de CD69 y CD25, luego de 24 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC de macaco por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 34A es un gráfico que muestra el porcentaje de eliminación de células B endógenas relativo al control sin tratamiento TDB, luego de 24 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #2) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 34B es un gráfico que muestra el porcentaje de activación de células T, según las mediciones de expresión de superficie de CD69 y CD25, luego de 24 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #2) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 35A es un gráfico que muestra el porcentaje de eliminación de células B endógenas relativo al control sin tratamiento TDB, luego de 24 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #3) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 35B es un gráfico que muestra el porcentaje de activación de células T, según las mediciones de expresión de superficie de CD69 y CD25, luego de 24 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #3) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 36A es un gráfico que muestra el porcentaje de eliminación de células B endógenas relativo al control sin tratamiento TDB, luego de 24 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #4) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 36B es un gráfico que muestra el porcentaje de activación de células T, según las mediciones de expresión de superficie de CD69 y CD25, luego de 24 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #4) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

Las FIGURAS 37A y 37B son gráficos que muestran el porcentaje de activación de células T, según las mediciones de expresión de superficie de CD69 y CD25, luego de 24 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #1) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 37C es una tabla que resume la activación CE50 (ng/ml) de células CD8+ T para cada TDB CD3/CD20 probado en las Figuras 37A y 37B.

Las FIGURAS 38A y 38B son gráficos que muestran el porcentaje de eliminación de células B endógenas relativo al control sin tratamiento TDB, luego de 24 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #1) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 38C es una tabla que resume la eliminación CE50 (ng/ml) de células B endógenas para cada TDB CD3/CD20 probado en las Figuras 38A y 38B.

Las FIGURAS 39A y 39B son gráficos que muestran el porcentaje de activación de células T, según las mediciones de expresión de superficie de CD69 y CD25, luego de 48 horas de

incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #1) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 39C es una tabla que resume la activación CE50 (ng/ml) de células CD8+ T para cada TDB CD3/CD20 probado en las Figuras 39A y 39B.

Las FIGURAS 40A y 40B son gráficos que muestran el porcentaje de eliminación de células B endógenas relativo al control sin tratamiento TDB, luego de 48 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #1) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 40C es una tabla que resume la eliminación CE50 (ng/ml) de células B endógenas para cada TDB CD3/CD20 probado en las Figuras 40A y 40B.

Las FIGURAS 41A y 41B son gráficos que muestran el porcentaje de activación de células T, según las mediciones de expresión de superficie de CD69 y CD25, luego de 24 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #2) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 41C es una tabla que resume la activación CE50 (ng/ml) de células CD8+ T para cada TDB CD3/CD20 probado en las Figuras 41A y 41B.

Las FIGURAS 42A y 42B son gráficos que muestran el porcentaje de eliminación de células B endógenas relativo al control sin tratamiento TDB, luego de 24 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #2) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 42C es una tabla que resume la eliminación CE50 (ng/ml) de células B endógenas para cada TDB CD3/CD20 probado en las Figuras 42A y 42B.

Las FIGURAS 43A y 43B son gráficos que muestran el porcentaje de activación de células T, según las mediciones de expresión de superficie de CD69 y CD25, luego de 48 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #2) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 43C es una tabla que resume la activación CE50 (ng/ml) de células CD8+ T para cada TDB CD3/CD20 probado en las Figuras 43A y 43B.

Las FIGURAS 44A y 44B son gráficos que muestran el porcentaje de eliminación de células B endógenas relativo al control sin tratamiento TDB, luego de 48 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #2) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 44C es una tabla que resume la eliminación CE50 (ng/ml) de células B endógenas para cada TDB CD3/CD20 probado en las Figuras 44A y 44B.

La FIGURA 45A es un gráfico que muestra que ciertos TDB CD3/CD20, como por ejemplo

uno que tiene un brazo anti-CD20 de 2H7v16 y un brazo anti-CD3 de 72H6, no presentan potencia *in vitro*, conforme a los ensayos de destrucción de Bjab.

Las FIGURA 45B y 45C son gráficos que muestran que ciertos TDB CD3/CD20, como por ejemplo uno que tiene un brazo anti-CD20 de 2H7v16 y un brazo anti-CD3 de 72H6, no presentan potencia *in vitro*, conforme a los ensayos de eliminación de células B endógenas (B) y a los ensayos de activación de células T (C).

La FIGURA 46A es un gráfico que muestra que ciertos TDB CD3/CD20, como por ejemplo uno que tiene un brazo anti-CD20 de 2H7v16 y un brazo anti-CD3 de 13A3, no presentan baja potencia *in vitro*, conforme a los ensayos de destrucción de Bjab.

La FIGURA 46B es un gráfico que muestra que ciertos TDB CD3/CD20, como por ejemplo uno que tiene un brazo anti-CD20 de 2H7v16 y un brazo anti-CD3 de 30A1, presentan baja potencia *in vitro*, conforme a los ensayos de destrucción de Bjab.

La FIGURA 46C es un gráfico que muestra que ciertos TDB CD3/CD20, como por ejemplo uno que tiene un brazo anti-CD20 de 2H7v16 y un brazo anti-CD3 de 41D9a, presentan baja potencia *in vitro*, conforme a los ensayos de destrucción de Bjab. Se muestran los valores de destrucción CE50 (ng/ml) de Bjab para cada TDB CD3/CD20 probado.

La FIGURA 46D es un gráfico que muestra que ciertos TDB CD3/CD20, como por ejemplo uno que tiene un brazo anti-CD20 de 2H7v16 y un brazo anti-CD3 de 41D9a, presentan baja potencia *in vitro*, conforme a los ensayos de eliminación de células B endógenas. Se muestran los valores de eliminación CE50 (ng/ml) de células B endógenas para cada TDB CD3/CD20 probado.

La FIGURA 46E es un gráfico que muestra que ciertos TDB CD3/CD20, como por ejemplo uno que tiene un brazo anti-CD20 de 2H7v16 y un brazo anti-CD3 de 41D9a, presentan baja potencia *in vitro*, conforme a los ensayos de activación de células T.

La FIGURA 47A es un gráfico que muestra que ciertos TDB CD3/CD20, como por ejemplo aquellos que tienen un brazo anti-CD20 de 2H7v16 y un brazo anti-CD3 de UCHT1v9, 21A9 y 40G5c, presentan gran potencia *in vitro*, conforme a los ensayos de eliminación de células B endógenas que utilizan 200.000 células PBMC (aisladas del Donante #1) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 47B es un gráfico que muestra que ciertos TDB CD3/CD20, como por ejemplo aquellos que tienen un brazo anti-CD20 de 2H7v16 y un brazo anti-CD3 de UCHT1v9, 21A9 y 40G5c, presentan gran potencia *in vitro*, conforme a los ensayos de activación de células T que utilizan 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #1) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 48A es un gráfico que muestra que ciertos TDB CD3/CD20, como por ejemplo aquellos que tienen un brazo anti-CD20 de 2H7v16 y un brazo anti-CD3 de UCHT1v9, 21A9 y 40G5c, presentan gran potencia *in vitro*, conforme a los ensayos de eliminación de células B endógenas que utilizan 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #2) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 48B es un gráfico que muestra que ciertos TDB CD3/CD20, como por ejemplo aquellos que tienen un brazo anti-CD20 de 2H7v16 y un brazo anti-CD3 de UCHT1v9,

21A9 y 40G5c, presentan gran potencia *in vitro*, conforme a los ensayos de activación de células T que utilizan 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #2) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 49 es una tabla que resume las potencias *in vitro* para distintos TDB CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16.

La FIGURA 50 muestra los dominios variables de cadena ligera (parte superior) y dominios variables de cadena pesada (parte inferior) de secuencias de aminoácidos de anticuerpos anti-CD20 2H7.v16.

La FIGURA 51 muestra los dominios variables de cadena ligera (parte superior) y dominios variables de cadena pesada (parte inferior) de secuencias de aminoácidos de anticuerpos anti-CD3 hu40G5c.

Las IMÁGENES 52A y 52B muestran que los TDB CD3/CD20 (40G5c/2H7v16) purificados no tienen una formación perceptible de agregados según lo determinado por la cromatografía de exclusión de tamaños (SEC) (A) y ninguna formación de homodímeros perceptibles (es decir, formación de anticuerpos CD3/CD3 o CD20/CD20) según lo evaluado por la espectometría de masas.

La FIGURA 53A es un gráfico que muestra la farmacocinética de las concentraciones séricas de los TDB CD3/CD20 en dosis variables en ratas Sprague Dawley (SD) a través del tiempo (en días), según la evaluación de farmacocinética genérica de inmunoglobulina (GRIP) o un ensayo específico.

LA FIGURA 53B es una tabla que resume los valores del margen cuantificado (ml/día/kg) de los anticuerpos TDB CD3/CD20 probados en cada dosis probada en la Figura 53A.

La FIGURA 54A es un gráfico que muestra que la sección F $(ab')_2$ de TDB CD20 retuvo la misma potencia que el TDB CD20 IgG de longitud completa en la destrucción de células B (muerte Bjab) *in vitro*. 20.000 células Bjab y 200.000 PBMC aislados de donantes sanos fueron incubados con varias concentraciones de TDB CD20 de longitud completa o TDB CD20 F (ab')2 durante 24 horas.

La FIGURA 54B es un gráfico que muestra que la actividad de la destrucción celular B de TDB CD20 es dependiente de células T, dado que no se detectó una matanza de células B con PBMC agotados de células T CD3+. 20.000 células Bjab y 200.000 PBMC aislados de donantes sanos o 200.000 PBMC agotados de células T CD3+ fueron incubadas con varias concentraciones de TDB CD20 durante 24 horas.

LA FIGURA 54C es un gráfico que muestra que la destrucción de células B comparable se puede lograr ya sea con células T CD4+ o CD8+ como efectores. 20.000 células Bjab y 100.000 células T CD8+ purificadas o células T CD4+ se incubaron con diversas concentraciones de TDB CD20 durante 24 horas. La destrucción celular y la activación de células marcadas como T CD69+CD25+ se midieron y calcularon como se describe a continuación.

La FIGURA 54D es un gráfico que muestra que TDB CD20 es capaz de activar células T CD4+ y CD8+. 20.000 células Bjab y 100.000 células T CD8+ purificadas o células T CD4+

se incubaron con diversas concentraciones de TDB CD20 durante 24 horas. La destrucción celular y la activación de células marcadas como T CD69+CD25+ se midieron y calcularon como se describe a continuación.

La FIGURA 54E es un gráfico que muestra que la sobrerregulación de granzima es más frecuente dentro de las células T CD8+ tras la adición de TDB CD20. 20.000 células Bjab y 100.000 células T CD8+ purificadas o células T CD4+ se incubaron con diversas concentraciones de TDB CD20 durante 24 horas. La inducción de la granzima B también se detectó por medio de FACS.

La FIGURA 54F es un gráfico que muestra que un mayor nivel de liberación de perforina está asociado con las células T CD8+ tras la adición de TDB CD20. 20.000 células Bjab y 100.000 células T CD8+ purificadas o células T CD4+ se incubaron con diversas concentraciones de TDB CD20 durante 24 horas. La concentración de perforina en los medios se midió con ELISA.

La FIGURA 55 es una serie de gráficos de citometría de flujo que muestran que las células T activadas son capaces de proliferar en la presencia de células TDB CD20 y Bjab.

La FIGURA 56A es una serie de gráficos que muestran las curvas de destrucción de células B con respuesta a dosis de líneas celulares de tumores/linfomas 8 B (izquierda) y los niveles de expresión de CD20 para líneas de células B dadas con un control de isotipo en gris, medido por FACS. Las células B se cultivaron en medios RPMI 1640 suplementados con FBS al 10 %. Para el ensayo de destrucción, 20.000 células B se incubaron con 200.000 PBMC aisladas de donantes saludables con varias concentraciones de TDB CD20 durante 24 horas.

La FIGURA 56B es un gráfico que muestra una amplia gama en la expresión media de CD20 en las líneas celulares 8 B probadas en la Figura 56A. Las células T CD4+ o T CD8+ purificadas a partir de sangre entera de donantes sanos y etiquetadas con CFSE se incubaron solas y únicamente con Bjab, con TDB CD20 solamente o con Bjab y TDB CD20 durante 24 horas primero y, a continuación, se lavaron las células y se pusieron en medios frescos durante otras 48 horas. La intensidad CFSE de las células T se detectó por FACS, al mostrar la proliferación de las células T sólo en presencia de Bjab y TDB CD20.

La FIGURA 56C es un conjunto de gráficos que muestran que TDB CD20 es potente en destruir todas las 8 líneas de una manera que depende de la dosis, con valores de EC50 de la destrucción de células B (ng/ml) (superior) y el porcentaje de destrucción de células B (parte inferior) representada como una función de la expresión de CD20 sobre la célula diana B.

La FIGURA 56D es un gráfico que muestra que TDB dirigidas a 5 antígenos de células B diferentes son comparables en la mediación de la destrucción de células T de las células Bjab. Las células B se cultivaron en medios RPMI 1640 suplementados con FBS al 10 %. Para el ensayo de destrucción, se incubaron 20.000 células con 100.000 células T CD8+ purificadas a partir de un donante sano con TDB CD20 (TDB A: 2H7v16/UCHT1v9) o una TDB orientada a un antígeno diferente de células B (es decir, TDB B-E, cada una dirigida a un antígeno de células B diferente) en una concentración de 1000 ng/ml durante 24

horas.

La FIGURA 56E es un gráfico que muestra la extensión de destrucción de células B para líneas de células tumorales de leucemia/linfomas 10 B. Las células B se cultivaron en medios RPMI 1640 suplementados con FBS al 10 %. Para el ensayo de destrucción, se incubaron 20.000 células B con 100.000 células T CD8+ purificadas de un donante sano con TDB CD20 de 1000 ng/ml (2H7v16/UCHT1v9) durante 24 horas.

La FIGURA 56F es un gráfico que muestra las curvas de destrucción de respuesta a la dosis para 8 donantes aleatorios.

La FIGURA 56G es un gráfico del resumen del trazado para EC50 (izquierda) y el alcance de la destrucción de células B (derecha) con anticuerpos de 1000 ng/ml en un ensayo de 24 horas para 30 donantes.

La FIGURA 56H es un conjunto de gráficos que muestran que el grado de destrucción de células B en 24 horas por TDB CD20 es muy comparable o mayor que la destrucción de células B por scFv CD19. Para la eliminación de células B autólogas, 200.000 PBMC aisladas de donantes sanos fueron incubadas durante 24 horas con TDB CD20 en la concentración indicada. La muerte celular notificada se calculó como se describe a continuación.

La FIGURA 56I es un conjunto de gráficos que muestran que el grado de destrucción de células B en 24 horas por TDB CD20 es muy comparable o mayor que la destrucción de células B por CD19-TDB o CD22-TDB (panel superior) o CD79a o CD79b (panel inferior). Para la destrucción de células B autólogas, 200.000 PBMC aisladas de donantes sanos fueron incubadas con 40.000 células BJAB durante 24 horas con TDB CD20, CD19, CD22, CD79a o CD 79b en la concentración indicada. La muerte celular notificada se calculó como se describe a continuación.

La FIGURA 57A es una serie de gráficos que muestran los valores relativos de expresión para $CD3_{\varepsilon}$ humano detectado en células T CD4+ (panel izquierdo) y células T CD8+ (panel central); y CD20 humano en células B CD19+ (panel derecho) detectado en un ratón (mu) o PBMC humanos (hu) medido por FACS. Los PBMC de ratones se obtuvieron de la sangre de ratones transgénicos dobles huCD3/huCD20; se obtuvieron PBMC humanos a partir de sangre de donantes sanos.

La FIGURA 57B es un gráfico que muestra que TDB CD20 no puede captar células T murinas para disminuir las células B sin expresión de CD3 humano en ratones transgénicos con CD20 humano. Los ratones transgénicos huCD20 o ratones transgénicos dobles huCD20/CD3 se trataron una vez por vía intravenosa con anticuerpos como se indica (10 mg/kg para rituximab, 0,5 mg/kg para TDB CD20 y TDB HER2). Se recogieron bazos de ratón en D7 (7 días después del tratamiento con anticuerpos). El anticuerpo rituximab CD20 antihumano se utilizó como un control positivo. TDB CD3/HER2 se utiliza como un control de isotipo negativo.

La FIGURA 57C es un gráfico que muestra que TDB CD20 no puede captar células T murinas que expresan huCD3 en ratones transgénicos doble con CD3/CD20 humanos para disminuir potencialmente las células B con expresión de huCD20. Los ratones

transgénicos CD20 o ratones transgénicos dobles huCD20/huCD20 se trataron una vez por vía intravenosa con anticuerpos como se indica (10 mg/kg para rituximab, 0,5 mg/kg para TDB CD3 y TDB HER2). Se recogieron bazos de ratón en D7 (7 días después del tratamiento con anticuerpos). TDB CD3/HER2 se utiliza como un control de isotipo negativo.

La FIGURA 58A es una serie de gráficos de un estudio de curso temporal que muestran que el tratamiento con TDB CD20 resultó en la disminución sostenida de células B hasta D15 (15 días después de la dosificación). Se trataron una vez ratones transgénicos dobles huCD20/huCD3 por vía intravenosa con varias dosis de TDB CD20. Se recolectó sangre de ratón (D1, D8 y D15).

La FIGURA 58B es un gráfico que muestra que la disminución de células B en el bazo de ratón casi completa sólo se logró en D7 después de una sola dosis de 0,5 mg/kg, mientras que una dosis más baja de 0,05 mg/kg sólo dio lugar a la disminución parcial de células B del bazo. Los ratones doble transgénicos huCD20/CD3 fueron tratados una vez por vía intravenosa con diversas dosis de TDB CD20. Se recolectaron bazos (D7).

La FIGURA 58C es un gráfico que muestra que la disminución de células B robusta en D7 se observa en la circulación de los ratones transgénicos dobles huCD3/huCD20 tratados con TDB CD20. Los ratones doble transgénicos huCD20/huCD3 se trataron una vez por vía intravenosa con 0,5 mg/kg de TDB CD20. Se recolectó sangre en D0-5 min. (5 minutos después del tratamiento), D0-2h, D0-8h, D1, D2, D3, y D7. Las células B que expresan huCD20 se midieron con FACS.

La FIGURA 58D es una serie de gráficos que muestran la activación de células T en los ratones doble transgénicos huCD3/huCD20 tratados con un TDB CD20. Los ratones doble transgénicos huCD3/huCD20 tratados exhibieron hasta un aumento del 80 % en $CD3_{\varepsilon}$ humano que expresa el recuento de células T CD8+ a las 2 horas de posteriores al tratamiento con TDB CD20, lo que regresó a nivel básico de D2 y D7 (panel superior). Del mismo modo, $CD3_{\varepsilon}$ humano que expresa las células T CD4+ se incrementó en un 80 % 2 horas después del tratamiento con TDB CD20 y posteriormente regresó al nivel base de D2. Los ratones doble transgénicos huCD3/huCD20 se trataron una vez por vía intravenosa con 0,5 mg/kg de TDB CD20. Se recolectó sangre en D0-5 min. (5 minutos después del tratamiento), D0-2h, D0-8h, D1, D2, D3, y D7. Las células T CD4+ y CD8+ que expresan $CD3_{\varepsilon}$ se midieron con FACS.

La FIGURA 59A es una serie de gráficos de citometría de flujo que muestran que TDB CD20 reduce las células B de la zona marginal (MZB) tan eficientemente como las células B foliculares (FOB) después de la administración de TDB a los ratones doble transgénicos huCD3/huCD20. Dos animales doble transgénicos (paneles de la izquierda y derecha, respectivamente) se trataron con vehículos (paneles superiores) o una dosis intravenosa única de TDB de 0,5 mg/kg (paneles inferiores). Se recolectaron vasos de ratones en D7 y se analizaron con FACS.

La FIGURA 59B-59E es una serie de gráficos que muestran que TDB CD20 reduce células B de la zona marginal (MZB) (B) de forma tan eficiente como las células B foliculares

(FOB) (C) después de una dosis intravenosa única de TDB de 0,5 mg/kg, junto con la activación de las células T CD8+ (D) y la proliferación de las células T CD8+ (E) en el bazo en los momentos indicados. Se recolectaron bazos de ratones en D1, D2, D3, D5, D7 y D14.

La FIGURA 60A es un gráfico que muestra que los ratones humanizados NSG tratados con 3 dosis semanales de TDB CD20 en 0,5 m/kg (ajuste de dosis repetidas) exhibieron niveles escasos de células B en la sangre en D7, con células B casi no detectadas en D21. Los ratones humanizados NSG se trataron con 3 dosis semanales de TDB CD20 de 0,5 mg/kg por vía intravenosa. Se recolectó sangre en D-5 (5 días antes del tratamiento), D7, D14 y D21. Los recuentos de células B murinas en sangre se midieron con FACS.

La FIGURA 60B es un gráfico que muestra que la disminución robusta de células B en D21 se observó en el bazo de ratones humanizados NSG tratados con TDB CD20. Los ratones humanizados NSG se trataron con 3 dosis semanales de 0,5 mg/kg de TDB CD20 por vía intravenosa. Se recolectaron bazos en D21. Los recuentos de células B murinas en el bazo se midieron con FACS.

La FIGURA 60C es una serie de gráficos de citometría de flujo que muestran que las células T huCD8 + proliferan y que las células B huCD19+ disminuyen 7 días después del tratamiento (D7) de ratones humanizados NSG con TDB CD20. Los ratones humanizados NSG se trataron con vehículos o TDB CD20 de 0,5mg/kg (2H7v16/UCHT1v9). Los bazos de control y los ratones humanizados NSG tratados con TDB CD20 se recogieron en D7. Las células B que expresan huCD19 y células T que expresan huCD19 y huCD8 se midieron con FACS.

La FIGURA 60D es un gráfico que muestra que los ratones humanizados NSG tratados con 3 dosis semanales de TDB CD20 en 0,5 mg/kg (ajuste de dosis repetida) mostraron un aumento de hasta 10 veces el recuento de células T CD8+ en D7, que regresó al nivel básico o inferior en D14 y D21. Los ratones humanizados NSG se trataron con 3 dosis semanales de 0,5 mg/kg de TDB CD20 por vía intravenosa. Se recolectó sangre en D-5 (5 días antes del tratamiento), D7, D14 y D21. Los recuentos de células T murinas CD8+ en sangre y la activación de células T se midieron con FACS.

La FIGURA 60E es una serie de gráficos de citometría de flujo que muestra los niveles basales de células B huCD20+ (paneles centrales) y células T huCD8+ y huCD4+ (paneles de la derecha) de 2 ratones humanizados NSG, según se mide con FACS.

La FIGURA 60F es una serie de gráficos que muestran los niveles de expresión en la superficie celular de huCD3$_{\varepsilon}$ y la expresión de CD20 en las células B CD19+ (izquierda), las células T CD8+ (centro) y las células T CD4+ (derecha) detectadas por FACS. La FIGURA 61A es un gráfico que muestra que TDB CD20 es potente en la eliminación de las células B de la CLL con células T autólogas. Se incubaron 200.000 PBMC con diversas concentraciones de TDB CD20 durante 48 horas en medios RPMI suplementados con FBS al 10 %.

Figura 61B es un gráfico que muestra que TDB CD20 es potente en la inducción de la activación de células T autólogas en presencia de las células B de CLL. Se incubaron

200.000 PBMC con diversas concentraciones de TDB CD20 durante 48 horas en medios RPMI suplementados con FBS al 10 %.

La FIGURA 61C es un conjunto de gráficos que muestran que el recuento de células T es altamente correlativo con la destrucción de células B de CLL *ex vivo*. Se incubaron 200.000 PBMC con TDB CD20 de 1000 ng/ml durante 48 horas, ya sea solos o con células T CD8+ agregadas purificadas de donantes sanos. El porcentaje de células B CD19+CD5+ y células T CD8+ en los PBMC de LLC son de 90/0,55 para la muestra A1645, 76/3,5 para A1957, 87/0,63 para A1978, 69/1,3 para A1980. La destrucción celular, la inducción de granzima B y la activación de células T se midieron con FACS como se describe a continuación.

La FIGURA 62A es un conjunto de gráficos que muestran que la activación de células T (izquierda) después de posologías de TDB CD20 de 0,1 mg/kg o 0,5 mg/kg a los ratones NSG con células de leucemia de CLL injertadas correlacionadas con la disminución notable de células B de CLL injertadas (derecha).

La FIGURA 62B es un conjunto de imágenes de inmunohistoquímica de secciones del bazo de ratones NSG con células de leucemia de CLL injertadas que muestra que pueden detectarse pocas células B después del tratamiento con TDB CD20. Se injertaron células B y células T en ratones NSG como se describe a continuación. Los ratones se trataron una vez por vía intravenosa con TDB HER2 y rituximab en 0,5 mg/kg, TDB CD20 en 0,1 y 0,5 mg/kg y los bazos se recogieron para el análisis con FACS 14 días después del tratamiento.

La FIGURA 63 es un gráfico que muestra el volumen del tumor adaptado con el paso del tiempo de tumores injertados de Bjab de ratones SCID para el Grupo 1 (vehículo: 20 mM de histidina/acetato a pH 5,5, 240 mM de sacarosa, Tween 20 al 0,02 %); Grupo 2 (TDB CD20: 2H7v114/UCHT1.v9; 0,5 mg/kg); Grupo 3 (vehículo: 20 mM de histidina/acetato a pH 5,5, 240 mM de sacarosa, Tween 20 al 0,02 %, PBMC); y Grupo 4 (TDB CD20: CD20 2H7v114/CD3 UCHT1.v9; 0,5 mg/kg, PBMC). Las células efectoras derivaban del PBMC de un donante humano sano. Los ratones se trataron una vez por semana durante dos semanas.

La FIGURA 64A es un gráfico que muestra el nivel relativo de expresión de CD20 en células BJAB, NALM-6, SC-1 y OCI-LY 19. Se injertaron células B y células T en ratones NSG como se describe a continuación. Los ratones se trataron una vez por vía intravenosa con TDB HER2 y rituximab en 0,5 mg/kg, TDB CD20 en 0,1 y 0,5 mg/kg y los bazos se recogieron para el análisis con IHC 14 días después del tratamiento.

La FIGURA 64B es un gráfico que muestra que rituximab y TDB CD20 son comparables en su eficacia para destruir células BJAB *in vitro*, que expresan un alto nivel de CD20 en su superficie celular. Se agotaron las células B en los PBMC aislados de donantes sanos y se utilizaron como células efectoras en el ensayo de destrucción celular in vitro. 20.000 células B y 200.000 células efectoras se incubaron con diversas concentraciones de TDB CD20 durante 24 horas. La expresión TDB CD20 se detectó con FACS.

La FIGURA 64C es un gráfico que muestra que TDB CD20, pero no rituximab, es capaz de

destruir las células NALM-6, SC-1 y OCI-LY 19 que tienen niveles relativamente bajos de CD20 en su superficie celular. Se agotaron las células B en los PBMC aislados de donantes sanos y se utilizaron como células efectoras en el ensayo de destrucción celular in vitro. 20.000 células B y 200.000 células efectoras se incubaron con diversas concentraciones de TDB CD20 durante 24 horas. La expresión TDB CD20 se detectó con FACS.

La FIGURA 64D es un gráfico que muestra los niveles de expresión de la superficie de las células B del antígeno CD20 desbloqueado como una función de la concentración de Rituximab-DANA, según se mide con FACS. Los ratones CD20/CD3 doble transgénicos se trataron con una dosis única de vehículo o Rituximab-DANA (10mg/kg). Los bazos se cultivaron 5 días después del tratamiento.

Las FIGURAS 65A y 65B son gráficos que muestran que TDB CD20 está activo en la eliminación de células B *in vitro* en presencia de altos niveles de rituximab (A) o dexametasona (B). Los 200.000 PBMC aislados de donantes sanos se incubaron primero con rituximab-DANA en la concentración indicada durante 1 hora y luego se añadió TDB CD20 y se incubó durante 24 horas. Para el ensayo con dexametasona, las células se trataron previamente con 1μM de dexametasona durante la noche antes de añadir TDB CD20. La destrucción celular notificada se calculó como se describe a continuación.

La FIGURA 66 es un conjunto de gráficos que muestran que TDB CD20 está activo en células B en agotamiento en la sangre (izquierda) y el bazo (derecha) en ratones pretratados con rituximab-DANA. Para el tratamiento con un agente único, los ratones doble transgénicos huCD20/CD3 se trataron una vez por vía intravenosa con la dosis indicada; para el tratamiento de combinación, los ratones se trataron primero por vía intravenosa con rituximab-DANA y se inyectó TDB CD20 por vía intravenosa 30 minutos más tarde. Se recolectó sangre en D-7, D0-2h (2 horas después del tratamiento con TDB) y D7; se recogieron los bazos en D7. Los recuentos de células B se midieron con FACS como se describe a continuación.

La FIGURA 67A es un conjunto de gráficos que muestran el recuento de células B (izquierda), células T CD4+ (medio) y células T CD8+ (derecha) en muestras de sangre de 3 monos cynomolgus antes y 7 días después del tratamiento con una sola dosis intravenosa de TDB CD20 de 1 mg/kg. Se trataron tres monos cynomolgus una vez por vía intravenosa con TDB CD20 de 1mg/kg. La sangre se recogió en D-7 (7 días antes de la dosis), D0-4hr (4 horas después de la dosis) y D7.

La FIGURA 67B es un conjunto de gráficos que muestran las células B, células T CD4+ y los niveles de células T CD8+ en el bazo (izquierda), los ganglios linfáticos mandibulares (medio) y los ganglios linfáticos mesentéricos (derecha) de 3 monos cynomolgus 7 días después del tratamiento con una sola dosis intravenosa de TDB CD20 de 1 mg/kg. Se trataron tres monos cynomolgus una vez por vía intravenosa con TDB CD20 de 1mg/kg. La sangre se recogió en D-7 (7 días antes de la dosis), D0-4hr (4 horas después de la dosis) y D7.

La FIGURA 67C es un conjunto de gráficos que muestran las células B, células T CD4+ y los niveles de células T CD8+ en el bazo (izquierda), los ganglios linfáticos mandibulares

(medio) y los ganglios linfáticos mesentéricos (derecha) de 3 monos cynomolgus antes del tratamiento con una sola dosis intravenosa de TDB CD20 de 1 mg/kg. Se trataron tres monos cynomolgus una vez por vía intravenosa con TDB CD20 de 1mg/kg. La sangre se recogió en D-7 (7 días antes de la dosis), D0-4hr (4 horas después de la dosis) y D7.

La FIGURA 67D es un conjunto de gráficos que muestran los niveles basales de las células B y las células T CD4+ y CD8+ como un porcentaje de linfocitos totales detectados en el bazo (izquierda) y los ganglios linfáticos mandibulares (derecha) en animales tratados con control de vehículo.

La FIGURA 68A es un conjunto de gráficos que muestran la concentración sérica de TDB CD20 a partir de muestras de sangre y de suero recogidas de cuatro monos cynomolgus que se trataron 4 veces por semana con TDB CD20 de 1mg/kg por vía intravenosa.

La FIGURA 68B es un conjunto de gráficos que muestran la concentración de TDB CD20 a partir de muestras de suero tomadas de animales descritos en las Figuras 65 y 66A. Se graficó el s.d. ± medio.

La FIGURA 69A es un histograma que muestra la expresión de la expresión de PD-L1 en células A20-huCD20 de ratones singénicos A20-huCD20 Balb/C, según lo evaluado por una citometría de flujo.

La FIGURA 69B es un gráfico que muestra el volumen del tumor en relación con el tiempo para el Grupo 1 (vehículo); Grupo 2 (TDB CD20 a 0,5 mg/kg); Grupo 3 (anticuerpo anti-PD-L1 en 10 mg/kg); y el Grupo 4 (TDB CD20 en 0,5 mg/kg + anticuerpo anti-PD-L1).

La FIGURA 70 es un gráfico que muestra las curvas de unión para cada una de las tres TBD FcRH5 evaluadas para la unión *in vitro* a células T que CD8+ con expresión CD3.

La FIGURA 71A es un gráfico que muestra el porcentaje de la destrucción de células diana MOLP-2 como una función de la concentración de TDB FcRH5 con células T CD8+ purificadas a partir de PBMC humanos desde el Donante N. ° 1.

La FIGURA 71B es un gráfico que muestra el porcentaje de la destrucción de células diana MOLP-2 como una función de la concentración de TDB FcRH5 con células T CD8+ purificadas a partir de PBMC humanos desde el Donante N. ° 2.

La FIGURA 72A es un gráfico que muestra el porcentaje de células CD8+CD69+T como función de concentración TDB de FcRH5, como se evalúa con un análisis FACS. Las células eran MOLP-2, y las células CD8+T se purificaron del Donante N. ° 1.

La FIGURA 72B es un gráfico que muestra el porcentaje de células CD8+CD107a+T como función de concentración TDB de FcRH5, como se evalúa con un análisis FACS. Las células eran MOLP-2, y las células CD8+T se purificaron del Donante N. ° 1.

La FIGURA 72C es un gráfico que muestra el porcentaje de células CD8+CD69+T como función de concentración TDB de FcRH5, como se evalúa con un análisis FACS. Las células eran MOLP-2, y las células CD8+T se purificaron del Donante N. ° 2.

La FIGURA 72D es un gráfico que muestra el porcentaje de células CD8+CD107a+T como una función de concentración TDB de FcRH5, como se evalúa con una análisis FACS. Las

células diana eran MOLP-2, y las células CD8+T se purificaron del Donante n.° 2.

La FIGURA 73 es un grupo de gráficos que muestran las curvas de unión para cada uno de los tres TDB de HER2 que se analizaron para la unión *in vitro* con células SKBR3 que expresan Her2 (superior) y las células T que expresan CD8+ CD3 (inferior).

La FIGURA 74A es un gráfico que indica las curvas de unión para trastuzumab (bivalente), trastuzumab (Fab) y TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5) (biespecífico) para unión *in vitro* con células SKBR3 que expresan HER2.

La FIGURA 74B es un gráfico que indica el porcentaje de células SKBR3 viables como una función para la concentración de trastuzumab (bivalente), trastuzumab (Fab) y TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5) (biespecífico), como se evalúa con el Ensayo de viabilidad celular luminiscente CELLTITERGLO®.

La FIGURA 74C es un gráfico que indica el porcentaje de muertes de células diana SKBR mediado por citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC) en presencia de trastuzumab (T-mab), trastuzumab producido en *E. coli* (T-mab *E. coli*), y TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5), como se evalúa con la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) de las células lisadas.

La FIGURA 75 es un gráfico que indica el porcentaje de muertes de células diana SKBR3 como una función de la concentración de TDB de HER2 (hu4D5-TDB, hu4D5.91A-TDB y hu4D5.Y100A-TDB).

La FIGURA 76A es una serie de paneles. El panel superior es un modelo de la estructura de cristal de la unión de dominio extracelular de HER2 (ECD, por su sigla en inglés) por hu4D5 Fab (Trastuzumab), 2C4 Fab (Pertuzumab) y 7C2. El panel inferior es una estructura de lazo de la unión de $CD3_{\varepsilon}$ por 2C11, 38E4v1 y 40G5c.

La FIGURA 76B es una tabla que indica las afinidades de unión y se representan con la constante de disociación K_D (nM), de TDB de HER2 para tres grupos HER2 diferentes: hu4D5, 2C4 y 7C2. El panel inferior derecho es una tabla que indica las afinidades de unión y se representan con la constante de disociación K_D (nM), de TDB de HER2 para tres grupos $CD3_{\varepsilon}$ diferentes: 38E4v1, 40G5c, y 2C11.

La FIGURA 76C es un gráfico que indica el porcentaje de muertes de células diana MCF7 que expresan HER2 como una función de la concentración TDB de HER2 (hu4D5-TDB, 2C4-TDB y 7C2-TDB). Se midió la citotoxicidad con la liberación del lactato deshidrogenasa (LDH).

La FIGURA 77 es un gráfico que indica que los grupos HER2 hu4D5 y 2C4 son fuertes mediadores de la muerte celular como expone el porcentaje máximo de muerte de células diana SKBR3 logrado con el tratamiento con las siguientes variedades TDB de HER2: hu4D5-38E4v1, hu4D5-40G5c, 2C4-38E4v1, 2C4-40G5c, 7C2-38E4v1, y 7C2-40G5c.

La FIGURA 78 es una serie de gráficos que indican la potencia de las variantes TDB de HER2 para matar líneas celulares SKBR3 que expresan HER2 (izquierda) y MCF7 que expresan HER2 (derecha) de forma dosis dependiente, con valores CE50 de muerte de células diana (pM). La FIGURA 79 es una serie de gráficos que indican el porcentaje de

muerte de células diana SKBR3 que expresan HER2 para varios TDB con grupos HER2 (hu4D5, 2C4 y 7C2) emparejados con grupos CD3 con afinidad alta (38E4v1) o baja (40G5c) como una función de la concentración TDB (ng/ml).

La FIGURA 80 es una serie de paneles. El panel de la izquierda indica la potencia de las variantes TDB de HER2 (hu4D5-38E4v1, 2C4-38E4v1, 7C2-38E4v1; hu4D5-40G5c, 2C4-40G5c, 7C2-40G5c) para matar líneas celulares SKBR3 que expresan HER2 y MCF7 que expresan HER2 de forma dosis dependiente, con valores CE50 de muerte de células diana (pM). El panel de la derecha es una tabla con la proporción de CE50 de las variantes TDB de HER2 dadas en células diana MCF7 en comparación con SKBR3 para tres experimentos.

La FIGURA 81 es una serie de paneles. El panel superior muestra una tabla que enumera las variantes del grupo HER2 hu4D5 (hu4D5v7, hu4D5v5, hu4D5v10, hu4D5v31, hu4D5.Y100A) para TDB de HER2 (grupo CD3 40G5c) y el correspondiente CE50 (ng/ml) para la muerte de células diana SKBR3, afinidad de unión HER2 (K_D, nM) además de la proporción de la afinidad de unión K_D de HER2 y el CE50 de muerte de células diana SKBR3 para las variantes hu4D5 relativas a hu4D5. El panel inferior es un gráfico que indica la correlación entre la proporción CE50 SKBR3 para las variantes TDB de hu4D5 HER2 (hu4D5, hu4D5v7, hu4D5v5, hu4D5v10 y hu4D5v31) y la proporción K_D relativa para las variantes TDB de HER2 hu4D5.

La FIGURA 82 es una serie de gráficos que indican el porcentaje de muerte de células diana SKBR3 y MCF7 como una función de la concentración de las siguientes variantes TDB de HER2: hu4D5-40G5c (superior izquierda), hu4D5v7-40G5c (superior centro), hu4D5v5-40G5c (superior derecha), hu4D5v10-40G5c (inferior izquierda), hu4D5v31-40G5c (inferior centro), hu4D5.Y100A-40G5c (inferior derecha).

La FIGURA 83 es una serie de gráficos. El gráfico a la izquierda indica el porcentaje de muerte de células diana como una función de la concentración (µg/ml) de los anticuerpos monoespecíficos bivalentes bloqueantes de HER2 específicos para el grupo designado HER2 del TDB de HER2. (Anticuerpos bloqueantes de HER2: anticuerpos monoespecíficos bivalentes para hu4D5, 2C4 y 7C2. TDB de HER2: hu4D5-40G5c, 2C4-40G5c y 7C2-38E4v1 con concentraciones fijas: 10 ng/ml). El gráfico de la derecha muestra el porcentaje de células viables como una función de la concentración de anticuerpo HER2 (hu4D5) trastuzumab en presencia y ausencia de TDB de HER2 hu4D5-40G5c.

La FIGURA 84 es una serie de paneles. El panel superior es una tabla que muestra la reactividad de las variantes del grupo HER2 con HER2 como se midió con varios ensayos de unión junto con la reactividad de los clones HER2 con el anticuerpo hu4D5 trastuzumab. El panel inferior es un gráfico que muestra el porcentaje de muerte de células diana como una función de la concentración (pM) de Fab biespecífico HER2 para ciertos clones (hu4D5, 3H4 y 2H11). Se incluyen los valores CE50 para cada clon en pM.

La FIGURA 85 es una tabla que indica la información de afinidad y reactividad para las variantes del grupo CD3 TDB de HER2 (38E4v1, 38E4, SP34, 40G5c y 2C11).

La FIGURA 86 es un gráfico que indica la muerte de células diana CT26 que expresan HER2 como una función de concentración (ng/ml) de variantes TDB de HER2 (hu4D5-2C11, hu4D5-SP34, 7C2-2C11 y 2C4-2C11). Células efectoras: Células T derivadas de TG CD3

La FIGURA 87A es un gráfico que indica el volumen del tumor (mm^3) medido con el paso del tiempo (0 a 5 días) en animales administrados con vehículo o TDB de HER2 (0,5 mg/kg).

La FIGURA 87B es una serie de gráficos. El gráfico superior izquierdo muestra el porcentaje de las células CD45+ periféricas por 5 células detectadas el día 6 después del tratamiento con vehículo o TDB de HER2 (0,5 mg/kg). El gráfico superior derecho muestra el porcentaje de las células CD45+ periféricas que son células CD8+ detectadas el día 6 después del tratamiento con vehículo o TDB de HER2 (0,5 mg/kg). El gráfico inferior izquierdo muestra el porcentaje de las células CD45+ periféricas que son células CD4+ detectadas el día 6 después del tratamiento con vehículo o TDB de HER2 (0,5 mg/kg). El gráfico inferior derecho muestra el porcentaje de las células CD8+ periféricas que son células IFN+ detectadas el día 6 después del tratamiento con vehículo o TDB de HER2 (0,5 mg/kg).

La FIGURA 88A es una serie de gráficos. El gráfico superior muestra un gráfico de cascada del cambio porcentual en el volumen del tumor en animales administrados con variante del vehículo o TDB de HER2 (hu4D5-SP34 o hu4D5-2C11; 0,5 mg/kg; IV, semanal, 5 semanas). El gráfico inferior muestra un gráfico de cascada del cambio porcentual en el volumen del tumor en animales administrados con variante de TDB de HER2 (2C4-38E4; 0,5 mg/kg; IV, semanal, 5 semanas).

La FIGURA 88B es una serie de gráficos. El gráfico superior muestra el volumen del tumor como un porcentaje del volumen basal en función del tiempo (días) para animales administrados con vehículo o TDB de HER2 (hu4D5-SP34). El gráfico inferior muestra el volumen del tumor como un porcentaje del volumen basal en función del tiempo (días) para animales administrados con vehículo o TDB de HER2 (hu4D5-2C11). (TDB de HER2: 0,5 mg/kg; IV, semanal, 5 semanas).

La FIGURA 89 es un gráfico que indica el porcentaje de células CD8+CD107a+ T como una función de la concentración TDB de HER2 (hu4D5-TDB, hu4D5.91A-TDB y hu4D5.Y100A-TDB) hu4D5, como se evalúa en el análisis FACS. Las células diana eran células SKBR3; las células efectoras eran células CD8+ T; proporción de células efectoras: células diana = 3:1.

La FIGURA 90A es un gráfico que indica el porcentaje de muertes de células diana SKBR3 como una función de la concentración TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5 y SP34/hu4D5).

La FIGURA 90B es un gráfico que indica el porcentaje de muertes de células diana SKBR3 como una función de la concentración TDB de HER2 (SP34/hu4D5, 38E4c/hu4D5 y 40G5c/hu4D5).

La FIGURA 90C es un gráfico que indica el porcentaje de muertes de células diana SKBR3 como una función de la concentración TDB de HER2 (SP34/hu4D5, 38E4c/hu4D5 y

40G5c/hu4D5).

La FIGURA 91A es un gráfico que indica la curva de unión para cada una de las tres TDB de HER2 (SP34/hu4D5, 38E4c/hu4D5 y 40G5c/hu4D5) que se analizaron para unión *in vitro* con células T que expresan CD8+ CD3, como se evaluó con el análisis FACS.

La FIGURA 91B es un gráfico que indica el porcentaje de células CD8+CD69+ T como una función de la concentración TDB de HER2 (SP34/hu4D5, 38E4c/hu4D5 y 40G5c/hu4D5).

La FIGURA 92A es un gráfico que indica la curva de unión para las dos TDB de HER2 (38E4c/hu4D5 y 38E4/hu4D5) que se analizaron para unión *in vitro* con células T que expresan CD8+ CD3, como se evaluó con el análisis FACS.

La FIGURA 92B es un gráfico que indica la curva de unión para las dos TDB de HER2 (38E4c/hu4D5 y 38E4/hu4D5) que se analizaron para unión *in vitro* con células SKBR3 que expresan HER2, como se evaluó con el análisis FACS.

La FIGURA 92C es un gráfico que indica el porcentaje de muertes de células diana SKBR3 como una función de la concentración TDB de HER2 (38E4c/hu4D5 y 38E4/hu4D5), como se evaluó con el análisis FACS. Las células efectoras eran células CD8+ T humanas; proporción de células efectoras: células diana = 3:1.

La FIGURA 92D es un gráfico que indica el porcentaje de células CD8+CD69+ T como una función de la concentración TDB de HER2 (38E4c/hu4D5 y 38E4/hu4D5).

La FIGURA 93A es un gráfico que muestra el porcentaje de células CD8+CD69+Granzima B+ T como una función de concentración TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5), como se evalúa con una análisis FACS. Las células diana eran células SKBR3; las células efectoras eran células CD8+ T; proporción de células efectoras: células diana = 3:1.

La FIGURA 93B es una serie de gráficos que indican la exocitosis de los gránulos de células diana mediada por células T TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5) que se detecta con ELISA para perforina y granzimas A y B, y el porcentaje de muerte de células diana como se evalúa por la liberación de LDH. Las células diana eran células SKBR3; las células efectoras eran células PBMC; proporción de células efectoras: células diana = 30:1.

La FIGURA 93C es una serie de gráficos que indican la apoptosis de las células diana medida por células T TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5) como se mide con las actividades caspasa 3 y 7 en el Ensayo CASPASE-GLO® 3/7, apoptosis en un Ensayo de detección de muerte celular con ELISA^{plus} y liberación de LDH. Las células diana eran células SKBR3; las células efectoras eran células PBMC; proporción células efectoras: células diana = 10:1.

La FIGURA 93D es una imagen de Western blot (superior) que indica la expresión de HER2 en células 3T3 transfectadas y un gráfico (inferior) que indica el porcentaje de muerte de células diana por células T activadas como una función de concentración TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5), como se mide por la liberación de LDH. Las células diana eran Vector 3T3 y HER2 3T3; las células efectoras eran células PBMC; proporción de células efectoras: células diana = 10:1.

La FIGURA 93E es una gráfico que indica el porcentaje de muerte de células diana BT474 como una función de concentración TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5) en presencia de

trastuzumab Fab (T-Fab) o dominio extracelular HER2 soluble (ECD), como se evalúa por la liberación de LDH. Las células efectoras eran células CD8+ T; proporción de células efectoras: células diana = 5:1.

La FIGURA 93F es un gráfico que indica el porcentaje de muerte de células diana SKBR3 como una función de concentración TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5) después del agotamiento de las células CD3+ de la población celular efectora PBMC. Proporción de células efectoras: células diana = 20:1.

La FIGURA 94A es una serie de gráficos que indican el porcentaje de células CD8+CD69+ T (izquierda) y células CD8+CD107a+ T (centro) como una función de concentración TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5), como se evalúa con un análisis FACS, y el porcentaje de muerte de células diana SKBR3 como una función de concentración TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5) (derecha). Las células diana eran células SKBR3; las células efectoras eran células CD8+ T; proporción de células efectoras: células diana = 3:1.

La FIGURA 94B es una serie de gráficos que indican el porcentaje de muerte de células diana BT474 como una función de concentración TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5) (izquierda) y el porcentaje de células CD8+CD69+granzimasB+ T como una función de concentración TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5) (derecha), como se evalúa con un análisis FACS. Las células diana eran células BT474; las células efectoras eran células CD8+ T; proporción de células efectoras: células diana como se indica.

La FIGURA 95A es una serie de histogramas que muestra la expresión de CFSE en células CD8+ T en presencia de células diana SKBR3 o TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5).

La FIGURA 95B es un gráfico que muestra el cambio en veces del número de células CD8+ como una función sobre el tiempo posterior a la incubación con células diana SKBR3 y TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5), como se evalúa en un análisis FACS.

La FIGURA 95C es una serie de gráficos que muestra el cambio en veces del número de células CD8+ como una función sobre el tiempo posterior a la incubación con células diana SKBR3, TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5), y 20 ng/ml de IL-2, como se evalúa en un análisis FACS.

La FIGURA 96A es una imagen de Western blot que indica el nivel de expresión de HER2 en un panel de líneas celulares tumorales humanas.

La FIGURA 96B es un gráfico que muestra el porcentaje de muerte de células diana como una función de concentración TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5), como se evalúa por la liberación de LDH. Las células diana eran células BJAB, MDA435, MDA231, MCF7, MDA453, SKBR3 y BT474; las células efectoras eran células PBMC; proporción de células efectoras: células diana = 25:1.

La FIGURA 96C es un gráfico que muestra el porcentaje de muerte de células diana como una función de concentración TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5), como se evalúa con un análisis FACS. Las células diana eran células MCF7 y SKBR3; las células efectoras eran células PBMC; proporción de células efectoras: células diana = 20:1.

La FIGURA 96D es un gráfico que muestra el porcentaje de muerte de células diana como una función de concentración TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5), como se evalúa con un

análisis FACS. Las células diana eran células BJAB y SKBR3; las células efectoras eran células PBMC; proporción de células efectoras: células diana = 20:1.

La FIGURA 96E es un tabla que presenta el número de copia de HER2 para un panel de células diana y para cada una, el CE50 TDB de HER2 y porcentaje de ocupación de HER2 en esa concentración. Las células diana son MDA435, MDA231, MCF7, MDA453, BT474, y SKBR3.

La FIGURA 97A es un gráfico que muestra el porcentaje de muerte de células diana como una función de concentración TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5), como se evalúa por la liberación de LDH. Las células diana eran células SKBR3, HCC1569, KPL4, HCC202, JIMT1 y CALU3; las células efectoras eran células PBMC; proporción de células efectoras: células diana = 10:1.

La FIGURA 97B es un gráfico que indica el porcentaje de células diana viables como una función para la concentración de trastuzumab emtansina (T-DM1), como se evalúa con el Ensayo de viabilidad celular luminiscente CELLTITERGLO®. Las células diana eran BT474-M1 parenterales y BT474-M1 T-DM1 resistentes; las células efectoras eran células CD8+ T; proporción de células efectoras: células diana = 3:1.

La FIGURA 97C es un gráfico que muestra el porcentaje de células diana viables como concentración TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5), como se evalúa con una análisis FACS. Las células diana eran BT474-M1 parenterales y BT474-M1 T-DM1 resistentes; las células efectoras eran células CD8+ T; proporción de células efectoras: células diana = 3:1.

La FIGURA 98 es un gráfico y una tabla que muestran la farmacocinética (PK) TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5) en ratas Sprague-Dawley, como se evalúa con ELISA.

La FIGURA 99A es un gráfico que indica el volumen relativo del tumor con el paso del tiempo para el Grupo 1 (Vehículo a 0,5 mg/kg); Grupo 2 (PBMC(1) + vehículo a 0,5 mg/kg); Grupo 3 (PBMC(1) + TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5) a 0;5 mg/kg); Grupo 4 (PBMC(2) + vehículo a 0,5 mg/kg); y Grupo 5 (PBMC(2) + TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5) a 0,5 mg/kg).

La FIGURA 99B es un gráfico que indica el porcentaje de cambio en el volumen del tumor con el paso del tiempo para el Grupo 1 (Vehículo a 0,5 mg/kg); y Grupo 2 (TDB de HER2 (hu4D5/2C11) a 0,5 mg/kg).

La FIGURA 99C es un gráfico que indica el porcentaje de cambio relativo en el volumen del tumor con el paso del tiempo para el Grupo 1 (Vehículo a 0,5 mg/kg); y Grupo 2 (TDB de HER2 (hu4D5/2C11) a 0,5 mg/kg).

La FIGURA 99D es un gráfico que indica el volumen relativo del tumor con el paso del tiempo para el Grupo 1 (Vehículo a 0,5 mg/kg); y Grupo 2 (TDB de HER2 (hu4D5/2C11) a 0,5 mg/kg). Los participantes incluían tumores que eran >1000 mm^3 al comienzo del tratamiento.

La FIGURA 99E es un gráfico que indica el porcentaje de cambio en el volumen del tumor con el paso del tiempo para el Grupo 1 (TDB de HER2 controlado por el grupo CD3 (hu4D5/SP34) a 0,5 mg/kg); y el Grupo 2 (TDB de control (2C11) a 0,5 mg/kg).

La FIGURA 99F es un gráfico que indica el volumen relativo del tumor con el paso del tiempo para el Grupo 1 (Vehículo a 0,5 mg/kg); y Grupo 2 (TDB de HER2 (hu4D5/SP34) a 0,5 mg/kg).

La FIGURA 99G es un gráfico que indica el volumen relativo del tumor con el paso del tiempo para el Grupo 1 (Vehículo a 0,5 mg/kg); Grupo 2 (TDB de HER2 (hu4D5/2C11) a 0,5 mg/kg); Grupo 3 (TDB de control (2C11) a 0,5 mg/kg); y Grupo 4 (T-DM1 a 15 mg/kg).

La FIGURA 100A es un gráfico que indica el volumen relativo del tumor con el paso del tiempo para el Grupo 1 (Sin tratamiento); Grupo 2 (TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5) a 0,5 mg/kg).

La FIGURA 100B es un gráfico que indica el volumen relativo del tumor con el paso del tiempo para el Grupo 1 (Vehículo a 0,5 mg/kg); Grupo 2 (PBMC(3) + Vehículo a 0,5 mg/kg); y Grupo 3 (PBMC(3) + TDB de control (2C11) a 0,5 mg/kg).

La FIGURA 101A es un gráfico que indica la afinidad de unión para el anticuerpo CD3-UCHT1 evaluado para unión *in vitro* al CD3 humano en células T humanas, células T TG CD3 y células T BALB/c, como se evalúa en el análisis FACS.

La FIGURA 101B es un gráfico que indica la afinidad de unión para el anticuerpo CD3-2C11 evaluado para unión *in vitro* al CD3 de ratones en células T TG CD3 y células T BALB/c, como se evalúa en el análisis FACS.

La FIGURA 102A es un gráfico que muestra el porcentaje de muerte de células diana CT26-HER2 como una función de concentración TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5), como se evalúa con una análisis FACS. Las células efectoras eran células T aisladas de sangre humana periférica, células esplénicas transgénicas huCD3 y células T esplénicas BALB/c.

La FIGURA 102B es un gráfico que muestra el porcentaje de muerte de células diana CT26-HER2 como una función de concentración TDB de HER2 (hu4D5/2C11), como se evalúa con una análisis FACS. Las células efectoras eran células T aisladas de sangre humana periférica, células esplénicas transgénicas huCD3 y células T esplénicas BALB/c.

La FIGURA 103 es un gráfico que indica el volumen relativo del tumor con el paso del tiempo para el Grupo 1 (Vehículo a 0,5 mg/kg); y Grupo 2 (TDB de HER2 (hu4D5/SP34) a 0,5 mg/kg).

La FIGURA 104 es un gráfico que muestra las curvas de unión para cada una de las tres TBD de LYPD1 evaluadas para unión *in vitro* a células T que expresan CD8+ CD3.

La FIGURA 105 es un gráfico que indica el porcentaje de muerte de células diana OVCAR3.Luc como una función de la concentración TDB de LYPD1.

La FIGURA 106 es un gráfico que muestra el porcentaje de células CD8+CD69+ (izquierda) y CD8+CD25+ (derecha) T como una función de concentración TDB de LYPD1, como se evalúa con un análisis FACS. Las células diana eran células OVCAR3.Luc; proporción de células efectoras: células diana = 3:1.

La FIGURA 107 muestra las secuencias de aminoácidos del dominio variable (superior) de la cadena liviana y el dominio variable (inferior) de la cadena pesada del anticuerpo anti RET 41205.v6.

La FIGURA 108A es un gráfico que muestra el volumen del tumor (mm^3) como una función del tiempo (días) para el Grupo 1 (vehículo, qwx3, IV; n=9); el Grupo 2 (CD20 TDB (2H7-mu2C11), 0,5 mg/kg, qwx3, IV; n=9); el Grupo 3 (anti-PD1 (mu8F11 DANA), 10 mg/kg, tiwx3, IP; n=9) y el Grupo 4 (anti-PD1 (mu8F11 DANA), 10 mg/kg, tiwx3, IP; CD20 TDB (2H7-mu2C11), 0,5 mg/kg, qwx3, IV; n=9).

La FIGURA 108B es un gráfico que muestra el volumen del tumor (mm^3) como una función del tiempo (días) para el Grupo 1 (vehículo, qwx3, IV; n=9); el Grupo 2 (CD20 TDB (2H7-mu2C11), 0,5 mg/kg, qwx3, IV; n=9); el Grupo 3 (anti-PD1 (mu8F11 DANA), 10 mg/kg, tiwx3, IP; n=9) y el Grupo 4 (anti-PD1 (mu8F11 DANA), 10 mg/kg, tiwx3, IP+ CD20 TDB (2H7-mu2C11), 0,5 mg/kg, qwx3, IV; n=9). La línea sólida en negrita representa el volumen ajustado del tumor para el grupo especificado.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS VERSIONES DE LA INVENCIÓN

I. DEFINICIONES

El término “alrededor de” a partir del presente se refiere al rango de error normal para el valor respectivo de fácil conocimiento para las personas entrenadas en el campo técnico. La referencia a “alrededor de” para un valor o parámetro a partir del presente incluye (y describe) las versiones que se relacionan directamente a ese valor o parámetro en sí.

Para los propósitos del presente, un “marco humano de selector” es un marco que comprende la secuencia de aminoácidos de un marco de dominio variable (VL) de una cadena ligera o un marco de dominio variable (VH) de una cadena pesada que se deriva del marco de inmunoglobulina humana o un marco de consenso humano, como se define a continuación. Un marco humano de selector “que se deriva” de un marco de inmunoglobuna humana o un marco de consenso humano incluye la misma secuencia de aminoácidos que estos, o puede contener cambios en la secuencia de aminoácidos. En algunas versiones, el número de cambios en los aminoácidos es de 10 o menos, 9 o menos, 8 o menos, 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos, o 2 o menos. En algunas versiones, el marco humano de selector VL tiene una secuencia idéntica al marco de inmunoglubina humana VL o al marco de consenso humano VL.

La afinidad se refiere a la concentración de la suma total de las interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de la molécula (p. ej., un anticuerpo) y su par de unión (p. ej., un antígeno). A menos que se indique lo contrario, a partir del presente, “afinidad de unión” hace referencia a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre los miembros de un par de unión (p. ej. anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su par Y puede representarse generalmente con la constante de disociación (Kd). La afinidad puede medirse mediante métodos comunes conocidos en la materia, incluidos aquellos que se describen en el presente. Las representaciones ilustrativas y ejemplares específicas para medir la afinidad de la unión se describen a continuación.

Un anticuerpo “madurado por afinidad” hace referencia a un anticuerpo con una o más alteraciones en una o más regiones hipervariables (HVR), en comparación con un anticuerpo principal que no posee dichas alteraciones, alteraciones que generan una mejora en la afinidad del anticuerpo para el antígeno.

Los términos “anticuerpo contra CD3” y “un anticuerpo que se une a CD3” hacen referencia a un anticuerpo que es capaz de unirse a CD3 con la afinidad suficiente para que el anticuerpo resulte útil como agente de diagnóstico o terapéutico a la hora de dirigirse a CD3. En una representación, el grado de unión de un anticuerpo contra CD3 a una proteína no relacionada distinta de CD3 es menos de aproximadamente el 10% de la unión del anticuerpo a CD3 según la medición, p. ej.: mediante un ensayo de radioinmunología (RIA). En determinadas representaciones, un anticuerpo que se une a CD3 tiene una constante de disociación (Kd) de ≤1μM, ≤100 nM, ≤10 nM, ≤1 nM, ≤0.1 nM, ≤0.01 nM, o ≤0.001 nM (p. ej.: 10^{-8} M o menos, p. ej.: de 10^{-8} M a 10^{-13} M, p. ej.: de 10^{-9} M a 10^{-13} M). En determinadas representaciones, un anticuerpo contra CD3 se une a un epítopo de CD3 que se conserva entre CD3 de distintas especies.

El término “anticuerpo” se utiliza en el presente en el sentido más amplio y abarca varias estructuras de anticuerpos, incluidos entre otros los anticuerpos monoclonales, los anticuerpos policlonales, los anticuerpos multiespecíficos (p. ej.: anticuerpos biespecíficos) y los fragmentos de anticuerpos siempre y cuando exhiban la actividad deseada de unión al antígeno.

Un “fragmento de anticuerpo” hace referencia a una molécula distinta a un anticuerpo intacto que abarca una porción de un anticuerpo intacto que se une al antígeno al cual se une el anticuerpo intacto. Algunos ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen entre otros a los siguientes: Fv, Fab, Fab’, Fab’-SH, $F(ab')_2$; diacuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpos de cadena única (p. ej.: scFv) y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

Por “dominio de unión” se implica una parte de un compuesto o una molécula que se une de manera específica a un epítopo, antígeno, ligando o receptor objetivo. Los dominios de unión incluyen entre otros a anticuerpos (p. ej.: monoclonales, policlonales, recombinantes, humanizados y quiméricos), fragmentos de anticuerpos o porciones de ellos (p. ej.: fragmentos de Fab, Fab’2, anticuerpos scFv, SMIP, anticuerpos de dominio, diacuerpos, minicuerpos, scFv-Fc, aficuerpos, nanocuerpos y dominios de anticuerpos VH o VL), receptores, ligandos, aptámeros y otras moléculas que tengan un colaborador de unión identificado.

Un “agente quimioterapéutico” es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen a los agentes alquilantes como la tiotepa y la ciclosfosfamida (CYTOXAN®); los sulfonatos de alquilo como el busulfán, el improsulfán y el piposulfán; las aziridinas como la benzodopa, la carboquona, la meturedopa y la uredopa; las etileniminas y metilamelaminas incluida la altretamina, la trietilenomelamina, la trietilenofosforamida, la trietilenotiofosforamida y la trimetilomelamina; las acetogeninas (especialmente la bullatacina y la bullatacinona); el

delta-9-tetrahidrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); la beta-lapachona; el lapachol; las colchicinas; el ácido betulínico; una camptotecina (incluido el análogo sintético topotecán (HYCAMTIN®), la CPT-11 (irinotecán, CAMPTOSAR®), la acetilcamptotecina, escopolectina y 9-aminocamptotecina); la brioestatina; la caliestatina; CC-1065 (incluidos sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); la podofilotoxina; el ácido podofilínico; la teniposida; las criptoficinas (especialmente la criptoficina 1 y la criptoficina 8); la dolastatina; la duocarmicina (incluidos los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); la eleuterobina; la pancratiestatina; una sarcodictina; la espongiestatina; las mostazas de nitrógeno como el clorambucil, la clornafazina, la clorofosfamida, la estramustina, la ifosfamida, la mecloretamina, el clorhidrato de óxido de mecloretamina, el melfalán, la novembicina, la fenesterina, la prednimustina, la trofosfamida, la mostaza de uracilo; las nitroso úreas como la carmustina, la clorozotocina, la fotemustina, la lomustina, la nimustina y la ranimnustina; los antibióticos como los antibióticos de enedina (p. ej.: la calicheamicina, especialmente la calicheamicina gamma 1I y la calicheamicina omega Il (consulte, p. ej.: Nicolaou y otros, *Angew. Chem Intl. Ed. Engl.*, 33: 183-186 (1994)); el CDP323, un inhibidor oral de la integrina alfa-4, la dinemicina, incluida la dinemicina A; una espiramicina, como también el cromóforo de neocarzinoestatina y los cromóforos de antibióticos de la cromoproteína enediína relacionados), las aclacinomisinas, la actinomicina, la autramicina, la azaserina, las bleomicinas, la cactinomicina, la carabacina, la caminomicina, la carzinofilina, las cromomicinas, la dactinomicina, la daunorubicina, la detorubicina, la 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, la doxorubicina (incluidas ADRIAMYCIN®, morfolino-doxorubicina, cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina, inyección de liposoma de clorhidrato de doxorubicina (DOXIL®), doxorubicina liposomal TLC D-99 (MYOCET®), doxorubicina liposomal peglilada (CAELYX®) y deoxidoxorubicina), la epirubicina, la esorubicina, la idarubicina, la marcelomicina, las mitomicinas como la mitomicina C, el ácido micofenólico, la nogalamicina, las olivomicinas, la peplomicina, la porfiromicina, la puromicina, la quelamicina, la rodorubicina, la estreptonigrina, la estreptozocina, la turbecidina, el ubenimex, la zinoestatina, la zorubicina; los antimetabolitos como el metotrexato, la gemcitabina (GEMZAR®), el tegafur (UFTORAL®), la capecitabina (XELODA®), una epotilona y el 5-fluorouracilo (5-FU); la combrestatina; los análogos de ácido fólico como la denopterina, el metotrexato, la pteropterina, el trimetrexato; los análogos de purina como la fludarabina, la 6-mercaptopurina, la tiamiprina, la tioguanina; los análogos de pirimidina como la ancitabina, la azacitidina, la 6-azauridina, el carmofuro, la citarabina, la dideoxiuridina, la doxifluridina, la enocitabina, la fluxoridina; los andrógenos como la calusterona, el propionato de dromostanolona, el epitiostanol, el mepitiostano, la testolactona; los antiadrenales como la aminoglutetimida, el mitotano, el trilostano; el reabastecedor de ácido fólico como el ácido frolínico, la aceglatona; el glicósido de aldofosfamida; el ácido aminolevulínico; el eniluracilo; la amsacrina; el bestrabucilo, el bisantreno; el edatraxato; la defofamina; la demecolcina; la diaziquona; el elformitina; el acetato de eliptinio; una epotilona; el

etoglúcido; el nitrato de galio; la hidroxiúrea; el lentinano; la lonidainina; los maitansinoides como la maitansina y las ansamitocinas; la mitoguazona; la mitoxantrona; el mopidanmol; la nitraerina; la pentoestatina; el fenamet, la pirarubicina; la losoxantrona; la 2-etilhidrazida; la procarbazina; el complejo de polisacáridos PSK® (JHS Natural Products, Eugene, Oreg.); el razoxano; la rizoxina; el sizofurano; el espirogermanio; el ácido tenuazónico; la triaziquona; la 2,2",2"-triclorotrietilamina; los tricotecenos (especialmente la toxina T-2, la verracurina A, la roridina A y la anguidina); el uretano; la vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®); la dacarbazina; la manomustina; el mitobronitol; el mitolactol; el pipobromán; la gacitosina; la arabinosida ("Ara-C"); la tiotepa; el taxoide, p. ej: el paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), la fórmula de nanopartículas de paclitaxel diseñadas a partir de la albúmina (ABRAXANE™) y el docetaxel (TAXOTERE®, Rhome-Poulene Rorer, Antony, Francia); el cloranbucilo; la 6-tioguanina; la mercaptopurina; el metotrexato; los agentes del platino como el cisplatino, el oxaliplatino (p. ej.: ELOXATIN®) y el carboplatino; las vincas, que evitan la polimerización de la tubulina de los microtúbulos en formación, incluida la vinblastina (VELBAN®), la vincristina (ONCOVIN®), la vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®) y la vinorelbina (NAVELBINE®); el etopósido (VP-16); la ifosfamida; la mitoxantrona; la leucovorina; la novantrona; el edatrexato; la daunomicina; la aminopterina; el ibandronato; el inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; la difluorometilornitina (DMFO); los retinoides como el ácido retinóico, incluido el bexaroteno (TARGRETIN®); los bisfosfonatos como el clodronato (por ejemplo, BONEFOS® u OSTAC®), el etidronato (DIDROCAL®), el NE-58095, el ácido zoledrónico/zoledronato (ZOMETA®), el alendronato (FOSAMAX®), el pamidronato (AREDIA®), el tiludronato (SKELID®) o el risedronato (ACTONEL®); la troxacitabina (un análogo de la citosina nucleósida 1,3-dioxolano); los oligonucleótidos antisentido, especialmente aquellos que inhiben la expresión de los genes que se encuentran en las rutas de señalización, implicados en la proliferación de células aberrantes, como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R) (p. ej.: el erlotinib (Tarceva™)); y el VEGF-A que reduce la proliferación celular; las vacunas como la vacuna THERATOPE® y las vacunas de terapias genéticas, por ejemplo, la vacuna ALLOVECTIN®, la vacuna LEUVECTIN® y la vacuna VAXID®; el inhibidor de la topoisomerasa 1 (p. ej.: LURTOTECAN®); el rmRH (p. ej.: ABARELIX®); el BAY439006 (sorafenib; Bayer); el SU-11248 (sunitinib, SUTENT®, Pfizer); la perifosina, el inhibidor de COX-2 (p. ej.: celecoxib o etoricoxib), el inhibidor del proteosoma (p. ej.: PS341); el bortezomib (VELCADE®); el CCI-779; el tipifarnib (R11577); el orafenib, el ABT510; el inhibidor de Bcl-2, como el sodio oblimersen (GENASENSE®); la pixantrona; los inhibidores de EGFR; los inhibidores de la tirosina quinasa; los inhibidores de la serina-treonina quinasa como la rapamicina (sirolimus, RAPAMUNE®); los inhibidores de la farnesiltransferasa como el lonafarnib (SCH 6636, SARASAR™) y las sales, los ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores que sean farmacéuticamente aceptables; como también las combinaciones de dos o más de los anteriores como el CHOP, una

abreviatura para un tratamiento combinado de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisolona; y FOLFOX, una abreviatura para un régimen de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATIN™) combinado con 5-FU y leucovorina, y las sales, los ácidos o los derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores, como también las combinaciones de dos o más de los anteriores.

Los agentes quimioterapéuticos como se definen en el presente incluyen a los "agentes antihormonales" o "terapéuticos endocrinos" que actúan para regular, reducir, bloquear o inhibir los efectos de las hormonas que pueden fomentar el crecimiento del cáncer. Puede tratarse de hormonas en sí mismas, incluidas entre otras: antiestrógenos y moduladores selectivos del receptor del estrógeno (SERM), incluidos, por ejemplo, el tamoxifeno (incluido el tamoxifeno NOLVADEX®), el raloxifeno, el droloxifeno, el 4-hidroxitamoxifeno, el trioxifeno, el keoxifeno, el LY117018, la onapristona y el FARESTON.cndot.toremifeno; los inhibidores de la aromatasa que inhiben la enzima aromatasa, que regula la producción de estrógeno en las glándulas de adrenalina, como, por ejemplo, los 4(5)-imidazoles, la aminoglutetimida, el acetato de megestrol MEGASE®, el exemestano AROMASIN®, el formestanio, el fadrozol, el vorozol RIVISOR®, el letrozol FEMARA® y el anastrozol ARIMIDEX®; y los antiandrógenos como la flutamida, la nilutamida, la bicalutamida, la leuprolida y la goserelina; como también la troxacitabina (un análogo de la citosina 1,3-dioxolano nucleósida); los oligonucleósidos antisentido, especialmente aquellos que inhiben la expresión de genes en las rutas de señalización implicadas en la proliferación de células aberrantes, como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf y H-Ras; las ribozimas como un inhibidor de la expresión de VEGF (p. ej.: ribozima ANGIOZYME®) y un inhibidor de la expresión de HER2; las vacunas como las vacunas de terapia genética, por ejemplo, la vacuna ALLOVECTIN®, la vacuna LEUVECTIN® y la vacuna VAXID®; PROLEUKIN® rIL-2; el inhibidor de la topoisomerasa 1 LURTOTECAN®; ABARELIX® rmRH; la vinorelbina y las espiramicinas (consulte la Pat. de los EE. UU. N.° 4,675,187), y las sales, los ácidos y los derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores; como también las combinaciones de dos o más de los anteriores.

El término anticuerpo "quimérico" hace referencia a un anticuerpo en el cual una porción de la cadena pesada o liviana se deriva de una fuente o especie en particular, mientras que el resto de la cadena pesada o liviana se deriva de una fuente o especie diferente.

El término "grupo de diferenciación 3" o "CD3", como se utiliza en el presente, hace referencia a cualquier CD3 nativo de cualquier fuente vertebrada, incluidos los mamíferos como los primates (p. ej.: humanos) y los roedores (p. ej.: ratones y ratas), a menos que se indique lo contrario, incluidas, por ejemplo, las cadenas CD3ε, CD3γ, CD3α y CD3β. El término abarca CD3 no procesados, de "longitud completa" (p. ej.: CD3ε o CD3γ no procesados o no modificados), como también cualquier forma de CD3 que surge como resultado del procesamiento en la célula. El término también abarca las variantes de CD3 de ocurrencia natural, incluidas, por ejemplo, las variantes de unión o las variantes alélicas. El CD3 incluye, por ejemplo, la proteína CD3ε humana (NCBI RefSeq

No. NP_000724), que tiene 207 aminoácidos de longitud y la proteína CD3γ humana (NCBI RefSeq No. NP_000064), que tiene 182 aminoácidos de longitud.

La "clase" de un anticuerpo hace referencia al tipo de dominio constante o región constante que posee su cadena pesada. Existen cinco clases principales de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), p. ej.: IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4, IgA_1 e IgA_2. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan α, δ, ε, γ y μ, respectivamente.

Se comprende que los aspectos y las representaciones de la invención descritos en el presente incluyen el "abarcamiento", "la consistencia", y la "consistencia esencialmente de" aspectos y representaciones.

El término "agente citotóxico" como se utiliza en el presente hace referencia a una sustancia que inhibe o evita la función celular o bien causa la muerte o destrucción celular. Los agentes citotóxicos incluyen, entre otros, a los isotopos radioactivos (p. ej.: At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32}, Pb^{212} y a los isotopos radioactivos de Lu); agentes o medicamentos quimioterapéuticos (p. ej.: metotrexato, adriamicina, alcaloides de vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorubicina, melfalán, mitomicina C, clorambucilo, daunorubicina u otros agentes interalantes); agentes inhibitorios del crecimiento; enzimas y fragmentos de los anteriores como enzimas nucleolíticas; antibióticos; toxinas como toxinas de moléculas pequeñas o toxinas enzimáticamente activas de origen bacterial, fúngico, vegetal o animal, incluidos fragmentos o variantes de las anteriores; y los varios agentes antitumorales o anticancerígenos divulgados a continuación.

Un "trastorno" es cualquier afección que se beneficiaría con el tratamiento, incluidos, entre otros, los trastornos o las enfermedades crónicas y agudas que incluyen a aquellas afecciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión.

Los términos "trastorno proliferativo celular" y "trastorno proliferativo" hacen referencia a trastornos que están relacionados con algún grado de proliferación celular anormal. En una representación, el trastorno proliferativo celular es cáncer. En una representación, el trastorno proliferativo celular es un tumor.

Los términos "cáncer" y "cancerígeno" hacen referencia a, o describen la afección fisiológica de los mamíferos que suele estar caracterizada por un crecimiento celular incontrolado. Algunos ejemplos de cánceres incluyen entre otros, al carcinoma, al linfoma, al blastoma, al sarcoma y a la leucemia o las malignidades linfáticas. Ejemplos más concretos de dichos cánceres incluyen, entre otros, al cáncer de células escamosas (*p. ej.:* cáncer de células escamosas epiteliales), al cáncer de pulmón, incluido el cáncer de pulmón de células pequeñas, al cáncer de pulmon de células no pequeñas, al adenocarcinoma de pulmón y al carcinoma escamoso de pulmón, al cáncer peritoneal, al cáncer hepatocelular, al cáncer gástrico o de estómago, que incluye al cáncer gastrointestinal y al cáncer estromal gastrointestinal, al cáncer pancreático, al glioblastoma, al cáncer cervical, al cáncer de ovarios, al cáncer de hígado, al cáncer de

vejiga, al cáncer de vías urinarias, al hepatoma, al cáncer de mama, al cáncer de colon, al cáncer rectal, al cáncer colorectal, al cáncer endometrial o carcinoma uterino, al carcinoma de glándulas salivares, al cáncer de riñón o renal, al cáncer de próstata, al cáncer de vulva, al cáncer de tiroides, al carcinoma hepático, al carcinoma anal, al carcinoma peneano, al melanoma, al melanoma de esparcimiento superficial, al melanoma de léntigo maligno, a los melanomas lentiginoso acral, a los melanomas nodulares, al mieloma múltiple y al linfoma de células B (incluido el linfoma de bajo grado/no Hodgkin folicular (NHL); NHL linfocítico pequeño (SL); de grado intermedio/NHL folicular; NHL difuso de grado intermedio; NHL inmunoblástico de alto grado; NHL linfoblástico de alto grado; NHL de células no adheridas pequeñas de alto grado; NHL de enfermedad voluminosa; linfoma de células del manto; linfoma relacionado con el SIDA; y Macroglobulinemia de Waldenstrom); leucemia linfocítico crónico (CLL); leucemia linfoblástica aguda (ALL); leucemia de células capilares; leucemia mieloblástica crónica; y trastorno linfoproliferativo posterior a transplantes (PTLD), como también proliferación vascular anormal asociada con facomatosis, edema (como los que están asociados con tumores cerebrales), síndrome de Meigs, cáncer de cerebro, como también cáncer de cabeza y cuello, como también las metástasis asociadas. En determinadas representaciones, los cánceres que son sensibles al tratamiento con los anticuerpos de la invención incluyen al cáncer de mama, al cáncer colorectal, al cáncer rectal, al cáncer de pulmón de células no pequeñas, al glioblastoma, al linfoma no Hodgkins (NHL), al cáncer de células renales, al cáncer de próstata, al cáncer de hígado, al cáncer pancreático, al carcinoma de tejidos blandos, al sarcoma de Kaposi, al carcinoma carcinoide, al cáncer de cabeza y cuello, al cáncer de ovarios, al mesotelioma y al mieloma múltiple. En algunas representaciones, el cáncer se selecciona entre: cáncer de pulmón de células pequeñas, gliblastoma, neuroblastoma, melanoma, carcinoma de mama, cáncer gástrico, cáncer colorectal (CRC) y carcinoma hepatocelular. De todos modos, en algunas representaciones, el cáncer se selecciona entre: cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer colorectal, glioblastoma y carcinoma de mama, incluidas las formas metastásicas de dichos cánceres. En otras representaciones, el cáncer se seleccionó de una clase de cánceres de células B maduras excluido el Linfoma de Hodgkin pero incluido el linfoma de células B semejantes a las del centro germinal (GCB) DLBCL, linfoma de células semejantes a la célula B activada (ABC) DLBCL, linfoma folicular (FL), linfoma de células de manto (MCL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfoide crónica (CLL), linfoma de zona marginal (MZL), leucemia linfocítica de célula pequeña (SLL), linfoma linfoplasmocítico (LL), macroglobulinemia de Waldenstrom (WM), linfoma del sistema nervioso central (CNSL), linfoma de Burkitt (BL), leucemia prolinfocítica de células B, linfoma esplénico de zona marginal, leucemia de células capilares, linfoma o leucemia esplénico, inclasificable, linfoma esplénico difuso de linfocitos pequeños de pulpa roja, variante de leucemia de células capilares, macroglobulinemia de Waldenström, enfermedades de cadenas pesadas, enfermedad de cadenas alfa, enfermedad de cadenas gamma, enfermedad de cadenas μ, mieloma de

células plasmáticas, plasmocitoma óseo solitario, plasmocitoma extraóseo, linfoma de zona marginal extranodal de tejido linfoide asociado a mucosa (linfoma MALT), linfoma de zona marginal nodal, linfoma de zona marginal nodal pediátrico, linfoma folicular pediátrico, linfoma primario cutáneo de células del centro folicular, linfoma de células grandes B rico en células T/ histiocitos, linfoma DLBCL primario del sistema nervioso central, linfoma DLBCL cutáneo primario, linfoma tipo pierna, linfoma DLCBCL difuso de células B grandes positivo al virus de Epstein-Barr del anciano, DLBCL asociado con la inflamación crónica, granulomatosis linfomatoide, linfoma primario mediastinal de células B grandes (tímico), linfoma de células B grandes intravascular, linfoma de células B grandes positivo al ALK, linfoma plasmoblástico, linfoma de células B grandes tras enfermedad de Castleman multicéntrica asociada a infección por virus HHV8, linfoma primario de efusión: linfoma de células B, inclasificable, con características intermedias entre linfoma difuso de células B grandes y linfoma de Burkitt, y linfoma de células B, inclasificable, con características intermedias entre linfoma difuso de células B grandes y linfoma clásico de Hodgkin.

El término “tumor”, como se utiliza en el presente, hace referencia a todo crecimiento y proliferación de células neoplásicas, ya sea maligno o benigno, y a todas las células y los tejidos precancerosos y cancerosos. Los términos “cáncer”, “cancerígeno”, “trastorno proliferativo celular”, “trastorno proliferativo” y “tumor” no se excluyen el uno al otro según la referencia del presente.

El término “antígeno del tumor”, como se utiliza en el presente, puede comprenderse como aquellos antígenos que se presentan en las células tumorales. Estos antígenos pueden presentarse en la superficie celular con una parte extracelular, que con frecuencia se combina con una parte transmembranosa y citoplasmática de la molécula. Estos antígenos en ocasiones pueden presentarse solo mediante células tumorales y nunca mediante las células normales. Los antígenos del tumor pueden expresarse exclusivamente en las células tumorales o pueden representar una mutación específica del tumor en comparación con las células normales. En este caso, se denominan antígenos específicos del tumor. Son más comunes los antígenos del tumor que se presentan mediante células tumorales y células normales, y estos se denominan antígenos asociados con el tumor. Estos antígenos asociados con el tumor pueden sobreexpresarse en comparación con las células normales o son accesibles para unirse a anticuerpos en células tumorales debido a la estructura menos compacta del tejido del tumor en comparación con el tejido normal. En un aspecto, el antígeno del tumor se selecciona entre aquellos expuestos en la Tabla 1 a continuación.

Las “funciones del efector” hacen referencia a las actividades biológicas atribuíbles a la región Fc de un anticuerpo, que varían según el isotipo del anticuerpo. Algunos ejemplos de funciones del efector del anticuerpo incluyen: Unión a C1q y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC); unión al receptor de Fc; citotoxicidad mediada por célula dependiente del anticuerpo (ADCC); fagocitosis; regulación descendente de los receptores de la superficie celular (p. ej.: receptor de células B); y activación de células B.

Una “cantidad efectiva” de un compuesto, por ejemplo, un anticuerpo contra CD3 de la invención o un compuesto (p. ej.: compuesto farmacéutico) de este, es al menos la cantidad mínima necesaria para lograr el resultado terapéutico o profiláctico deseado, como una mejora o prevención medible de un trastorno en particular (p. ej.: un trastorno proliferativo celular, p. ej.: el cáncer). Una cantidad efectiva en el presente puede variar según factores como la etapa de la enfermedad, la edad, el sexo, el peso del paciente y la capacidad del anticuerpo para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad efectiva también es una cantidad en la cual cualquier efecto tóxico o perjudicial del tratamiento sea superado por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Con fines profilácticos, los resultados beneficiosos o deseados incluyen resultados como la eliminación o reducción del riesgo, la disminución de la gravedad o el retraso en la aparición de la enfermedad, incluidos los síntomas bioquímicos, histológicos o conductuales de la enfermedad, sus complicaciones y los fenotipos patológicos intermedios que se presentan durante el desarrollo de la enfermedad. Con fines terapéuticos, los resultados beneficiosos o deseados incluyen los resultados clínicos como la reducción de uno o más síntomas causados por la enfermedad, el aumento de la calidad de vida de quienes sufren la enfermedad, la disminución en la dosis de otros medicamentos necesarios para tratar la enfermedad, la mejora en el efecto de otro medicamento como en la selección de ruta, el retraso en el progreso de la enfermedad o la prolongación de la supervivencia. En el caso del cáncer o el tumor, una cantidad efectiva del medicamento puede tener efecto a la hora de reducir la cantidad de células cancerígenas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (es decir, lentificar en alguna medida o deseablemente detener) la infiltración de células cancerígenas en los órganos periféricos; inhibir (es decir, lentificar en alguna medida y deseablemente detener) la metástasis tumoral; inhibiendo en alguna medida el crecimiento del tumor; o aliviar en alguna medida uno o más de los síntomas relacionados con el trastorno. Una cantidad efectiva puede administrarse en una o más administraciones. Para los fines de esta invención, una cantidad efectiva del medicamento, compuesto o compuesto farmacéutico es una cantidad suficiente para lograr el tratamiento profiláctico o terapéutico ya sea de manera directa o indirecta. Como se comprende en el contexto clínico, una cantidad efectiva de un medicamento, compuesto o compuesto farmacéutico puede o no lograrse en conjunto con otro medicamento, compuesto o compuesto farmacéutico. De esta manera, una “cantidad efectiva” puede considerarse en el contexto de la administración de un agente terapéutico o más, y un agente solo puede considerarse como administrado en una cantidad efectiva si, en conjunto con uno o más agentes, es posible o se logra obtener un resultado deseable.

El término “región Fc” en el presente se utiliza para definir una región del punto terminal C de una cadena pesada de inmunoglobulina que contiene al menos una porción de la región constante. El término incluye las regiones Fc de secuencia nativa y las regiones Fc variantes. En una representación, una región Fc de una cadena pesada de IgG humana se extiende desde Cys226 o bien desde Pro230, hasta el miembro carboxilo

terminal de la cadena pesada. No obstante, la lisina del punto terminal C (Lys447) de la región Fc puede o no estar presente. A menos que se especifique lo contrario en el presente, la numeración de los residuos de aminoácidos en la región Fc o la región constante se realiza según el sistema de numeración de la UE, también denominado índice de la UE, como se describe en Kabat y otros, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (Secuencias de proteínas de interés inmunológico), 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health (5.ta edición, Servicio de Salud Pública, Institutos Nacionales de Salud), Bethesda, MD, 1991.

El "marco" o "FR" hace referencia a los residuos de dominio variable distintos a los residuos de la región hipervariable (HVR). El FR de un dominio variable por lo general consta de cuatro dominios FR: FR1, FR2, FR3 y FR4. Por consiguiente, las secuencias HVR y FR por lo general aparecen en la siguiente secuencia en VH (o VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

Los términos "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto" y "anticuerpo entero" se utilizan en el presente de manera intercambiable para hacer referencia a un anticuerpo que tiene una estructura sustancialmente similar a la estructura de un anticuerpo nativo o que tiene cadenas pesadas que contienen una región Fc como la definida en el presente.

Cuando se utiliza en el presente, un "agente inhibidor del crecimiento" hace referencia a un compuesto o una composición que inhibe el crecimiento de una célula, ya sea *in vitro* o *in vivo*. En una representación, el agente inhibidor del crecimiento es un anticuerpo inhibidor del crecimiento que evita o reduce la proliferación de una célula que expresa un antígeno al cual se une el anticuerpo. En otra representación, el agente inhibidor del crecimento puede ser uno que reduzca significativamente el porcentaje de células que se encuentran en la etapa S. Los ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen a agentes que bloquean el progreso del ciclo celular (en un lugar distinto a la etapa S), como los agentes que inducen la detención de G1 y la detención de la etapa M. Algunos bloqueadores clásicos de la etapa M incluyen a las vincas (vincristina y vinblastina), los taxanos y los inhibidores de la topoisomerasa II como la doxorubicina, la epirubicina, la daunorubicina, el etopósido y la bleomicina. Aquellos agentes que detienen G1 también se derraman hacia la detención de la etapa S, por ejemplo, los agentes alkilantes del ADN como el tamoxifeno, la prednisona, la dacarbazina, la mecloretamina, el cisplatino, el metotrexato, el 5-fluorouracilo y la ara-C. Puede encontrar más información en Mendelsohn e Israel, eds., The Molecular Basis of Cancer (La base molecular del cáncer), Chapter 1, entitled "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" (Capítulo 1, titulado "Regulación del ciclo celular, oncogenes y medicamentos antineoplásicos) de Murakami y otros. (W.B. Saunders, Filadelfia, 1995), p. ej.: pág. 13. Los taxanos (paclitaxel y docetaxel) son medicamentos contra el cáncer que se derivan del árbol de tejo. El docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), derivado del tejo europeo, es un análogo semisintético del paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). El paclitaxel y el docetaxel fomentan la formación de microtúbulos desde los dímeros de tubulina y

estabilizan los microtúbulos al evitar la depolimerización, que provoca la inhibidición de la mitosis celular.

El término cáncer "positivo para HER2" abarca las células de cáncer que tienen niveles de HER2 superiores a los normales. Los ejemplos de cáncer positivo para HER2 incluyen al cáncer de mama positivo para HER2 y al cáncer gástrico positivo para HER2. Opcionalmente, el cáncer positivo para HER2 tiene un puntaje inmunohistoquímico (IHC) de 2+ o 3+ o una hibridización in situ (ISH) con un cociente de amplificación 2.0.

Los términos "célula huésped", "línea celular huésped" y "cultivo celular huésped" se utilizan de manera intercambiable y hacen referencia a las células en las cuales se ha introducido ácido nucléico exógeno, incluida la progenie de dichas células. Las células huésped incluyen a "transformantes" y "células transformadas", que incluyen a la célula transformada principal y a la progenie derivada de allí sin importar la cantidad de pasajes. Es posible que la progenie no sea completamente idéntica en cuanto al contenido de ácido nucléico con respecto a una célula progenitora, sino que puede contener mutaciones. Una progenie mutante que tiene la misma función o actividad biológica que la cribada o seleccionada en la célula transformada originalmente se incluye en el presente.

Un "anticuerpo humano" es un anticuerpo que posee una secuencia de aminoácidos que se corresponde a aquella de un anticuerpo producido por un humano o una célula humana o derivada de una fuente no humana que utiliza repertorios de anticuerpos humanos u otras secuencias de codificación de anticuerpos humanos. Esta definición de un anticuerpo humano excluye de manera específica a un anticuerpo humanizado que consta de residuos de uniones antigénicas no humanas. Los anticuerpos humanos pueden producirse mediante el uso de varias técnicas conocidas en la materia, incluidas las genotecas de exposición en fagos. Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks *y otros.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991). También disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos se encuentran los métodos descritos en Cole *y otros*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy (Anticuerpos monoclonales y tratamiento del cáncer)*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner *y otros*, *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991). Consulte también van Dijk y van de Winkel, *Curr. Opin. Farmacol.*, 5: 368-74 (2001). Los anticuerpos humanos pueden prepararse mediante la administración de un antígeno a un animal transgénico que ha sido modificado para producir dichos anticuerpos en respuesta a un desafío antigénico, pero cuyos loci endógenos han sido desactivados, p. ej.: xenoratones inmunizados (consulte, p. ej.: las Patentes de los EE. UU. N.° 6.075.181 y 6.150.584 con respecto a la tecnología XENOMOUSE™). Consulte también, por ejemplo, Li *y otros*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006) con respecto a los anticuerpos humanos generados mediante tecnología de hibridoma de células B humanas.

Un "marco de consenso humano" es un marco que representa los residuos de aminoácidos de ocurrencia más común en una selección de secuencias marco VL o VH de inmunoglobulina humana. Por lo general, la selección de secuencias VL o VH de

inmunoglobulina humana proviene de un subgrupo de secuencias de dominio variable. Por lo general, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como en Kabat y otros, *Sequences of Proteins of Immunological Interest (Secuencias de proteínas de interés inmunológico)*, Fifth Edition, NIH Publication (Quinta edición, Publicación del NIH) 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3. En una representación, para el VL, el subgrupo es el subgrupo kappa I como en Kabat y otros, *supra.* En una representación, para el VH, el subgrupo es el subgrupo III como en Kabat y otros, *supra*.

Un anticuerpo "humanizado" hace referencia a un anticuerpo quimérico que abarca residuos de aminoácidos de HVR no humanos y residuos de aminoácidos de FR humanos. En determinadas representaciones, un anticuerpo humanizado abarcará sustancialmente la totalidad de al menos uno y típicamente dos dominios variables, en los cuales todos o sustancialmente todos los HVR (p. ej. CDR) corresponden a aquellos de un anticuerpo no humano, y todos o sustancialmente todos los FR corresponden a aquellos de un anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado opcionalmente puede abarcar al menos una porcion de una región constante de anticuerpo derivada de un anticuerpo humano. Una "forma humanizada" de un anticuerpo, p. ej.: un anticuerpo no humano, hace referencia a un anticuerpo que fue sometido a la humanización.

El término "región hipervariable" o "HVR" como se utiliza en el presente hace referencia a cada una de las regiones de un dominio variable de anticuerpo que resulta hipervariable en secuencia ("regiones determinantes de complementaridad" o "CDR") o contiene los residuos que establecen contacto con el antígeno ("contactos de antígeno"). Por lo general, los anticuerpos abarcan seis HVR: tres en VH (H1, H2, H3) y tres en VL (L1, L2, L3). Los HVR ejemplares en el presente incluyen:

(a) bucles hipervariables que ocurren en los residuos de aminoácidos 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) (Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987));

(b) CDR que ocurren en los residuos de aminoácidos 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35b (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) (Kabat y otros*., Sequences of Proteins of Immunological Interest (Secuencias de proteínas de interés inmunológico)*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health (5.ta edición, Servicio de Salud Pública, Institutos Nacionales de Salud), Bethesda, MD (1991));

(c) contactos con antígenos que ocurren en los residuos de aminoácidos 27c-36 (L1), 46-55 (L2), 89-96 (L3), 30-35b (H1), 47-58 (H2) y 93-101 (H3) (MacCallum y otros. *J. Mol. Biol.* 262: 732-745 (1996)) y

(d) combinaciones de (a), (b), o (c), que incluyen los residuos de aminoácidos HVR 46-56 (L2), 47-56 (L2), 48-56 (L2), 49-56 (L2), 26-35 (H1), 26-35b (H1), 49-65 (H2), 93-102 (H3) y 94-102 (H3).

A menos que se indique lo contrario, los residuos de HVR y otros residuos del dominio variable (p. ej.: residuos FR) están numerados en el presente según Kabat y otros, *supra*.

Un "inmunoconjugado" es un anticuerpo conjugado en una o más moléculas heterólogas,

incluido entre otros, un agente citotóxico.

Un "sujeto" o un "individuo" es un mamífero. Los mamíferos incluyen, entre otros, a los animales domésticos (p. ej.: vacas, ovejas, gatos, perros y caballos), primates (p. ej.: primates humanos y no humanos, como los monos), conejos y roedores (p. ej.: ratones y ratas). En determinadas representaciones, el sujeto o individuo es un humano.

Un anticuerpo "aislado" es uno que ha sido separado de un componente de su entorno natural. En algunas representaciones, un anticuerpo es purificado a más del 95% o del 99% de pureza según lo determinado por, por ejemplo, métodos electroforéticos (p. ej.: SDS-PAGE, concentración isoeléctrica (IEF), electroforesis capilar) o cromatográficos (p. ej.: intercambio de iones o HPLC de fase inversa). Para revisar los métodos de evaluación de la pureza de los anticuerpos, consulte, p. ej.: Flatman y otros, *J. Chromatogr. B* 848:79-87 (2007).

Un ácido nucléico "aislado" hace referencia a una molécula de ácido nucléico que fue separada de un componente de su entorno natural. Un ácido nucléico aislado incluye a una molécula de ácido nucléico contenida en células que comúnmente contienen a la molécula de ácido nucléico, pero la molécula de ácido nucléico se encuentra presente de manera extracromosómica o en una ubicación cromosómica que es diferente a su ubicación cromosómica natural.

La "codificación del ácido nucléico aislado de un anticuerpo contra CD3" hace referencia a una o más moléculas de ácido nucléico que codifican cadenas pesadas y livianas de anticuerpos (o fragmentos de ellas), incluidas dichas moléculas de ácido nucléico de un solo vector o de vectores separados, y dichas moléculas de ácido nucléico presentes en una o más ubicaciones en una célula huésped.

El término "anticuerpo monoclonal" como se utiliza en el presente, hace referencia a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que abarcan la población son idénticos o se unen al mismo epítopo, excepto en el caso de los anticuerpos con posibles variantes, p. ej.: que contienen mutaciones de ocurrencia natural o surgen durante la producción de una preparación de anticuerpos monoclonales, dichas variantes por lo general están presentes en cantidades menores. En contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales, que típicamente incluyen anticuerpos diferentes dirigidos contra determinantes diferentes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales se dirige contra un solo determinante en un antígeno. De esta manera, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea y no debe interpretarse como que es necesaria la producción del anticuerpo mediante ningún método en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se utilizarán en conformidad con la presente inversión pueden fabricarse mediante una variedad de técnicas, incluidas entre otras, el método de hibridoma, los métodos de ADN recombinante, los métodos de exposición de fagos y los métodos que y los métodos que utilizan animales transgénicos que contienen todos o parte de los loci de la inmunoglobulina humana, dichos métodos y

otros métodos ejemplares para fabricar anticuerpos monoclonales se describen en el presente.

Un “anticuerpo desnudo” hace referencia a un anticuerpo que no está conjugado en una fracción heteróloga (p. ej.: una fracción citotóxica) o radioetiqueta. El anticuerpo desnudo puede estar presente en una formulación farmacéutica.

Los “anticuerpos nativos” hacen referencia a moléculas de inmunoglobulina de ocurrencia natural con estructuras variantes. Por ejemplo, los anticuerpos nativos de IgG son glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150,000 dáltones, compuestas de dos cadenas livianas idénticas y dos cadenas pesadas idénticas que están unidas por un bisulfuro. Desde N- hasta C-terminal, cada cadena pesada tiene una región variable (VH), también denominada dominio pesado variable o un dominio variable de cadena pesada, seguido por tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3). Similarmente, desde N- hasta C-terminal, cada cadena liviana tiene una región variable (VL), también denominada dominio liviano variable o un dominio variable de cadena liviana, seguido por un dominio liviano constante (CL). La cadena liviana de un anticuerpo puede estar asignada a uno de dos tipos, denominados kappa (κ) y lambda (λ), según la secuencia de aminoácidos de su dominio constante.

El término “prospecto” se utiliza para hacer referencia a las instrucciones que habitualmente se incluyen en los paquetes comerciales de los productos terapéuticos, que contienen información sobre las indicaciones, el uso, la dosis, la administración, los tratamientos combinados, las contraindicaciones o las advertencias con respecto al uso de dichos productos terapéuticos.

El término “antagonista de unión del eje de PD-1” hace referencia a una molécula que inhibe la interacción de un colaboración de unión al eje de PD-1 con uno o más de sus colaboradores de unión, para eliminar la disfunción de la célula T que surge como resultado de señalizar el eje de señalización de PD-1; con el resultado que es la restauración o mejora de la función de la célula T (p. ej.: proliferación, producción de citocinas, muerte de células objetivo). Como se lo utiliza en el presente, el antagonista de unión al eje PD-1 incluye un antagonista de unión a PD-1, un antagonista de unión a PD-L1 y un antagonista de unión a PD-L2.

El término “antagonista de unión a PD-1” se refiere a una molécula que disminuye, bloquea, inhibe, anula o interfiere en la transducción de señal resultante de la interacción de PD-1 con una o varias de sus moléculas de enlace, tales como PD-L1, PD-L2. En algunas representaciones, un antagonista de unión a PD-1 es una molécula que inhibe la unión de PD-1 a una o varias de sus moléculas de enlace. En un aspecto específico, el antagonista de unión a PD-1 inhibe la unión de PD-1 a PD-L1 o PD-L2. Por ejemplo, los antagonistas de PD-1 incluyen anticuerpos contra PD-1, fragmentos de unión a antígenos del mismo, inmunoadhesinas, proteínas de fusión, oligopéptidos y otras moléculas que disminuyen, bloquean, inhiben, anulan o interfieren con la transducción de señal resultante de la interacción de PD-1 con PD-L1 o PD-L2. En una representación, un antagonista de unión de PD-1 reduce la señal coestimulante negativa mediada por o a

través de proteínas de la superficie celular expresadas en linfocitos T, mediando la señal a través del PD-1 para representar una célula T disfuncional como menos disfuncional (p. ej.: realzando las respuestas del efector ante el reconocimiento del antígeno). En algunas representaciones, un antagonista de unión a PD-1 es un anticuerpo contra PD-1. En un aspecto específico, un antagonista de unión a PD-1 es MDX-1106 (nivolumab) descrito en el presente. En otro aspecto específico, un antagonista de unión a PD-1 es MK-3475 (lambrolizumab) descrito en el presente. En otro aspecto específico, un antagonista de unión a PD-1 es CT-011 (pidilizumab) descrito en el presente. En otro aspecto específico, un antagonista de unión a PD-1 es AMP-224 descrito en el presente.

El término "antagonista de unión a PD-L1" se refiere a una molécula que disminuye, bloquea, inhibe, anula o interfiere en la transducción de señal resultante de la interacción de PD-L1 con una o más de sus moléculas de enlace, tales como PD-1, B7-1. En algunas representaciones, un antagonista de unión a PD-L1 es una molécula que inhibe la unión de PD-L1 a sus colaboradores de enlace. En un aspecto específico, el antagonista de unión a PD-L1 inhibe la unión de PD-L1 a PD-1 o B7-1. En algunas representaciones, los antagonistas de unión a PD-L1 incluyen anticuerpos contra PD-L1, fragmentos de unión a antígenos del mismo, inmunoadhesinas, proteínas de fusión, oligopéptidos y otras moléculas que disminuyen, bloquean, inhiben, anulan o interfieren con la transducción de señal resultante de la interacción de PD-L1 con una o más de sus moléculas de enlace, tales como PD-1, B7-1. En una representación, un antagonista de unión a PD-L1 reduce la señal coestimulante negativa mediada por o a través de proteínas de la superficie celular expresadas en linfocitos T, mediando la señal a través del PD-L1 para representar una célula T disfuncional como menos disfuncional (p.ej.: realzando las respuestas del efector ante el reconocimiento del antígeno). En algunas representaciones, un antagonista de unión de la PD-L1 es un anticuerpo anti-PD-L1. En un aspecto específico, un anticuerpo anti-PD-L1 es el YW243.55.S70 descrito en el presente. En otro aspecto específico, un anticuerpo anti-PD-L1 es el MDX-1105 descrito en el presente. Otro aspecto específico especifica que un anticuerpo anti-PD-L1 es el MPDL3280A descrito en el presente. Otro aspecto específico especifica que un anticuerpo anti-PD-L1 es el MEDI4736 descrito en el presente.

El término "antagonista de unión de PD-L2" se refiere a una molécula que disminuye, bloquea, inhibe, anula o interfiere en la transducción de señal resultante de la interacción de PD-L2 con una o varias de sus moléculas de enlace, tal como la PD-1. En algunas representaciones, un antagonista de unión de PD-L2 es una molécula que inhibe la unión de PD-L2 y una o varias de sus moléculas de enlace. En un aspecto específico, el antagonista de unión de PD-L2 inhibe la unión del PD-L2 al PD-1. En algunas representaciones, los antagonistas de PD-L2 incluyen anticuerpos anti-PD-L2, fragmentos unificadores de antígenos del mismo, inmunoadhesinas, proteínas de fusión, oligopéptidos y otras moléculas que disminuyen, bloquean, inhiben, anulan o interfieren con la transducción de señal resultante de la interacción de PD-L2 con una o más de sus moléculas de enlace, tal como la PD-1. En una representación, un antagonista de unión de

PD-L2 reduce la señal coestimulante negativa mediada por o a través de proteínas de la superficie celular expresadas en linfocitos T, mediando la señal a través del PD-L2 para representar una célula T disfuncional como menos disfuncional (p.ej: realzando las respuestas de efector a un reconocimiento antígeno). En algunas representaciones, un antagonista de unión de PD-L2 es una inmunoadhesina.

A menos que se indique lo contrario, el término "proteína" aquí utilizado se refiere a cualquier proteína nativa de cualquier fuente vertebrada, incluyendo mamíferos tales como primates (p.ej humanos) y roedores (p.ej ratones y ratas). El término abarca proteínas "completas" sin procesar, así como también cualquier forma de proteína que resulte del procesamiento en la célula. El término también incluye variables naturales de la proteína, como por ejemplo variantes de empalme o alélicas. Las proteínas respectivas a la invención incluyen, por ejemplo, cualquier proteína enumerada en la Tabla 1.

"El porcentaje (%) de identidad de secuencias de aminoácidos" con respecto a una secuencia de polipéptido de referencia se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidato que es idéntica a los residuos de aminoácidos en la secuencia de polipéptidos de referencia, luego de alinear las secuencias e introducir espacios, si fuera necesario, para conseguir el porcentaje máximo de la identidad de secuencia, sin considerar cualquier sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. El proceso de alineación con el fin de determinar el porcentaje de la identidad de secuencia de aminoácidos puede lograrse de distintas maneras por expertos en la materia, por ejemplo, utilizando software informático de acceso público, tal como BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Aquellas personas expertas en la materia pueden determinar los parámetros adecuados para alinear secuencias, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir una alineación máxima sobre el largo completo de las secuencias en comparación. Sin embargo, los valores (%) de identidad de secuencia de aminoácidos se generan utilizando el programa informático de comparación de secuencias, ALIGN-2, para los fines aquí establecidos. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 fue creado por Genentech, Inc, mientras que el código fuente ha sido presentado con documentación del usuario en la Oficina de Derechos de Autor de E.E.U.U., Washington D.C., 20559, donde se inscribió bajo el N° de Registro de Derechos de Autor de E.E.U.U. TXU510087. El programa ALIGN-2 es de dominio público en Genentech, Inc., Sur de San Francisco, California, o puede recopilarse a partir del código fuente. El programa ALIGN-2 debe recopilarse para usar en un sistema operativo UNIX, incluyendo UNIX V4.OD digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias son establecidos por el programa ALIGN-2 y no varían.

En situaciones en las que se utiliza ALIGN-2 para comparar secuencias de aminoácidos, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos A dada con o contra una secuencia de aminoácidos B dada (que de manera alternativa puede plantearse como una secuencia de aminoácidos A dada que tiene o incluye un % de identidad de secuencia particular de aminoácidos con o contra una secuencia de aminoácidos B dada) se calcula de la siguiente manera:

100 veces la fracción X/Y

donde X es la cantidad de residuos de aminoácidos calificados como idénticamente compatibles por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en la alineación del programa de A y B, y donde Y es la cantidad total de residuos de aminoácidos en B. Ha de reconocerse que donde la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A a B no será igual al % de identidad de secuencia de aminoácidos de B a A. A menos que se establezca lo contrario, todos los valores de porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos utilizados en el presente se obtienen mediante el proceso descripto en el párrafo inmediatamente anterior utilizando el programa informático ALIGN-2.

El término "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación hecha de una manera que permita la actividad biológica de un ingrediente activo que ahí se contiene para ser eficaz, la cual no contiene componentes adicionales considerados inaceptablemente tóxicos para el sujeto para el cual se administraría dicha formulación.

Un "portador aceptable farmacéuticamente" es un ingrediente en una formulación farmacéutica, distinto de un ingrediente activo, que no se considera tóxico para un sujeto. Un portador aceptable farmacéuticamente incluye, aunque no exclusivamente, un tampón, excipiente, estabilizador o conservante.

Como se utiliza en el presente, la palabra "tratamiento" (y sus variaciones gramaticales tales como "tratar") alude a la intervención clínica en un intento de alterar el curso natural del individuo que se encuentra bajo tratamiento, lo cual puede realizarse por profilaxis o durante el curso de la patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen, pero no se limitan a, prevenir la ocurrencia o recurrencia de una enfermedad, aliviar los síntomas, disminuir cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, prevenir la metástasis, disminuir la tasa de evolución de la enfermedad, mejorar o paliar el estado de la enfermedad, y una remisión o un mejor pronóstico. En algunas representaciones, los anticuerpos de la invención son utilizados para retrasar el desarrollo de una enfermedad o disminuir su progreso.

El término "progresión retrasada" de un trastorno o enfermedad aquí utilizado implica postergar, dificultar, retrasar, estabilizar y/o posponer el desarrollo de la enfermedad o trastorno (p.ej: un trastorno proliferativo de células, p.ej: cáncer). Este retraso puede durar por variados lapsos de tiempo, dependiendo de la historia de la enfermedad y/o del individuo bajo tratamiento. Como es obvio para los expertos en la materia, un retraso suficiente o importante de hecho puede abarcar la prevención, ya que el individuo no desarrolla la enfermedad. Por ejemplo, se puede retrasar un cáncer en estado avanzado, como en el desarrollo de la metástasis.

"Disminuir" o "inhibir" implica la capacidad de causar un descenso global, por ejemplo, de un 20% o mayor, de un 50% o mayor, de un 75%, 85%, 90%, 95% o mayor. En ciertas representaciones, disminuir o inhibir puede referirse a la función efectora de un anticuerpo que se media por un anticuerpo de la región de fragmento cristalizable. Dicho

efector funciona específicamente, incluyendo citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA), y fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP).

El término "región variable" o "dominio variable" se refiere al dominio de un anticuerpo de cadena liviana o pesada que está involucrado en la unión del anticuerpo y el antígeno. Por lo general, los dominios variables de cadena pesada y cadena liviana (VH y VL, respectivamente) de un anticuerpo nativo tienen estructuras similares. Cada dominio comprende cuatro regiones altamente conservadas (FRs) y tres regiones hipervariables (RHVs). (Ver, p.ek, Kindt et ál. *Kuby Immunology*, 6ta Ed., W.H. Freeman and Co., página 91 (2007).) Un dominio VH o VL único puede ser suficiente para otorgar especificidad de unión al antígeno. Además, los anticuerpos que unen un antígeno particular pueden aislarse utilizando un dominio VH o VL de un anticuerpo que une el antígeno para tamizar una genoteca de dominios VH o VL complementarios, respectivamente. Ver, p.ej. Portolano et ál, *J. Immunol* 150:880-887 (1993); Clarkson et ál., *Nature* 352:624-628 (1991).

El término "vector" utilizado en el presente documento se refiere a la molécula nucleica ácida capaz de propagar otro ácido nucleico al cual está unida. El término incluye el vector como una estructura ácido nucleica autorreproductora, así como también el vector incorporado al genoma de una célula hospedadora en el cual ha sido introducido. Ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de los ácidos nucleicos a los que están unidos operativamente. En el presente documento nos referimos a dichos vectores como "vectores de expresión".

Como se usa en el presente, "administrar" implica un método de dar una dosis de un compuesto (p. ej. un anticuerpo de anti-CD3 de la invención o un ácido nucleico codificando un anticuerpo anti-CD3 de la invención) o una composición (p.ej, una composición farmacéutica. p.ej. una composición farmacéutica incluyendo un anticuerpo anti-CD3 de la invención) a un sujeto. Las composiciones utilizadas en los métodos descritos en el presente pueden administrarse, por ejemplo por vía intramuscular, intravenosa, intradermal, por vía percutánea, intraarterial, intraperitonal, intralesional, intracraneal, intraarticular, intraprostática, intrapleural, intratraqueal, intranasal, intravítrea, intravaginal, intrarectal, de forma tópica, por vía intratumoral, peritoneal, subcutánea, subconjuntival, intravesicular, mucosa, intrapericárdica, intraumbilical, intraocular, oral, tópica, local, por inhalación, por inyección, por infusión, por infusión contínua, por perfusión localizada lavando células diana directamente, por catéter, por lavado, en cremas o en composiciones lipídicas. El método de administración puede variar según diversos factores (p. ej. el compuesto o composición a administrar y la gravedad de la condición, enfermedad o trastorno bajo tratamiento).

II. COMPOSICIONES Y MÉTODOS

En parte, la invención se basa en anticuerpos anti-CD3. En ciertas representaciones, los anticuerpos anti-CD3 son multiespecíficos (es decir, biespecíficos) y, además de un CD3 o

un fragmento del mismo, unen una segunda molécula biológica (es decir, un antígeno de la superficie celular, p.ej: un antígeno tumoral). Los anticuerpos de la invención son útiles, por ejemplo, para tratar o retrasar el avance de un trastorno proliferativo de células (p.ej: cáncer) o un trastorno autoinmune, o para aumentar la función inmunológica en un sujeto que sufre dicho trastorno.

A. Anticuerpos anti-CD-3 modelo

En un aspecto, la invención produce anticuerpos aislados que se unen a CD3 (p.ej: CD3ε y/o CD3γ).

Por ejemplo, en algunas situaciones, un anticuerpo anti CD3 que tiene un primer dominio de unión puede comprender al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis regiones hipervariables (RHV) que se seleccionan de (a) una RHV-H1 que consta en una secuencia de aminoácidos con N°. de ID de SEC.: 1; (b) una RHV-H2 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.° de ID de SEC.: 2; (c) una RHV-H3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 3; (d) una RHV-L1 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 4; (e) una RHV-L2 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 5; y (f) una RHV-L3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 6. En algunos casos, el anticuerpo anti-CD3 contiene al menos una (por ejemplo, 1, 2, 3, o 4) de las regiones del marco de las cadenas pesadas FR-H1, FR-H2, FR-H3, y FR-H4 que consiste en las secuencias de N.º de ID de SEC.: 301-304, respectivamente, y/o al menos una (por ejemplo, 1, 2, 3, o 4) de las regiones del marco de la cadena liviana FR-L1, FR-L2, FR-L3, y FR-L4 que consiste en las secuencias de N.º de ID de SEC.: 305-308, respectivamente. En algunos casos, el anticuerpo anti-CD3 puede constar de un dominio de VH incluyendo una secuencia de aminoácidos con al menos una identidad de secuencia del 90% (p. ej., con una identidad de secuencia de al menos el 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%) con, o la secuencia de, N.° de ID de SEC.: 184 y/o un dominio de VL que consta de una secuencia de aminoácidos con al menos una identidad de secuencia del 90% (p. ej., con una identidad de secuencia de al menos el 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%) con, o la secuencia de, N.° de ID de SEC.: 185. En otros casos, el anticuerpo de anti-CD3 contiene al menos una (por ejemplo, 1, 2, 3, o 4) de las regiones del marco de las cadenas pesadas FR-H1, FR-H2, FR-H3, y FR-H4 que consiste en las secuencias de N.º de ID de SEC.: 293-296, respectivamente, y/o al menos una (por ejemplo, 1, 2, 3, o 4) de las regiones del marco de la cadena liviana FR-L1, FR-L2, FR-L3, y FR-L4 que consiste en las secuencias de N.º de ID de SEC.: 297-300, respectivamente. En algunos casos, el anticuerpo anti-CD3 puede constar de un dominio de VH incluyendo una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una identidad de secuencia del 90% (p. ej., con una identidad de secuencia de al menos el 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%) con, o la secuencia de, N.° de ID de SEC.: 186 y/o un dominio de VL que consta de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una identidad de secuencia del 90% (p. ej., con una identidad de secuencia de al menos el 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%,

98% o 99%) con, o la secuencia de, N.° de ID de SEC.: 187. En una situación particular, el anticuerpo anti-CD3 puede ser 40G5c, o un derivado o anticuerpo clonal del mismo.

En otro aspecto, un anticuerpo de la invención comprende (a) un dominio VH que incluye al menos uno, al menos dos o las tres secuencias RHV VH seleccionadas a partir de (i) una RHV-H1 que consta de una secuencia de aminoácidos con N.° de ID de SEC.: 1, (ii) una RHV-H2 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 2, y (iii) RHV-H3 que consta de una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del N.° de ID SEC.: 3; y (b) un dominio VH que incluye al menos uno, al menos dos o las tres secuencias RHV VH seleccionadas a partir de (i) una RHV-L1 que consta de una secuencia de aminoácidos con N.° de ID de SEC.: 4; (ii) una RHV-L2 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 5, y (iii) una RHV-L3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 6. En algunos casos, el anticuerpo anti-CD3 puede tener un dominio de VH que consta de una secuencia de aminoácidos con N.° de ID de SEC.: 184 y un dominio de VL que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 185. En algunos casos, el anticuerpo anti-CD3 puede tener un dominio de VH que consta de una secuencia de aminoácidos con N.° de ID de SEC.: 186 y un dominio de VL que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 187. En una situación particular, el anticuerpo anti-CD3 puede ser 40G5c, o un derivado o anticuerpo clonal del mismo.

En cualquiera de las versiones mencionadas anteriormente, se humaniza un anticuerpo anti-CD3. En una versión, un anticuerpo anti-CD3 incluye unas RHV como en cualquiera de las versiones anteriores. Además, abarca un marco receptor, p.ej. un marco de inmunoglubina humana o un marco de consenso humano.

En otro aspecto, se producen anticuerpos anti-CD3, en donde el anticuerpo abarca un VH como en todas las versiones provistas anteriormente, y un VL como en todas las versiones previas, en las que una o ambas secuencias de dominio variable incluyen modificaciones pos-traduccionales.

Otro rasgo indica que la invención produce un anticuerpo que se une al mismo epítope como un anticuerpo anti-CD3 provisto anteriormente. Por ejemplo, en ciertas versiones, se produce un anticuerpo que se une al mismo epítope que un anticuerpo anti-CD3 incluyendo un N.° de secuencia VH de ID de SEC.: 184 y un N.° de secuencia VL de ID de SEC.: 185. En ciertas versiones, se provee un anticuerpo que se une a un epítope dentro de un fragmento de CD3 (p.ej. CD3ε de humano), que consiste en aminoácidos 1-26 (N.° de ID de SEC.: 283) o 1-27 (N.º de ID de SEC.: 278) de la cadena CD3ε de humano.

En otro aspecto, la invención produce un anticuerpo que se une con un epítope CD3 único. En ciertas representaciones, el anticuerpo anti-CD3 de la invención hace un contacto único con aminoácidos de CD3ε de humano a una distancia de 3,5 ángstroms; 3,25 ángstroms; 3,00 ángstroms; 2,75 ángstroms, o menos. En algunas representaciones, se proporciona un anticuerpo que se une a un epítope que consta de uno, dos, tres, cuatro o cinco aminoácidos de CD3ε de humano a una distancia de 3,5 ángstroms; 3,25 ángstroms; 3,00 ángstroms; 2,75 ángstroms, o menos. En una versión, el anticuerpo anti-

CD3 de la invención entra en contacto únicamente con aminoácidos de CD3ε a una distancia de 3,5 ángstroms o menos. En ciertas versiones, se provee un anticuerpo que se une a un epítope comprendiendo uno, dos, tres, cuatro o cinco aminoácidos de la cadena CD3ε de humano a una distancia de 3,5 ángstroms o menos. Por ejemplo, en ciertas versiones, se provee un anticuerpo que se une a un epítope que consiste en aminoácidos de la cadena CD3ε de humano seleccionado de GIn1, Asp2, Asn4, Glu6 y Met7. En una versión en particular, en anticuerpo anti-CD3 se une a un epítope que incluye Glu6 específicamente. En otras versiones particulares, se provee un anticuerpo que no se une a un epítope que incluye aminoácido Glu5 de la cadena CD3ε de humano. En otras versiones particulares, se provee un anticuerpo que no se une a un epítope que incluye aminoácidos Gly3 y Glu5 de la cadena CD3ε de humano.

Se puede determinar un epítope anti-CD3 por un anticuerpo anti-CD3 unido a fragmentos péptídicos del epítope. Alternativamente, un epítope anti-CD3 mediante puede determinarse mediante mutagénesis por escaneo de alanina. En una representación, una reducción en la unión de un anticuerpo anti-CD3 a un CD3 mutado por un porcentaje de 20%, 30%, 50%, 80% o más indica que el residuo del aminoácido del CD3 mutado en un ensayo de mutagénesis por escaneo de alanina es un residuo de epítipe para ese anticuerpo anti-CD3. Alternativamente, un epítope anti-CD3 puede determinarse mediante espectrometría de masas. En algunas versiones, el epítope se determina por cristalografía (por ejemplo, métodos cristalográficos descriptos en los Ejemplos).

En algunas versiones, el epítope, tal como se establece por cristalografía, se determina utilizando aminoácidos Q1-M7 de CD3. En algunas versiones, el epítope, tal como se establece por cristalografía, se determina utilizando aminoácidos QDGNEEMGGITQTPYK (N.° de ID de SEC.: 284) de CD3.

En algunas versiones, el epítope, tal como se estableció por cristalografía, puede llevarse a cabo combinando el anticuerpo anti-CD3 Fab, disuelto en 0,15 m de NaCl, 25 mM tris, pH de 7,5 en 10 mg/mL, con un exceso molar del doble (1 mg) del péptido del complejo CD3ε y detectando inicialmente una matriz dispersa de precipitantes en un formato de difusión de vapor. Los cristales optimizados pueden desarrollarse en una mezcla 1:1 con una solución de depósito con 70% de v/v de metilpentano, y 0,1 m de tampón HEPES a un pH de 7,5. El depósito puede utilizarse como crioprotector. Los cristales pueden transferirse a temperatura criogénica por inmersión súbita en nitrógeno líquido.

Los datos de difracción de cristales pueden recopilarse en línea de haz del Advanced Photon Source 22ID, utilizando un detector CCD MAR300. Las defracciones registradas pueden integrarse y ampliarse utilizando el programa HKL2000.

La estructura puede escalonarse por el método de reemplazo molecular (MR) utilizando el programa Phaser. Por ejemplo, el modelo de búsqueda de MR es una sub-unidad Fab derivada de una estructura cristalina del complejo HGFA/Fab (código PDB: 2R0L). El péptido de complejo CD3ε se desarrolla en la estructura basada en un mapa Fo-Fc. Como consecuencia, la estructura puede refinarse utilizando los programas REFMAC5 y

PHENIX, implementando las funciones objetivo de probabilidad, el método de refinamiento de factor-B individual anisotrópico y el método de refinamiento TLS, para lograr la convergencia.

En otras versiones particulares, se produce un anticuerpo que incluye un paratopo que se une al mismo epítope que un anticuerpo anti-CD3 incluido en el presente. Por ejemplo, en ciertas versiones, se desarrolla un anticuerpo que se une al mismo epítope que un parotopo de anticuerpos anti-CD3 incluyendo aminoácidos que toman contacto a una distancia de 3,5 ángstroms o menos. En ciertas versiones, se provee un anticuerpo que se une al mismo epítope que un paratopo de anticuerpo anti-CD3 que consiste en aminoácidos de la región VH del anticuerpo anti-CD3 seleccionado del grupo, incluyendo 33Tyr, 35His, 50Trp, 97Tyr y 98Ser. En ciertas versiones, se provee un anticuerpo que se une al mismo epítope que un paratopo de anticuerpo anti-CD3, que consiste en uno, dos, tres, cuatro o cinco aminoácidos de la región VH de un anticuerpo anti-CD3 seleccionado del grupo que incluye 33Tyr, 35His, 50Trp, 97Tyr y 98Ser. En ciertas versiones, se provee un anticuerpo que se une al mismo epítope que un paratopo de anticuerpo anti-CD3, que consiste en aminoácidos de la región VL de un anticuerpo anti-CD3 seleccionado del grupo, incluyendo 27Arg, 27Asn, 30Lys, 32Tyr y 92Phe, 94Leu y 96Arg. En ciertas versiones, se provee un anticuerpo que se une al mismo epítope que un paratopo de anticuerpo anti-CD3, que consiste en uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete aminoácidos de la región VL de un anticuerpo anti-CD3 seleccionado del grupo, incluyendo 27Arg, 27Asn, 30Lys, 32Tyr, 92Phe, 94Leu y 96Arg. En una versión opcional, se proporciona un anticuerpo que no se une al mismo epítope que un paratopo de anticuerpo anti-CD3, el cual consta de aminoácidos de la región VL, incluyendo 91Ser. Un aspecto adicional de la invención indica que, de acuerdo a cualquiera de las versiones mencionadas anteriormente, un anticuerpo anti-CD3 es un anticuerpo monoclonal que consiste en un anticuerpo humano, humanizado o quimérico. En una versión, un anticuerpo anti-CD3 es un fragmento de anticuerpo, por ejemplo: un Fv, Fab, Fab', scFv, diacuerpo, o un fragmento de $F(ab')_2$. En otra versión, el anticuerpo es de largo completo, es decir, un anticuerpo IgG intacto (por ej: un anticuerpo IgG1 intacto) u otra clase anticuerpo o isotopo según lo aquí contemplado.

Como aspecto adicional, de acuerdo a cualquiera de las versiones mencionadas anteriormente, un anticuerpo anti-CD3 puede incorporar cualquiera de estas características, individualmente o en combinación, tal como se describe en las Secciones 1-7 debajo.

1. Afinidad del Anticuerpo

En determinadas representaciones, un anticuerpo provisto aquí tiene una constante de disociación (Kd) de ≤1μM, ≤ 100 nm, ≤10 nm, ≤1 nm, ≤0,1 nm, ≤0,01 nm, o ≤ 0,001 nm (p. ej.: 10^{-8} M o menos, p. ej.: de 10^{-8}M a 10^{-13} M, p. ej.: de 10^{-9}M a 10^{-13} M).

En una representación, Kd se mide con un ensayo de unión de antígenos radiomarcados (RIA). En una representación, se lleva a cabo un RIA junto con la versión Fab de un

anticuerpo de interés y su antígeno. Por ejemplo, la afinidad de unión de la solución de Fabs para antígenos se mide equilibrando Fab con una concentración mínima de un antígeno marcado (^{125}I) en presencia de una titulación en serie de antígenos sin marcar y capturando antígenos unidos con una placa recubierta de anticuerpos anti-Fab (ver, p.ej., Chen et ál., *J. Mol. Biol.* 293:865-881(1999)). Con el fin de establecer las condiciones para el ensayo, las placas de pozo múltiple MICROTITER® (termo-científicas) son cubiertas durante la noche con 5 ug/mL de anticuerpos anti-Fab de captura (Laboratorios Cappel) en 50 mM de carbonato de sodio (pH de 9,6), y consecutivamente bloqueadas con 2% de Albúmina del Suero Bovino (p/p) en PBS entre dos y cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23°C). En el caso de una placa no absorbente (Nunc #269620), los antígenos [^{125}I] de 100 pM o 26 pM se mezclan con diluciones en serie de un Fab de interés (p. ej. consistentes con la evaluación del anticuerpo anti-VEGF, Fab-12, en Presta et ál., *Cancer Res.* 57:4593-4599 (1997)). Luego, el Fab de interés se incuba toda la noche; sin embargo, el proceso de incubación puede continuar por un período más largo (p.ej de aproximadamente 65 horas) para garantizar que se alcance el equilibrio. Posteriormente, las mezclas se transfieren a la placa capturadora para ser incubadas a temperatura ambiente (p.ej. durante una hora). Luego, se quita la solución y se enjuaga la placa ocho veces con 0,1% de polisorbato 20 (TWEEN-20®) en PBS. Cuando las placas están secas, se agregan 150 µl/pozo de centelleo (MICROSCINT-20 ™; Packard), y las placas se recuentan con un contador gama TOPCOUNT ™ (Packard) durante diez minutos. Las concentraciones de cada Fab que proporcionan 20% de unión máxima o menos son seleccionadas para implementarlos en ensayos de unión competitivos.

De acuerdo a otra representación, se mide la Kd utilizando un ensayo de resonancia plasmónica de superficie BIACORE® Por ejemplo, un ensayo que utiliza BIACORE®-2000 o un BIACORE ®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) se realiza a 25°C con chips CM5 de antígenos inmovilizados a ~10 unidades de respuesta (RU). En una representación, los chips de biosensores de dextrano carboximetilado (CM5, BIACORE, Inc.), se activan con *N*-etil-*N'*- (3-dimetilaminopropilamina)-hidrocloruro de carbodiimida (EDC) y *N-hidroxisuccinimida* (NHS) conforme a las instrucciones del proveedor. El antígeno se diluye con 10 mM de acetato de sodio, pH de 4,8, a 5 µg/ml (~0,2 µM) antes de inyectar a una velocidad de flujo de 5 µl/minuto para conseguir aproximadamente 10 unidades de respuesta (RU) de proteínas unidas. Luego de la inyección en el antígeno, se inyecta 1 M de etanolamina a los grupos no reaccionados de bloqueo. En el caso de mediciones cinéticas, se inyectan diluciones en serie de Fab duplicadas (0,78 nM a 500 nM9 en PBS con 0,05% de polisorbato 20 (TWEEN-20™) surfactante (PBST) a 25°C en una velocidad de flujo de aproximadamente 25 µl/min. Las tasas de asociación (k_{on}) y disociación (k_{off}) se calculan utilizando un modelo de unión Langmuir simple individual (BIACORE ® Evaluation Software- versión 3.2), adaptando simultáneamente los sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación de equilibrio (Kd) se calcula como la proporción k_{on}/k_{off}. Ver, por ejemplo, Chen et ál., *J. Mol. Biol.* 293:865-881 (1999). Si la constante de asociación excede$10^6 M^{-1} s^{-1}$ del ensayo de

resonancia plasmónica de superficie mencionado anteriormente, la constante de asociación puede determinarse utilizando una técnica de enfriamiento fluorescente que mide el aumento o disminución en la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, paso de banda de 16 nm) a 25°C de un anticuerpo anti-antígeno de 20 nM (forma Fáb) en PBS, pH de 7,2 en presencia de crecientes concentraciones de antígeno medidas en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro equipado por el método de parada de flujo (instrumentos Aviv) o un espectrofotómetro SLM-AMINCO TM (TermoEspectrónico) de serie 8000 con una cubeta revuelta.

2. Fragmentos de anticuerpos

En determinadas representaciones, un anticuerpo provisto en el presente es el fragmento de un anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpos incluyen pero no se limitan a fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')2, Fv y scFv, y otros fragmentos que se describen a continuación. Para una revisión de ciertos fragmentos de anticuerpos, vea Hudson et al. *Nat. Med.* 9:129-134 (2003). Para una revisión de los fragmentos scFv, vea, p. ej., Pluckthün, en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., (Springer-Verlag, Nueva York), págs. 269-315 (1994); vea también WO 93/16185; y las patentes de EE.UU. N.° 5.571.894 y 5.587.458. Para una discusión de los fragmentos Fab y F(ab')2 que comprenden los residuos epítopos de unión con el receptor de recuperación y que aumentaron la vida media in vivo, vea la patente de EE.UU. N.° 5.869.046).

Los diacuerpos son fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión de antígenos que pueden ser bivalentes o biespecíficos. Vea, por ejemplo, EP 404,097; WO 1993/01161; Hudson et al. *Nat. Med.* 9:129-134 (2003); y Hollinger et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993). Los tricuerpos y tetracuerpos también se describen en Hudson et al. *Nat. Med.* 9:129-134 (2003).

Los anticuerpos de un solo dominio son fragmentos de anticuerpos que comprenden todo el dominio variable de una cadena pesada o una parte de él o todo el dominio de una cadena liviana de un anticuerpo o una parte de él. En ciertas representaciones, un anticuerpo de un solo dominio es un anticuerpo humano de un solo dominio (Domantis, Inc., Waltham, MA; vea, p. ej., la patente de EE.UU. N.° 6.248.516 B1).

Los fragmentos de anticuerpos se pueden hacer mediante diversas técnicas, que incluyen pero no se limitan a la digestión proteolítica de anticuerpos intactos, así como la producción de células anfitrionas recombinantes (p. ej. E. coli o fago), tal como se describe en este documento.

3. Anticuerpos quiméricos y humanizados

En determinadas representaciones, un anticuerpo provisto en el presente es un anticuerpo quimérico. Se describen ciertos anticuerpos quiméricos, p. ej., en la patente de EE.UU. N.° 4.816.567; y Morrison et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855

(1984)). En un ejemplo, un anticuerpo quimérico consta de una región variable no humana (p. ej., una región variable derivada de un ratón, una rata, un hámster, un conejo, o un primate no humano, como un mono) y una región constante humana. En otro ejemplo, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo con conmutación de clase en el que la clase o subclase se ha modificado respecto de la del anticuerpo primario. Los anticuerpos quiméricos incluyen fragmentos de unión de antígenos de los mismos.

En determinadas representaciones, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo humanizado. Generalmente, un anticuerpo no humano es humanizado para reducir la inmunogenicidad a los seres humanos, al tiempo que mantiene la especificidad y afinidad del anticuerpo parental no humano. Por lo general, un anticuerpo humanizado consta de uno o más dominios variables en los que las HVR, p. ej., las CDR (o partes de las mismas) derivan de un anticuerpo no humano, y las FR (o partes de las mismas) derivan de secuencias de anticuerpos humanos. Un anticuerpo humanizado opcionalmente puede abarcar al menos una porción de una región constante humana. En algunas representaciones, algunos residuos de la FR en un anticuerpo humanizado se sustituyen con los correspondientes residuos de un anticuerpo no humano (p. ej., el anticuerpo del que derivan los residuos de la HVR), p. ej., para restaurar o mejorar la especificidad o afinidad de los anticuerpos.

Los anticuerpos humanizados y los métodos para hacerlos se revisan p. ej., en Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008), y se describen, p. ej., en Riechmann et al*., Nature* 332:323-329 (1988); Queen et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86:10029-10033 (1989); las patentes de EE.UU. N.° 5.821.337, 7.527.791, 6.982.321, y 7.087.409; Kashmiri *et al*., *Methods* 36:25-34 (2005) (describen la región que determina la especificidad [SDR]); Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489-498 (1991) (describe "recubrimiento"); Dall'Acqua et al., *Methods* 36:43-60 (2005) (describe "intercambio de FR"); y Osbourn et al., *Methods* 36:61-68 (2005) y Klimka et al., *Br. J. Cancer*, 83:252-260 (2000) (describe el enfoque de "selección guiada" al intercambio de FR).

Las regiones de estructura humana que pueden ser utilizadas para humanización incluyen, pero no se limitan a: regiones del marco seleccionadas utilizando el método "más adecuado" (vea, p. ej., Sims et al. *J. Immunol.* 151:2296 (1993)); regiones del marco derivadas de la secuencia de consenso de anticuerpos humanos de un subgrupo particular de regiones variables de cadena pesada o liviana (vea p. ej., Carter et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); y Presta et al. *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)); regiones del marco humanas maduras (mutadas somáticamente) o regiones del marco germinal humano (vea p. ej., Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)); y regiones del marco derivadas de genotecas de FR de detección (vea p. ej., Baca et al., *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684 (1997) y Rosok et al., *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618 (1996)).

4. Anticuerpos humanos

En determinadas representaciones, un anticuerpo provisto en el presente es un

anticuerpo humano. Los anticuerpos humanos pueden producirse mediante el uso de varias técnicas conocidas en la materia. Los anticuerpos humanos se describen a grandes rasgos en van Dijk y van de Winkel, *Curr. Opin. Farmacol.* 5: 368-74 (2001) y Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20:450-459 (2008).

Los anticuerpos humanos pueden ser preparados mediante la administración de un inmunógeno a un animal transgénico que haya sido modificado para producir anticuerpos humanos intactos o anticuerpos intactos con regiones variables humanas en respuesta a un desafío antigénico. Estos animales suelen contener la inmunoglobulina humana loci, o una parte de ella, que sustituye a la inmunoglobulina loci endógena, o que se presenta extracromosomalmente o se integra de forma aleatoria en los cromosomas del animal. En estos ratones transgénicos, la inmunoglobulina endógena loci generalmente ha sido inactivada. Para la revisión de los métodos para la obtención de anticuerpos humanos de animales transgénicos, vea Lonberg, Nat. *Biotech.* 23:1117-1125 (2005). Vea también, p. ej., las patentes de EE.UU. N.° 6.075.181 y 6.150.584 que describen la tecnología XENOMOUSETM; la patente de EE.UU. N.° 5.770.429 que describe la tecnología HuMab®; la patente de EE.UU. N.° 7.041.870 que describe la tecnología K-M MOUSE® y la publicación de presentación de patente de EE.UU. N.° 2007/0061900, que describe la tecnología VelociMouse®). Las regiones variables humanas de anticuerpos intactos generados por estos animales pueden sufrir más modificaciones, p. ej., combinándolas con una región constante humana diferente.

Los anticuerpos humanos también pueden hacerse por métodos basados en hibridomas. También se han descrito las líneas celulares de mieloma humano y heteromielona humano-ratón para la producción de anticuerpos monoclonales humanos. (Vea, p. ej., Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pág. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987); y Boerner et al., *J. Immunol*., 147: 86 (1991).) Los anticuerpos humanos generados mediante la tecnología de hibridomas de células B humanas también se describen en Li et al*., Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006). Otros métodos incluyen los descritos, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N.° 7.189.826 (que describe la producción de anticuerpos IgM monoclonales humanos de líneas celulares hibridomas) y Ni, *Xiandai Mianyixue*, 26(4):265-268 (2006) (que describe los hibridomas humanos-humanos). La tecnología de hibridomas humanos (tecnología Trioma) también se describe en Vollmers and Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005) y Vollmers and Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3):185-91 (2005).

Los anticuerpos humanos también pueden generarse aislando secuencias de dominio variable de clones Fv seleccionados de genotecas de exhibición de fagos derivados de humanos. Tales secuencias de dominio variable pueden combinarse con un dominio constante humano deseado. A continuación se describen las técnicas para la selección de anticuerpos humanos de genotecas de anticuerpos.

5. Anticuerpos derivados de genotecas

Los anticuerpos de la invención pueden ser aislados seleccionando genotecas combinatorias de anticuerpos con la actividad o las actividades deseadas. Por ejemplo, una variedad de métodos son conocidos en la materia por generar genotecas de exhibición de fagos y seleccionar esas genotecas para los anticuerpos que reúnan las características de unión deseadas. Se revisan tales métodos, p. ej., en Hoogenboom et al. en *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) y se describen p. ej., en the McCafferty et al., *Nature* 348:552-554; Clackson et al., *Nature* 352: 624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Marks and Bradbury, en *Methods in Molecular Biology* 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004); and Lee et al., *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132(2004).

En ciertos métodos de exhibición de fagos, repertorios de genes de VH y VL son clonados por separado mediante reacción en cadena de polimerasa (PCR) y recombinados aleatoriamente en las genotecas de fagos, que luego pueden ser examinadas para fagos de unión de antígenos tal como se describe en Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Generalmente, los fagos presentan fragmentos de anticuerpos, ya sea fragmentos de cadena simple Fv (scFv) o fragmentos Fab. Las genotecas de fuentes inmunizadas proporcionan anticuerpos de alta afinidad al inmunógeno sin el requisito de desarrollo de hibridomas. Por otra parte, el repertorio no tratado previamente puede clonarse (p. ej., del ser humano) para proporcionar una fuente única de anticuerpos a una amplia variedad de antígenos propios y no propios sin ningún tipo de inmunización, tal como se describe en Griffiths et al., EMBO J, 12: 725-734 (1993). Finalmente, las genotecas no tratadas previamente pueden también hacerse sintéticamente por clonación de los segmentos no reordenados del gen V de las células madre y usando los iniciadores de PCR que contienen una secuencia aleatoria para codificar las regiones CDR3 altamente variables y lograr un reordenamiento in vitro, tal como se describe en Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992). Las publicaciones de patentes que describen las genotecas de fagos de anticuerpos humanos incluyen, por ejemplo: patente de EE.UU N.° 5.750.373, y las patentes de publicación de EE.UU N.° 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936, y 2009/0002360.

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos aislados de las genotecas de anticuerpos humanos se consideran anticuerpos humanos o fragmentos de anticuerpos humanos en este documento.

6. Anticuerpos multiespecíficos

En cualquiera de los aspectos anteriores, el anticuerpo anti-CD3 que se proporciona en este documento, por ejemplo, es un anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos

multiespecíficos son anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión para al menos dos sitios diferentes. En ciertas representaciones, los anticuerpos biespecíficos pueden unirse a dos epítopes diferentes de CD3 (p. ej., CD3ε o CD3γ). En ciertas representaciones, una de las especificidades de unión es para CD3 (p. ej., CD3ε o CD3γ) y la otra es para cualquier otro antígeno (p. ej., una segunda molécula biológica, p. ej., un antígeno celular de superficie, p. ej., un antígeno tumoral). Por consiguiente, un anticuerpo biespecífico anti-CD3 puede tener especificidades de unión para CD3 y una segunda molécula biológica, como una segunda molécula biológica (p. ej., un antígeno tumoral) incluido en la tabla 1 y descrito en la publicación de EE.UU. N.° 2010/0111856.

TABLA 1. Receptores de los antígenos tumorales de los anticuerpos biespecíficos anti-CD3 de la invención

CD20	CD79a	ETBR	IL13Ralpha 2	M-CSF	P2X5	SSX-2
0772P	CD79b	proteína de fusión ETV6-AML1	IL20Rα	MCSP	p53	SSX-4
adipofilina	Cdc27	EZH2	carboxilesterasa intestinal	mdm-2	PAP	STEAP1
AIM-2	CDK4	FcRH1	IRTA2	MDP	PAX5	STEAP1
ALDH1A1	CDKN2A	FcRH2	Calicreína 4	ME1	PBF	STEAP2
alfa actinina 4	CEA	FcRH5	KIF20A	Melan-A / MART-1	PMEL17	survivina
alfafetoproteína	CLL1	FLT3-ITD	KK-LC-1	Meloe	proteína de fusión pml-RARalpha	proteína de fusión SYT-SSX1 o -SSX2
B7-H4	Cw6	GDNF-Ra1	Lengsin	MSG783	PSMA	TGF-betaRII
BAFF-R	CXCR5	GEDA	LGR5	MUC1	PTPRK	TMEFF1
BAGE-1	CXORF61	GFRA1	LY64	MUC5AC	RAB38 / NY-MEL-1	TMEM118
BCLX (L)	ciclina D1	glipicano-3	Ly6E	mucina	RAGE-1	TMEM46
Proteína	Ciclina	GnTVf	Ly6G6D	MUM-1f	RBAF600	TRAG-3

CD22	EpCAM	HERV-K-MEL	MAGE-A9	NY-BR-1	SIRT2	XAGE-1b/GAGED2a
CD33	EphA3	HLA-DOB	MAGE-C1	NY-ESO-1/LAGE-2	SLC35D3	EGFR-T790M;
CD45	EphB2R	hsp70-2	MAGE-C2	OA1	SNRPD1	BMPR1B
CD70	Epiregulin	IDO1	mamaglobin a-A	OGT	SOX10	
CD72	EGFR	IGF2B3	MART2	OS-9	Sp17	
EGFR-G719A	EGFR-G719C;	EGFR-G719S;	EGFR-L858R	EGFR-S768I	EGFR-L861Q	

para CD3 y una segunda molécula biológica que comprende un complejo HLA-péptido seleccionado del grupo constituido por 0772P (CA125, MUC16; GenBank n.° de adhesión AF36148); adipofilina (Perilipina-2, proteína relacionada con la diferenciación adiposa, ADRP, ADFP, MGC10598; secuencia de referencia NCBI: NP_001113.2); AIM-2 (ausente en melanoma 2, PYHIN4, proteína inducible por interferón AIM2; secuencia de referencia NCBI: NP_004824.1); ALDH1A1 (aldehido deshidrogenasa familia 1, miembro A1,

ALDH1, PUMB1, retinaldehido deshidrogenasa 1, ALDC, ALDH-E1, ALHDII, RALDH 1, CE 1.2.1.36, ALDH11, HEL-9 HEL-S-53e, HEL12, RALDH1, acetaldehido deshidrogenasa 1, aldehido deshidrogenasa 1, soluble, aldehido deshidrogenasa, hígado citosólico, ALDH clase 1, proteína luminal epidídimo 12, proteína luminal epidídimo 9, proteína de unión del esperma secretora del epidídimo Li 53e, retinal deshidrogenasa 1, RalDH1, aldehido deshidrogenasa familia 1 miembro A1, aldehido deshidrogenasa, citosólica, CE 1.2.1; secuencia de referencia NCBI: NP_000680.2); alfa-actinina-4 (ACTN4 actinina, Alfa 4, FSGS1, 1 de glomeruloesclerosis segmentaria focal, alfa-actinina 4 no muscular, proteína de unión cruzada F-actina, FSGS, actinina-4, actinina Alpha4 isoforma, alfa-actinina-4; secuencia de referencia NCBI: NP_004915.2); alfa-fetoproteína (AFP, HPAFP, FETA, alfa-1-fetoproteína, alfa-fetoglobulina, alfa-1-fetoproteína, alfa-fetoglobulina, HP; GenBank: AAB58754.1); Anfiregulina (AREG, SDGF, Factor de crecimiento derivado de schwanoma, factor de crecimiento derivado de las células del colorecto, AR, CRDGF; GenBank: AAA51781.1); ARTC1 (ART1, ADP-Ribosiltransferasa 1, Mono (ADP-ribosil) transferasa 1, ADP-Ribosiltransferasa C2 y C3 tipo toxina 1, ART2, CD296, RT6, ADP-Ribosiltransferasa 2, NAD ligado a GPI (+)--arginina ADP-Ribosiltransferasa 1, EC 2.4.2.31, antígeno de CD296; NP); ASLG659; ASPHD1 (aspartato beta-hidroxilasa que contiene 1 dominio, aspartato beta-hidroxilasa que contiene dominio de proteína 1, EC 1.14.11.-, EC 1.14.11; GenBank: AAI44153.1); B7-H4 (VTCN1, inhibidor de activación de células T 1 que contiene dominio V-Set, B7H4, miembro de la superfamilia B7 1, proteína inmunitaria coestimuladora B7-H4, B7h.5, molécula coestimuladora de células T B7x, B7S1, B7X, VCTN1, H4, B7 miembro de la familia, PRO1291, B7 miembro de la familia, H4, molécula coestimuladora de células T B7x, inhibidor de activación de células T 1 que contiene dominio V-Set, proteína B7S1; GenBank: AAZ17406.1); BAFF-R (TNFRSF13C, superfamilia de receptores de factor de necrosis tumoral, miembro 13C, BAFFR, receptor del factor de activación de células B, receptor BAFF, receptor 3 BLyS, CVID4, BROMIX, CD268, receptor del factor de activación de células B, prolixin, miembro de la superfamilia receptora del factor de necrosis tumoral 13C, BR3, antígeno de CD268; secuencia de referencia NCBI: NP_443177.1); BAGE-1; BCLX (L); proteína de fusión BCR-ABL (b3a2); beta-catenina (CTNNB1 catenina (proteína asociada a la caderina), Beta 1, 88kDa, CTNNB, MRD19, catenina (proteína asociada a la caderina), Beta 1 (88kD), armadillo, beta catenina-1; GenBank: CAA61107.1); BING-4 (WDR46, WD repetir dominio 46, C6orf11, BING4, proteína BING4 con repetición de WD, cromosoma 6 marco abierto de lectura 11, FP221, UTP7, proteína 46 con repetición de WD; NP); BMPR1B (receptor tipo IB de proteínas morfogenéticas de hueso, acceso de Genbank n.º NM_00120; NP); B-RAF (Brevican (BCAN, BEHAB, acceso de Genbank n.º AF22905); Brevican (BCAN proteoglicano Condroitín sulfato 7, proteína de unión Hyaluronan enriquecida cerebro, BEHAB, CSPG7, Brevican de proteoglicanos, proteína base Brevican, sulfato de condroitina Proteoglycan BEHAB; GenBank: AAH27971.1); CALCA (polipéptido alfa relacionado a polipéptido, CALC1, calcitonina 1, calcitonina, alfa-tipo CGRP, péptido Calcitonin relacionado al gen I, CGRP-I, CGRP, CGRP1, CT, KC, polipéptido

relacionados con calcitonina y calcitonina, alfa, katacalcin; NP); CASP-5 (CASP5, caspasa 5, cisteína peptidasa relacionada a apoptosis, caspasa 5, cisteína-proteasa relacionada a apoptosis, proteasa ICH-3, proteasa TY, ICE (rel)-III, III ICE (rel), ICEREL-III, ICH-3, caspasa-5, TY proteasa, CE 3.4.22.58, ICH3, EC 3.4.22; NP); CASP-8; CD19 (CD19 - antígeno del linfocito b CD19 isoforma 2 precursor, B4, CVID3 [Homo sapiens], secuencia de referencia NCBI: NP_001761.3); CD20 (CD20 - antígeno de linfocitos b CD20, 4-dominios que atraviesan la membrana, subfamilia A, miembro 1, B1, Bp35, CD20, CVID5, LEU-16, MS4A2, S7; Secuencia de Referencia NCBI: NP_690605.1); CD21 (CD21 (CR2 (receptor de complemento o C3DR (receptor de C3d/Epstein Barr virus) o acceso de Genbank Hs.73792 n.º M2600); (CD22 (B-célula receptor CD22-B isoforma, BL-CAM Lyb-8, Lyb8, SIGLEC-2, FLJ22814, acceso de Genbank n.º AK02646); CD22; CD33 (molécula CD33, antígeno CD33 (Gp67), ácido siálico vinculante Ig-símil lectina 3, ácido siálico vinculante Ig-símil lectina 3, SIGLEC3, gp67, SIGLEC-3, células mieloides superficie antígeno CD33, p67, Siglec-3, antígeno CD33; GenBank: AAH28152.1); CD45; CD70 (CD70 - superfamilia de factores de necrosis tumoral (ligando) miembro 7; antígeno de superficie CD70; Antígeno Ki-24; CD27 Ligando; CD27-L; miembro de la superfamilia de tumor necrosis factor ligand 7; NCBI secuencia de referencia para la especie homo sapiens: NP_001243.1); CD72 (CD72 (antígeno de diferenciación celular B CD72, Lyb-; 359 aa, pI: 8.66, MW: 40225 TM: 1 [P] Cromosoma del gen: 9p13.3, acceso de Genbank n.º NP_001773.); CD79a (CD79a (CD79A, CD79a, asociada a la inmunoglobulina alfa, una proteína específica de células B que covalentemente interactúa con beta Ig (CD79B) y forma un complejo en la superficie con las moléculas de Ig M, transmite una señal implicados en la diferenciación de células B), pI: 4.84, MW: 25028 TM: 2 [P] Cromosoma del gen: 19q13.2, acceso a Genbank n.º NP_001774.1); CD79b (CD79b (CD79B, CD79b, IGb (asociada a la inmunoglobulina beta), B29, acceso a Genbank n.º NM_000626 o 1103867); Cdc27 (ciclo de división celular 27, D0S1430E, D17S978E, subunidad 3 de complejo de promoción de anafase, subunidad 3 de complejo de promoción de anafase, ANAPC3, APC3, CDC27Hs, H-NUC, homólogo del CDC27, homólogo del ciclo 27 de división celular (S. Cerevisiae), HNUC, NUC2, complejo de promoción de anafase, proteína 3, homólogo del ciclo 27 de división celular, homólogo de proteína 27 del ciclo de división celular, homólogo del Nuc2; GenBank: AAH11656.1); Cdk4 (quinasa dependiente de ciclina 4, quinasa de proteína de división de células 4, PSK-J3, CE 2.7.11.22, CMM3, EC 2.7.11; Secuencia de Referencia NCBI: NP_000066.1); CDKN2A (Inhibidor 2A de quinasa dependiente de ciclina, MLM, CDKN2, MTS1, Inhibidor 2A de quinasa dependiente de ciclina (Melanoma, P16, Inhibe CDK4), Inhibidor A de quinasa 4 dependiente de ciclina, Supresor 1 de tumores múltiples, CDK4I, MTS-1, CMM2, P16, ARF, INK4, INK4A, P14, P14ARF, P16-INK4A, P16INK4, P16INK4A, P19, P19ARF, TP16, Inhibidor CDK4 P16-INK4, Reguladores beta negativos de ciclo celular, p14ARF, p16-INK4, p16-INK4a, p16INK4A, p19ARF; NP); CEA; CLL1 (CLL-1 (CLEC12A, MICL, y DCAL, codifica un miembro de la superfamilia de dominio lectina tipo C/similar a lectina tipo C (CTL/CTLD). Los miembros de esta familia comparten un pliegue proteico y tienen

distintas funciones, tales como adhesión de las células, señalización célula-célula, recambio de glucoproteína y funciones en la respuesta inflamatoria e inmune. La proteína codificada por este gen es una reguladora negativa de la función granulocito y monocito. Se han descrito variantes del transcrito de este gen con empalme alternativo, pero no se ha determinado la naturaleza en toda su extensión de algunas de estas variantes. El gen está relacionado de cerca con otros miembros de la superfamilia CTL/CTLD en la región del complejo de genes asesinos naturales en el cromosoma 12p13 (Drickamer K Curr. Opin. Struct. Biol. 9):585–90; van Rhenen A, et ál, Blood 110):2659–66; Chen CH, et ál. Blood 107):1459–67; Marshall AS, et ál. Eur. J. Immunol. 36):2159–69; Bakker AB, et ál Cancer Res. 64 :8443–50; Marshall AS, et ál J. Biol. Chem. 279 :14792–80. Se ha demostrado que CLL-1 es un receptor transmembrana de tipo 2 que comprende un único dominio similar a lectina tipo C (no se prevé que el mismo se una al calcio o al azúcar), la región del tallo, un dominio transmembrana y una cola citoplásmica corta que contiene un motivo ITIM); CLPP (Subunidad proteolítica de peptidasa de matriz mitocondrial caseinolítica, Endopeptidasa Clp, EC 3.4.21.92, PRLTS3, Proteasa ClpAP dependiente de ATP (E. Coli), Homólogo ClpP (Proteasa caseinolítica, Dependiente de ATP, Subunidad proteolítica, E. Coli), Peptidasa caseinolítica ClpP, Dependiente de ATP, Subunidad proteolítica homóloga (E. Coli), Proteasa caseinolítica ClpP, Dependiente de ATP, Subunidad proteolítica homóloga (E. Coli), humana, Subunidad proteolítica, Proteasa ClpAP dependiente de ATP, Subunidad proteolítica, Humana, Peptidasa caseinolítica ClpP dependiente de ATP, Subunidad proteolítica, Peptidasa caseionolítica ClpP, Dependiente de ATP, Subunidad proteolítica homóloga, Subunidad proteolítica de proteasa Clp dependiente de ATP putativo, Mitocondrial; NP); COA-1; CPSF; CRIPTO (CRIPTO (CR, CR1, CRGF, CRIPTO, TDGF1, factor de crecimiento derivado de teratocarcinoma, acceso de Genbank n.° NP_003203 o NM_00321); Cw6; CXCR5 CXCR5 (receptor 1 de linfoma de Burkitt, un receptor acoplado con proteína G que es activado por la quimioquina CXCL13, cumple funciones en la migración de linfocitos y defensa humoral, tiene un rol en la infección HIV-2 y quizás en desarrollo de SIDA, linfoma, mieloma y leucemia); 372 aa, pI: 8.54 MW: 41959 TM: 7 [P] Cromosoma del gen: 11q23.3, acceso Genbank n.° NP_001707.); CXORF61 CXORF61 - cromosoma X marco abierto de lectura 61[Homo sapiens], Referencia de secuencia NCBI: NP_001017978.1); ciclina D1 (CCND1, BCL1, PRAD1, D11S287E, CLL de células B/Linfoma 1, Proteína de linfoma 1 de células B, Oncogene BCL-1, Oncogene PRAD1, Ciclina D1 (PRAD1: Adenomatosis paratiroidea 1), Ciclina D1 específica de G1/S, Adenomatosis paratiroidea 1, U21B31, Ciclina D1 específica de G1/S, BCL-1; Referencia de secuencia NCBI : NP_444284.1); Ciclina-A1 (CCNA1, CT146, Ciclina A1; GenBank: AAH36346.1); proteína de fusión dek-can; DKK1 (Inhibidor 1 de vía de señalización Dickkopf WNT, SK, hDkk-1, Homólogo 1 Dickkopf (Xenopus Laevis), Homólogo Dickkopf 1 (Xenopus Laevis), DKK-1, Homólogo Dickkopf 1, Proteína 1 relacionada con Dickkopf, Símil Dickkopf-1, Proteína 1 símil Dickkopf, Proteína 1 relacionada con Dickkopf, Dickkopf-1, Dkk-1; GenBank: AAQ89364.1); DR1 (Regulador descendiente de transcrito 1, enlace TBP (Cofactor

negativo 2), Cofactor negativo 2-Beta, Fosfoproteína asociada con proteína con enlace TATA, NC2, NC2-BETA, Proteína Dr1, NC2-beta, Regulador descendiente de transcrito 1; Referencia de secuencia NCBI: NP_001929.1); DR13 (Complejo mayor de histocompatibilidad, Clase II, DR Beta 1, HLA-DR1B, DRw10, DW2.2/DR2.2, SS1, DRB1, HLA-DRB, Antígeno de histocompatibilidad HLA Clase II, Cadena DR-1 Beta, Antígeno de leucocito humano DRB1, Antígeno linfocito DRB1, Antígeno MHC Clase II, Cadena MHC Clase II HLA-DR Beta 1, Glucoproteína de superficie celular MHC Clase II HLA-DR, MHC Clase II HLA-DRw10-Beta, DR-1, DR-12, DR-13, DR-14, DR-16, DR-4, DR-5, DR-7, DR-8, DR-9, DR1, DR12, DR13, DR14, DR16, DR4, DR5, DR7, DR8, DR9, DRw11, DRw8, HLA-DRB2, Clon P2-Beta-3, Antígeno DRB1*1 MHC Clase II, Antígeno DRB1*10 MHC Clase II, Antígeno DRB1*11 MHC Clase II, Antígeno DRB1*12 MHC Clase II, Antígeno DRB1*13 MHC Clase II, Antígeno DRB1*14 MHC Clase II, Antígeno DRB1*15 MHC Clase II, Antígeno DRB1*16 MHC Clase II, Antígeno DRB1*3 MHC Clase II, Antígeno DRB1*4 MHC Clase II, Antígeno DRB1*7 MHC Clase II, Antígeno DRB1*8 MHC Clase II, Antígeno DRB1*9 MHC Clase II; NP); E16 (E16 (LAT1, SLC7A5, acceso Genbank n.° NM_00348); EDAR (EDAR - precursor EDAR miembro de la superfamilia de receptores de factor de necrosis de tumor, receptor EDA-A1; homólogo downless; receptor de ectodisplasina A; receptor de displasia ectodérmica; receptor 1 de ectodisplasina anhidrótica, DL; ECTD10A; ECTD10B; ED1R; ED3; ED5; EDA-A1R; EDA1R; EDA3; HRM1 [Homo sapiens]; Referencia de secuencia NCBI: NP_071731.1); EFTUD2 (Factor de elongación Tu GTP de enlace del dominio contenedor 2, Factor de elongación Tu GTP de enlace del dominio contenedor de proteína 2, hSNU114, Homólogo SNU114, Proteína específica de U5 SnRNP, 116 KDa, MFDGA, KIAA0031, 116 KD, Proteína específica de U5 SnRNP, Componente ribonucleico nuclear pequeño 116 KDa U5, MFDM, SNRNP116, Snrp116, Snu114, U5-116KD, SNRP116, U5-116 KDa; GenBank: AAH02360.1); EGFR (Receptor de factor de crecimiento epidérmico, ERBB, Proto-Oncogene C-ErbB-1, Receptor de tirosina-proteína quinasa ErbB-1, ERBB1, HER1, EC 2.7.10.1, Receptor de factor de crecimiento epidérmico (Leucemia eritroblástica aviar viral (V-Erb-B) Oncogene Homólogo), Leucemia eritroblástica viral (V-Erb-B) Oncogene Homólogo (Aviar), PIG61, Leucemia eritroblástica aviar viral (V-Erb-B) Oncogene Homólogo, Proteína 40 inhibidora de crecimiento celular, Proteína 61 de inducción de proliferación celular, mENA, EC 2.7.10; GenBank: AAH94761.1); EGFR-G719A ; EGFR-G719C; EGFR-G719S; EGFR-L858R; EGFR-L861Q; EGFR-S768I; EGFR-T790M; Factor de elongación 2 (EEF2, Factor de elongación 2 de traducción eucariota, EF2, Translocasa polipeptidilo-TRNA, EF-2, SCA26, EEF-2; Referencia de secuencia NCBI: NP_001952.1); ENAH (hMena) (Homólogo habilitado (Drosophila), MENA, Habilitado mamíferos, ENA, NDPP1, Homólogo habilitado de proteína; GenBank: AAH95481.1) – resultados sólo para “ENAH” y no “ENAH (hMena)”; EpCAM (Molécula de adhesión de células epiteliales, M4S1, MIC18, Transductor 1 de la señal de calcio asociado a tumores, TACSTD1, TROP1, Antígeno asociado a adenocarcinoma, Glucoproteína Trop-1 de superficie celular, Gruproteína epitelial 314, Proteína GA733-2 asociada a tumor gastrointestinal severo, EGP314, KSA, DIAR5,

HNPCC8, Antígeno identificado por anticuerpo monoclonal AUA1, EGP-2, EGP40, ESA, KS1/4, MK-1, Glucoproteína 2 epitelial humana, Componente de membrana, Cromosoma 4, Marcador superficial (35kD Glycoprotein), EGP, Ep-CAM, GA733-2, M1S2, CD326 Antígeno, Antígeno de superficie de células epiteliales, hEGP314, Antígeno KS 1/4, ACSTD1; GenBank: AAH14785.1); EphA3 (EPH Receptor A3, ETK1, ETK, TYRO4, HEK, Tirosina quinasa 1 símil Eph, Receptor ETK1 de tirosina-proteína quinasa, EK4, Quinasa 4 símil EPH, EC 2.7.10.1, EPHA3, HEK4, Receptor 3 efrina tipo A, Quinasa 1 de embrión humano, Proteína tirosina quinasa TYRO4, hEK4, Quinasa de embrión humano, Tirosina-proteína quinasa TYRO4, EC 2.7.10; GenBank: AAH63282.1); EphB2R ; Epirregulina (EREG, ER, proepirregulina; GenBank: AAI36405.1); ETBR (EDNRB, Receptor de endotelina tipo B, HSCR2, HSCR, Receptor de endotelina tipo no selectivo, ET-B, ET-BR, ETRB, ABCDS, WS4A, ETB, Receptor de endotelina B; NP); proteína de fusión ETV6-AML1; EZH2 (Potenciadora de zeste homólogo 2 (Drosophila), Lisina N-metiltransferasa 6, ENX-1, KMT6 EC 2.1.1.43, EZH1, WVS, Potenciadora de zeste homólogo 2 (Drosophila), ENX1, EZH2b, KMT6A, WVS2, Histona-lisina N-metiltransferasa EZH2, Potenciadora de zeste homólogo 2, EC 2.1.1; GenBank: AAH10858.1); FcRH1 (FCRL1, Símil receptor Fc 1, FCRH1, Receptor Fc homólogo 1, Proteína 1 símil FcR, Proteína 5 asociada a la translocación del receptor inmune, IFGP1, IRTA5, hIFGP1, Proteína 1 de familia IFGP, CD307a, Proteína 1 símil receptor Fc, Receptor Fc de superfamilia de inmunoglobulina, Gp42, FcRL1, Antígeno CD307a; GenBank: AAH33690.1); FcRH2 (FCRL2, Símil receptor Fc 2, SPAP1, Dominio SH2 con proteína 1 de anclaje de fosfatasa, Receptor Fc homólogo 2, Proteína 2 símil FcR, Proteína 4 asociada a translocación del receptor de inmunoglobulina, FCRH2, IFGP4, IRTA4, Proteína 4 de familia IFGP, SPAP1A, SPAP1B, SPAP1C, CD307b, Proteína 2 símil receptor Fc, Proteína 4 asociada a translocación del receptor inmune, Receptor Fc de superfamilia de inmunoglobulina, Gp42, Dominio SH2 con proteína 1 de anclaje de fosfatasa, FcRL2, Antígeno CD307b; GenBank: AAQ88497.1); FcRH5 (FCRL5, Símil 5 receptor Fc, IRTA2, Receptor Fc homólogo 5, Proteína 5 símil FcR, Proteína 2 asociada a translocación del receptor inmune, BXMAS1, FCRH5, CD307, CD307e, PRO820, Proteína 5 símil receptor Fc, Translocación asociada 2 de receptor de superfamilia de inmunoglobulina (IRTA2), FcRL5, CD307e Antígeno; GenBank: AAI01070.1); FLT3-ITD; FN1(Fibronectina 1, Globulina insoluble en frío, FN, Factor de estimulación de migración, CIG, FNZ, GFND2, LETS, ED-B, FINC, GFND, MSF, fibronectina; GenBank: AAI43764.1); G250 (MN, CAIX, Anhidrasa carbónica IX, Deshidratasa carbónica, Proteína G250 asociada a RCC, Carbonato deshidratasa IX, Membrana antígena MN, Antígeno G250 asociado a carcinoma celular renal, CA-IX, P54/58N, pMW1, Antígeno G250 asociado a RCC, Anhidrasa carbónica 9; NP); - resultados para “G250” y no “G250 / MN / CAIX”; GAGE-1,2,8; GAGE-3,4,5,6,7; GDNF-Ra1 (receptor alfa 1 de la familia GDNF; GFRA1; GDNFR; GDNFRA; RETL1; TRNR1; RET1L; GDNFR-alpha1; GFR-ALPHA-; U95847; BC014962; NM_145793 NM_005264); GEDA (acceso Genbank n.° AY26076); GFRA1 - receptor alfa 1 de la familia GDNF; receptor alfa 1 GDNF; GDNFR-alpha-1; GFR-alpha-1; ligando 1 RET; Factor neurotrópico receptor 1 relacionado con

TGF-beta [Homo sapiens]; ProtKB/Swiss-Prot: P56159.2; glipicano-3 (GPC3, Glipicano 3, SDYS, Glipicano proteoglicano 3, Proteína intestinal OCI-5, GTR2-2, MXR7, SGBS1, DGSX, OCI-5. SGB, SGBS, Proteoglicano de sulfato de heparán, Glipicano 3 secretado, OCI5; GenBank: AAH35972.1); GnTVf ; gp100 (PMEL, Proteína premelanosoma, SILV, D12S53E, PMEL17, SIL, Proteína melanocita Pmel 17, Antígeno GP100 específico para línea de melanocitos, Antígeno ME20 asociado a melanomas, Proteína homóloga locus plata, ME20-M, ME20M, P1, P100, Símil plata (Homólogo ratón), Homólogo plata (ratón), ME20, SI, Proteína melanocita Mel 17, Proteína melanocita PMEL, Martiz melanosomal Proteína17, Plata, Ratón, Homólogo de; GenBank: AAC60634.1); GPC; GPNMB (Glucoproteína (Transmembrana) Nmb, Glucoproteína NMB, Proteína símil glucoproteína Nmb, osteoactivina, Glucoproteína transmembrana HGFIN, HGFIN, NMB, Glucoproteína transmembrana, Glucoproteína transmembrana NMB; GenBank: AAH32783.1); GPR172A (receptor 172A acoplado con proteína G; GPCR41; FLJ11856; D15Ertd747e); NP_078807.1; NM_024531.3); GPR19 (receptor 19 acoplado con proteína G; Mm.478; NP_006134.1; NM_006143.2); GPR54 (receptor KISS1; KISS1R; GPR54; HOT7T175; AXOR1; NP_115940.2; NM_032551.4); HAVCR1 (Receptor celular 1 de virus de hepatitis A, Inmunoglobulina de células T miembro 1 de la familia mucina, Molécula 1 de lesión renal, KIM-1, KIM1, TIM, TIM-1, TIM1, TIMD-1, TIMD1, Receptor 1 de inmunoglobulina mucina de células T, Proteína 1 de membranas de células T, HAVCR, HAVCR-1, Dominio de inmunoglobulina de células T y Proteína 1 de dominio de mucina, HAVcr-1, Inmunoglobulina de células T y Dominio de mucina con proteína 1; GenBank: AAH13325.1); HER2 (ERBB2, V-Erb-B2 Leucemia eritroblástica aviar viral oncogene homólogo 2, NGL, NEU, Oncogene homólogo derivado de neuro/glioblastoma, Proteína de gen 19 de nodo linfático metastásico, Proto-Oncogene C-ErbB-2, Proto-Oncogene Neu, Receptor HER2 de superficie celular tipo tirosina quinasa, MLN 19, p185erbB2, EC 2.7.10.1, V-Erb-B2 Leucemia eritroblástica aviar viral oncogene homólogo 2 (Oncogene homólogo derivado de neuro/glioblastoma), CD340, HER-2, HER-2/neu, TKR1, Proteína C-Erb B2/Neu, herstatina, Oncogene homólogo derivado de neuroblastoma/glioblastoma, Receptor tirosina-proteína quinasa ErbB-2, V-Erb-B2 Leucemia eritroblástica viral oncogene homólogo 2, Oncogene homólogo derivado de neuro/glioblastoma, MLN19, Antígeno CD340, EC 2.7.10; NP); HER-2 / neu – sobrenombre del anterior; HERV-K-MEL ; HLA-DOB (Subunidad beta de la molécula MHC clase II (Antígeno Ia) que liga los péptidos y los une con CD4+ linfocitos T); 273 aa, pI: 6.56, MW: 30820.TM: 1 [P] Cromosoma del gen: 6p21.3, acceso Genbank n.° NP_002111); hsp70-2 (HSPA2, Proteína 2 de golpe de calor 70kDa, Proteína 2 de golpe de calor 70kD, HSP70-3, Proteína 2 asociada con golpe de calor 70 KDa, Proteína 2 de golpe de calor 70 KDa; GenBank: AAD21815.1); IDO1 (Indolamina 2,3-Dioxigenasa 1, IDO, INDO, Indolamina-Pirrol 2,3-Dioxigenasa, IDO-1, Indolamina-Pirrol 2,3 Dioxigenasa, Indolamina 2,3 Dioxigenasa, Indole 2,3 Dioxigenasa, EC 1.13.11.52; Referencia de secuencia NCBI: NP_002155.1); IGF2B3 ; IL13Ralpha2 (IL13RA2, Receptor de interleucina 13, Alfa 2, Antígeno 19 cancer/testículos, Proteína de enlace de interleucina

13, IL-13R-alfa-2, IL-13RA2, IL-13 Subunidad receptora alfa-2, IL-13R Subunidad alfa-2, CD213A2, CT19, IL-13R, IL13BP, Proteína de enlace de interleucina 13, Cadena alfa 2 receptora de interleucina 13, Subunidad alfa 2 receptora de interleucina, IL13R, Antígeno CD213a2; NP); IL20Rα; Carboxilesterasa intestinal; IRTA2 (sobrenombre de FcRH5); Kallikrein 4 (KLK4, Peptidasa 4 relacionada con Kallikrein, PRSS17, EMSP1, Serina proteinasa 1 de la matriz de esmalte, Proteína 1 símil Kallikrein, Serina proteasa 17, KLK-L1, PSTS, AI2A1, Kallikrein 4 (Prostasa, Matriz de esmalte, Próstata), ARM1, EMSP, Mensaje 1 regulado por andrógenos, Serina proteasa 1 de la matriz de esmalte, kallikrein, kallikrein-4, prostasa, EC 3.4.21.-, Prostasa, EC 3.4.21; GenBank: AAX30051.1); KIF20A (Miembro 20A de la familia de quinesina, RAB6KIFL, Interactuación de RAB6, Símil quinesina (Rabkinesin6), Mitotic a; LAGE-1; Proteína LDLR-fusión de fucosiltransferasas; Lengsin (LGSN, Lengsin, Proteína de cristalino con dominio de glutamina sintetasa, GLULD1, Dominio de glutamato-amoníaco ligasa con Proteína 1, LGS, Dominio contenedor 1 de glutamato-amoníaco ligasa (Glutamina sintetasa), Dominio contenedor 1 de glutamato-amoníaco ligasa, Símil glutamina sintetasa de cristalino; GenBank: AAF61255.1); LGR5 (repetición rica en leucina con receptor 5 acoplado con proteína G; GPR49, GPR6; NP_003658.1; NM_003667.2; LY64 (Antígeno linfocitos 64 (RP10, proteína de membrana de tipo I de la familia de repetición rica en leucina (LRR), regula la activación de las células B y la apoptosis, la pérdida de funciones está asociada con un incremento de enfermedades en pacientes con lupus eritematoso sistémico); 661 aa, pI: 6.20, MW: 74147 TM: 1 [P] Cromosoma del gen: 5q12, acceso Genbank n.° NP_005573.; Ly6E (complejo linfocito antígeno 6, locus E; Ly67,RIG-E,SCA-2,TSA-; NP_002337.1; NM_002346.2); Ly6G6D (complejo linfocito antígeno 6, locus G6D; Ly6-D, MEGT; NP_067079.2; NM_021246.2); LY6K (complejo linfocito antígeno 6, locus K; LY6K; HSJ001348; FLJ3522; NP_059997.3; NM_017527.3); dominio LyPD1 - LY6/PLAUR conteniendo 1, PHTS [Homo sapiens], GenBank: AAH17318.1); MAGE-A1 (Familia A de antígenos de melanoma, 1 (Controla la expresión del antígeno MZ2-E, MAGE1, Familia A 1 de antígenos de melanoma, MAGEA1, Antígeno de melanoma MAGE-1, Antígeno 1 asociado a melanoma, Antígeno MZ2-E asociado a melanoma, Antígeno MZ2-E, Antígeno 1.1 cancer/testículos, CT1.1, Antígeno MAGE-1, Familia 1 de antígenos cancer/testículos, Miembro 1, Familia 1 de antígenos cancer/testículos, Miembro 1, MAGE1A; Referencia de secuencia NCBI: NP_004979.3); MAGE-A10 (MAGEA10, Familia A de antígenos de melanoma, 10, MAGE10, Antígeno MAGE-10, Antígeno 10 asociado a melanoma, Antígeno 1.10 cancer/testículos, CT1.10, Familia 1 de antígenos cancer/testículos, Miembro 10, Familia 1 de antígenos cancer/testículos, Miembro 10; Referencia de secuencia NCBI: NP_001238757.1); MAGE-A12 (MAGEA12, Familia A de antígenos de melanoma, 12, MAGE12, Antígeno 1.12 cancer/testículos, CT1.12, Antígeno MAGE12F, Familia 1 de antígenos cancer/testículos, Miembro 12, Familia 1 de antígenos cancer/testículos, Miembro 12, Antígeno 12 asociado a melanoma, Antígeno MAGE-12; Referencia de secuencia NCBI: NP_001159859.1); MAGE-A2 (MAGEA2, Familia A de antígenos de melanoma, 2, MAGE2, Antígeno 1.2 cancer/testículos, CT1.2, MAGEA2A,

Antígeno MAGE-2, Familia 1 de antígenos cancer/testículos, Miembro 2, Familia 1 de antígenos cancer/testículos, Miembro 2, Antígeno 2 de melanoma, Antígeno 2 asociado a melanoma; Referencia de secuencia NCBI: NP_001269434.1); MAGE-A3 (MAGEA3, Familia A de antígenos de melanoma, 3, MAGE3, Antígeno MAGE-3, Antígeno MZ2-D, Antígeno 3 asociado a melanoma, Antígeno 1.3 cancer/testículos, CT1.3, Familia 1 de antígenos cancer/testículos, Miembro 3, HIP8, HYPD, MAGEA6, Familia 1 de antígenos cancer/testículos, Miembro 3; Referencia de secuencia NCBI: NP_005353.1); MAGE-A4 (MAGEA4, Familia A de antígenos de melanoma, 4, MAGE4, Antígeno 4 asociado a melanoma, Antígeno 1.4 cancer/testículos, CT1.4, Antígeno MAGE-4, Antígeno MAGE-41, Antígeno MAGE-X2, MAGE4A, MAGE4B, Familia 1 de antígenos cancer/testículos, Miembro 4, MAGE-41, MAGE-X2, Familia 1 de antígenos cancer/testículos, Miembro 4; Referencia de secuencia NCBI: NP_001011550.1); MAGE-A6 (MAGEA6, Familia A de antígenos de melanoma, 6, MAGE6, Antígeno MAGE-6, Antígeno 6 asociado a melanoma, Antígeno 1.6 cancer/testículos, CT1.6, Antígeno MAGE3B, Familia 1 de antígenos cancer/testículos, Familia A 6 de antígenos de melanoma, Miembro 6, MAGE-3b, MAGE3B, Familia 1 de antígenos cancer/testículos, Miembro 6; Referencia de secuencia NCBI: NP_787064.1); MAGE-A9 (MAGEA9, Familia A de antígenos de melanoma, 9, MAGE9, Antígeno MAGE-9, Antígeno 9 asociado a melanoma, Antígeno 1.9 cancer/testículos, CT1.9, Familia 1 de antígenos cancer/testículos, Miembro 9, Familia 1 de antígenos cancer/testículos, Miembro 9, MAGEA9A; Referencia de secuencia NCBI: NP_005356.1); MAGE-C1 (MAGEC1, Familia C de antígenos de melanoma, 1, Antígeno 7.1 cancer/testículos, CT7.1, Antígeno MAGE-C1, Familia 7 de antígenos cancer/testículos, Miembro 1, CT7, Familia 7 de antígenos cancer/testículos, Miembro 1, Antígeno C1 asociado a melanoma; Referencia de secuencia NCBI: NP_005453.2); MAGE-C2 (MAGEC2, Familia C de antígenos de melanoma, 2, MAGEE1, Antígeno 10 cancer/testículos, CT10, HCA587, Familia E de antígenos de melanoma, 1, Específico de cancer/testículos, Antígeno 587 asociado a carcinoma hepatocelular, Antígeno MAGE-C2, Antígeno MAGE-E1, Hepatocellular Cancer Antígeno 587 de cancer hepatocelular, Antígeno C2 asociado a melanoma; Referencia de secuencia NCBI: NP_057333.1); mamaglobina-A (SCGB2A2, Secretoglobina, Familia 2A, Miembro 2, MGB1, Mamaglobina 1, UGB2, Mamaglobina A, mamaglobina-A, mamaglobina-1, Familia Secretoglobina 2A Miembro 2; NP); MART2 (HHAT, Aciltransferasa de puercoespín, SKI1, Antígeno de melanoma reconocido por células T 2, Proteína 1 de puercoespín flaco, Skn, Antígeno de melanoma reconocido por células T 2, Proteína-cisteína N-palmitoiltransferasa HHAT, EC 2.3.1.-; GenBank: AAH39071.1); M-CSF (CSF1, Estimulante de colonia factor 1 (Macrófago), MCSF, CSF-1, lanimostim, Factor 1 de estímulo de colonia de macrófago humano, Lanimostim; GenBank: AAH21117.1); MCSP (SMCP, Proteína rica en cisteína asociada a la mitocondria del espermatozoide, MCS, Selenoproteína de cápsula mitocondrial, HSMCSGEN1, Proteína rica en cisteína asociada a la mitocondria del espermatozoide; Referencia de secuencia NCBI: NP_109588.2); XAGE-1b/GAGED2a; WT1 (Tumor 1 de Wilms, WAGR, GUD, WIT-2, WT33, Dominio amino-terminal de EWS, NPHS4, Últimos tres dedos de zinc

del dominio de enlace de ADN de WT1, AWT1, Proteína de tumor de Wilms, EWS-WT1; GenBank: AAB33443.1); VEGF; Tirosinasa (TYR; OCAIA; OCA1A; tirosinasa; SHEP; NP_000363.1; NM_000372.4; GenBank: AAB60319.1); TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, posible canal de catión del receptor transitorio, subfamilia M, miembro 4, acceso de Genbank n.º NM_01763); TRP2-INT2; TRP-2 ; TRP-1 / gp75 (Proteína 1 relacionada a la tirosinasa, 5,6-dihidroxindol-2-Oxidasa ácido carboxílico, CAS2, CATB, TYRP, OCA3, Catalasa B, PROTEÍNA b, glucoproteína 75, CE 1.14.18., Antígeno Melanoma Gp75, TYRP1, TRP, TYRRP, TRP1, SHEP11, Oxidasa DHICA, CE 1.14.18, GP75, CE 1.14.18.1; Triosa fosfato isomerasa (Triosa fosfato isomerasa 1, TPID, Triosa fosfato isomerasa, HEL-S-49, TIM, Proteína secreción epidídimo Li 49, TPI, Triosa fosfato isomerasa, CE 5.3.1.1; TRAG-3 (Miembro de la familia CSAG 2, Familia de antígeno Cáncer/Testículos 24, CSAG3B, Miembro 2, Miembro de la familia CSAG 3B, Familia de antígeno Cáncer/Testículos 24 Miembro 2, Antígeno Cáncer/Testículos 24.2, Gen asociado a la condrosarcoma 2/3 Proteína, Proteína asociada resistente a Taxol Gen 3, Gen asociado a la condrosarcoma 2/3 proteína-símil, CT24.2, Gen 3 asociado resistente a Taxol, TRAG-3, CSAG3A, TRAG3;); TMEM46 (homólogo 2 shisa (Xenopus laevis); SHISA; NP_001007539.1; NM_001007538.1; TMEM118 (proteína dedo angular, transmembrana2; RNFT2; FLJ1462; NP_001103373.1; NM_001109903.1; TMEFF1 (proteína transmembrana con EGF-símil y dos dominios folistatina-símil 1; Tomoregulin- ; H7365; C9orf2; C9ORF2; U19878; X83961; NM_080655; NM_003692; TGF-betaRII (TGFBR2, factor de crecimiento transformador, Receptor Beta II (70/80kDa), TGFbeta-RII, MFS2, tbetaR-II, TGFR-2, Receptor TGF-Beta Tipo IIB, Receptor TGF-Beta Tipo II, Receptor TGF-Beta Tipo 2, EC 2.7.11.30, Receptor beta de factor de crecimiento transformador tipo IIC, AAT3, TbetaR-II, factor de crecimiento transformador, Receptor beta II (70-80kD), Receptor TGF-Beta tipo II, FAA3, Receptor beta de factor de crecimiento transformador tipo III, LDS1B, HNPCC6, LDS2B, LDS2, RIIC, CE 2.7.11, TAAD2; TENB2 (TMEFF2, tomoregulin, TPEF, HPP1, TR, proteoglican transmembranosos putativo, relacionado a la familia EGF/heregulina de factores de crecimiento y folistatina); 374 aa, Accesión NCBI: AAD55776, AAF91397, AAG49451, NCBI RefSeq: NP_057276; Gen NCBI: 23671; OMIM: 605734; SwissProt Q9UIK5; Acceso de Genbank N.º AF179274; AY358907, CAF85723, CQ782436; TAG-2; TAG-1 (Contactin 2 (Axonal), TAG-1, AXT, Molécula de adhesión celular Axonin-1, TAX, Contactin 2 (expresada transitoriamente), TAX1, Contactin-2, Glucoproteína axonal TAG-1, Glucoproteína axona expresada transitoriamente, Glucoproteína axonal transitoria, Axonin-1, TAX-1, TAG1, FAME5; PRF: 444868); SYT-SSX1 o -SSX2 proteína de fusión; survivin; STEAP2 (HGNC_8639, IPCA-1, PCANAP1, STAMP1, STEAP2, STMP, gen 1 asociado al cáncer de próstata, proteína 1 asociada al cáncer de próstata, seis antígenos epiteliales de próstata 2, seis proteínas de próstata transmembrana, Genbank accession no. AF45513; STEAP1 (seis antígenos epiteliales de próstata, Acceso de Genbank n.º NM_01244; SSX-4; SSX-2 (SSX2, Sarcoma sinovial, X Breakpoint2, X Breakpoint 2, SSX, X Breakpoint 2B, Antigeno Cáncer/Testículos 5.2, X-Cromosoma-Relacionado 2, Antígeno tumoral HOM-MEL-40,

CT5.2, HD21, Antígeno Cáncer/Testículos Familia 5, HOM-MEL-40, Isoforma B, Antígeno Cáncer/Testículos Familia 5 miembro 2a, miembro 2a, Proteína SSX2, Sarcoma, Sarcoma, Sinovial, X-Cromosoma-Relacionada 2, sinovial, Sarcoma sinovial, X Breakpoint 2B, Sarcoma sinovial, SSX2A; Sp17; SOX10 (SRY (Región determinadora de sexo Y)-Box 10, ratón, PCWH, DOM, WS4, WS2E, WS4C, Megacolon dominante, ratón, Homologo humano de, Megacolon dominate, SRY-relacionado HMG-Box Gen 10, Homologo humano de,Factor de transcripción SOX-10; GenBank: CAG30470.1); SNRPD1 (pequeña ribonucleoproteina nuclear D1, pequeña ribonucleoproteina nuclear D1, polipéptido 16kDa, polipéptido (16kD), SNRPD, HsT2456, Sm-D1, SMD1, Sm-D autoantígeno, pequeña ribonucleoproteina nuclear D1 polipéptido 16kDa Pseudogene, SnRNP Proteína principal D1, pequeña ribonucleoproteina nuclear Sm D1; SLC35D3 (soluto compañía familia 35, miembro D3, FRCL1, Proteína de conexión limítrofe-símil 1, bA55K22.3, Frc, Límite-símil 1, soluto compañía familia 35 miembro D3; NCBI GenBank: NC_000006.11 NC_018917.2 NT_025741.16); SIRT2 (Sirtuina 2, NAD-dependiente deacetilasa sirtuin-2, SIRL2, silencio información regulatorio 2, Proteína reguladora SIR2 Homólogo 2, Proteína Sir2-Relacionada yipo 2, Proteína 2 SIR2-símil, Sirtuina tipo 2, Sirtuina (Regulación de información de tipo de apareamiento silencioso 2 homóloga) 2 (S.Cerevisiae), Sirtuina-2, Sirtuina (Regulación de información de tipo de apareamiento silencioso 2, S.Cerevisiae, Homóloga) 2, CE 3.5.1., SIR2; GenBank: AAK51133.1); Sema 5b (FLJ10372, KIAA1445, Mm.42015, SEMA5B, SEMAG, Semaforina 5b Hlog, dominio sema, siete repeticiones de trombospondina (tipo 1 y tipo 1-símil), dominio transmembrana (TM) y dominio citoplásmico corto, (semaforina) 5B, acceso de Genbank n.º AB04087; secernina 1 (SCRN1, SES1, KIAA0193, secerina-1; GenBank: EAL24458.1); SAGE (SAGE1, Antígeno sarcoma 1, Antígeno Cáncer/Testículos 14, CT14, Antígeno de tumor putativo; Secuencia de referencia NCBI: NP_061136.2); RU2AS (KAAG1, Antígeno asociado al riñón 1, RU2AS, RU2 Proteína del gen antisentido, Antígeno asociado al riñón 1; GenBank: AAF23613.1); RNF43 - E3 ligasa ubiquitina-proteína RNF43 precursor [Homo sapiens], RNF124; URCC; Secuencia de referencia: NP_060233.3; RhoC (;RGS5 (Regulador de señalización de proteína-G 5, MSTP032, Regulador de señalización de proteína-G 5, MSTP092, MST092, MSTP106, MST106, MSTP129, MST129; GenBank: AAB84001.1); RET (proto-oncogen RET; MEN2A; HSCR1; MEN2B; MTC1; PTC; CDHF12; Hs.168114; RET51; RET-ELE; NP_066124.1; NM_020975.4); RBAF600 (UBR4, ligasa proteína ubiquitina E3 componente N-Recognin 4, dedo de zinc, UBR1 Type 1, ZUBR1, E3 ligasa ubiquitina-proteína UBR4, RBAF600, Factor 600 KDa retinoblastoma asociada a la proteína, Proteína 1 dedo de zinc tipo UBR1, EC 6.3.2., N-recognin-4, KIAA0462, p600, CE 6.3.2, KIAA1307; GenBank: AAL83880.1); RAGE-1 (MOK, proteína quinasa MOK, Antígeno del tumor renal, RAGE, MAPK/MAK/MRK quinasa superpuesta, Antígeno del tumor renal 1, Antígeno del carcinoma de células renales, RAGE-1, CE 2.7.11.22, RAGE1; UniProtKB/Swiss-Prot: Q9UQ07.1); RAB38 / NY-MEL-1 (RAB38, NY-MEL-1, RAB38, Miembro RAS familia oncógena, Antígeno del melanoma NY-MEL-1, Proteína de unión de GTP relacionada aRab, Proteína relacionada a Ras Rab-38, rrGTPbp; GenBank:

AAH15808.1); PTPRK (DJ480J14.2.1 (Fosfatasa tirosina de proteína, Tipo receptor, K R-PTP-KAPPA, Kappa Fosfatasa tirosina de proteína, Kappa Fosfatasa tirosina de proteína), Fosfatasa tirosina de proteína, Tipo receptor, K, Kappa Fosfatasa tirosina de proteína, Fosfatasa tirosina de proteína, Tipo receptor, Kappa, R-PTP-kappa, Kappa Fosfatasa tirosina de proteína tipo receptor, CE 3.1.3.48, PTPK; GenBank: AAI44514.1); PSMA; PSCA hlg(2700050C12Rik, C530008O16Rik, RIKEN cDNA 2700050C12, RIKEN cDNA 2700050C12 gen, acceso de Genbank n.º AY358628); PSCA (Procursor del antígeno de células madre de la próstata, acceso de Genbank n.º AJ29743; ; PRDX5 (Peroxiredoxina 5, CE 1.11.1.15, TPx Tipo VI, B166, Enzima antioxidante B166, HEL-S-55, Tejido del hígado página 2D punto 71B, PMP20, Enzima antioxidante peroxisoma, PRDX6, Tioredoxina peroxidasa PMP20, PRXV, AOEB166, Proteína secretora de epidermis Li 55, Alu co-represor 1, Peroxiredoxina-5, Mitocondrial, Peroxiredoxina V, prx-V, Tioredoxina Reductasa, Prx-V, ACR1, Alu Corepressor, PLP; GenBank: CAG33484.1); PRAME (Antígeno expresado preferencialmente en melanoma, Antígeno expresado preferencialmente del melanoma, MAPE, OIP-4, OIPA, CT130, Antígeno Cáncer/Testículos 130, Antígeno melanoma expresado preferiblemente en tumores, Proteína de interacción con Opa 4, Proteína de interacción con Opa 4; GenBank: CAG30435.1); proteína de fusión pml-RARalpha; PMEL17 (homólogo plata; SILV; D12S53E; PMEL17; SI; SIL); ME20; gp10 BC001414; BT007202; M32295; M77348; NM_006928; PBF (ZNF395, proteína de dedo de zinc 395, PRF-1, Regulatorio de la enfermedad de Huntington, Proteína de unión de región regulatoria del gen HD, Proteína 2 de union de región, Proteínna 2, Factor 1 regulatorio del virus del papiloma, factor 2 regulatorio de HD, Factor regulatorio del virus del papiloma, PRF1, HDBP-2, Si-1-8-14, HDBP2, Proteína 2 de unión de región regulatoria del gen de la enfermedad de Huntington 2, HDRF-2, Factor PRF-1 regulatorio del virus del papiloma, PBF; GenBank: AAH01237.1); PAX5 (Paired Box 5, Gen 5 homeótico Paire5, BSAP, caja pareada de proteína Pax-5, Activador específico del linaje celular, Gen 5 de dominio pareado, caja pareada de gen 5 (Proteína activadora específica del linaje de células B), factor de transcripción específico de células B, caja pareada de gen 5 (activador específico del linaje de células B); PAP (REG3A, Alfa 3 derivado de islote regenerador, INGAP, PAP-H, Proteína pancreática Hepatointestinal, PBBCGF, Péptida de islote pro humana, REG-III, Proteína 1 asociada a la pancreatitis, Reg3, Reg III-Alfa, páncreas-intestinal-hepatocarcinoma, Proteína regeneradora derivada de islote III-Alfa, Factor de crecimiento celular Beta pancreático, HIP, Proteína PAP homóloga, HIP/PAP, Proteína inductora de proliferación 34, PAP1, Proteína inductora de proliferación 42, REG-3-alfa, Proteína regeneradora derivada de islote 3-Alfa, Proteína asociada a la Pancreatitis; GenBank: AAH36776.1); p53 (TP53, Proteína de tumores P53, TPR53, P53, Antígeno de tumor celular P53, Antígeno NY-CO-13, Proteína de tumor mutante 53, Fosfoproteína P53, P53 Supresor de tumores, BCC7, Proteína relacionada a la transformación 53, LFS1, Proteína de tumor 53, Síndrome Li-Fraumeni, Supresor de tumores P53; P2X5 (Receptor purinérgico P2X canal 5 con ventanas ligando, un canal de ion con ventana por ATP

extracelular, puede estar involucrado en la transmisión sináptica y la neurogénesis, la insuficiencia puede contribuir a la patofisiología de la inestabilidad del detrusor idiopático); 422 aa), pI: 7.63, MW: 47206 TM: 1 [P] Cromosoma del gen: 17p13.3, Acceso de GenBank N.º NP_002552.; OGT (Vinculado-O N-acetilglucosamina (GlcNAc) transferasa, O- GlcNAc transferasa P110 Subunidad, Vinculado-O N-acetilglucosamina (GlcNAc) transferasa (UDP-N-acetilglucosamina: Polipéptido-N-acetilglucosaminil transferasa, UDP-N-Acetylglucosamine--péptido N- acetilglucosaminiltransferasa 110 KDa Subunidad, UDP-N-acetilglucosamina: polipéptido-N-acetilglucosaminil transferasa, Difosfouridina-N-acetilglucosamina: polipéptido Beta-N-acetilglucosaminil transferasa, O- GlcNAc transferasa Subunidad P110, CE 2.4.1.255, Vinculado-O N-acetilglucosamina transferasa 110 KDa Subunidad, CE 2.4.1, HRNT1, CE 2.4.1.186, O-GlcNAc; GenBank: AAH38180.1); OA1 (Osteoartritis QTL 1, OASD; GenBank: CAA88742.1); NY-ESO-1/LAGE-2 (cáncer/testículo antígeno 1B, CTAG1B, NY-ESO-1, LAGE- 2, ESO1, CTAG1, CTAG, LAGE2B, antígeno cáncer/testículo 1, Antígeno cáncer/testículo Autoimmunogénico NY- ESO-1, Antígeno ancer 3, antígeno cáncer/testículo 6,1, Carcinoma de células escamosas del esófago Nueva York 1, L antígeno miembro de la Familia 2, LAGE2, CT6.1, LAGE2A; GenBank: AAI30365.1); NY-BR-1 (ANKRD30A, Dominio repetido Ankirina 30A, antígeno cáncer de pecho NY- BR- 1, Antígeno de cáncer de seno definido serológicamente NY-BR-1, Proteína con contenido de dominio repetido Ankirina 30A; Secuencia de Referencia NCBI: NP_443723.2); N-ras (NRAS, neuroblastoma RAS virales (V-Ras) Homólogo oncogen, NRAS1, Transformando la Proteína N-Ras, GTPase ANR, ALPS4, Proteína N-Ras Parte 4, NP6, Homólogo oncogen, HRAS1; GenBank: AAH05219.1); FJCN (factor de transcripción nuclear Y, Gamma, Hap5, HSM, Factor de transcripción nuclear Y Subunidad C, transactivador HSM-1/2 media, CCAAT subunidad de unión al factor C, NF-YC, CCAAT de transcripción de unión factor subunidad gamma, caja CAAT ADN-proteína de unión subunidad C, Subunidad de grandes dimensiones 2A del factor de unión de transcripción Histona H1, CBFC, Factor de transcripción nuclear Y subunidad gamma, CBF-C, transactivador HSM-1, H1TF2A, factor de transcripción NF-Y, C subunidad; neo-PAP (PAPOLG, Poly (A) polimerasa gamma, Neo-poli (A) polimerasa, Nuclear poli (A) polimerasa gamma, Polinucleótido adeniltransferasa gamma, SRP ARN 3" Enzima adelinato PAP2, PAP-gamma, Neo-PAP, SRP ARN 3" Enzima adelinato, PAP2, CE 2.7.7.19, PapG; Secuencia de Referencia NCBI: NP_075045.2); NCA (CEACAM6, acceso de GenBank n.º M1872); Napi3b (NAPI-3B, NPTIIb, Slc34a2, familia transportista de soluto 34 (fosfato de sodio), miembro 2, tipo II transportador de fosfato 3b dependiente de sodio, acceso de GenBank n.º NM_00642); Miosina clase I; MUM-3; MUM-2 (TRAPPC1, Subunidad 1 compleja de partículas de proteína de tráfico, BET5, Homólogo de BET5, MUM2, melanoma ubicuo mutado 2, Proteína de mieloma múltiple 2, Subunidad 1 compleja de partículas de proteína de tráfico; MUM-1f ; mucina (MUC1, mucina 1, célula superficiales asociadas, PEMA, PUM, CA 15-3, MCKD1, ADMCKD, Enfermedad de riñón medular quística 1 (autosómica dominante), ADMCKD1, mucina 1, transmembrana, CD227, Antígeno asociado al

carcinoma de seno DF3, MAM6, Antígeno de cáncer 15-3, MCD (Documento de Control de Materiales), Carcinoma asociada mucina, MCKD, Krebs Von Den Lungen-6, MUC-1/SEC, Mucina urinaria reactiva al maní, MUC1/ZD, Antígeno de emembrana epitelial asociada a tumores, Antígeno DF3, Mucina asociada a tumores, episialin, EMA, Antígeno de H23, H23AG, mucina-1, KL-6, Mucina epitelial asociada a tumores, MUC-1, Episialin, PEM, Antígeno CD227; UniProtKB/Swiss-Prot: P15941.3); MUC5AC (mucina 5AC, moco/formadores de gel oligoméricico, mucina traqueobronquial, MUC5, TBM, mucina 5, subtipos A y C, traqueobronquial/gástrico, LEB, mucina gástrica, mucina 5AC, pseudogen moco/formadores de gel oligomérico, antígeno del grupo de sangre Lewis B, LeB, vías respiratorias de la glucoproteína principales, MUC- 5AC, mucina 5 subtipo AC, traqueobronquial; MUC1 (mucina 1, superficie celular asociada, PEMA, PUM, CA 15-3, MCKD1, ADMCKD, enfermedad quística medular renal 1 (autosómica dominante), ADMCKD1, mucina 1, transmembrana, CD227, antígeno DF3 asociado al carcinoma de seno, MAM6, antígeno de cáncer 15-3, MCD (Documento de Control de Materiales), mucina asociada al carcinoma, MCKD, Krebs Von Den Lungen-6, MUC1/SEC, mucina urinaria reactiva al maní, MUC-1/X, mucina epithelial polimórfica, MUC1/ZD, antígeno de membrana epithelial asociado a tumores, antígeno DF3, mucina asociada a tumores, episialin, EMA, antígeno de h23, H23AG, mucina-1, KL-6, mucina epithelial asociada a tumores, MUC1, Episialin, PEM, antígeno de CD227; ; MSG783 (RNF124, proteína hipotética FLJ20315, acceso de GenBank n.º NM-01776; MRP4 - proteína 4 isoforma 3 asociada a la resistencia a múltiples fármacos, MOAT-B; MOATB [Homo sapiens]; Secuencia de Referencia NCBI: NP_001288758.1; MPF (MPF, MSLN, SMR, megacariocitos potenciando el factor, mesothelin, Genbank adhesión no. NM_00582; MMP-7 (MMP7, matrilysin, MPSL1, matrin, 7 metaloproteinasa de la matriz (útero, Matrilysin), Matrilysin uterina, metaloproteinasa de la matriz-7, CE 3.4.24.23, bomba-1 proteasa, Matrin, Metaloproteinasa uterina, PUMP1, MMP-7, CE 3.4.24, bomba-1; GenBank: AAC37543.1); MMP-2 (MMP2, matriz curación 2 (gelatinasa A, 72kDa gelatinasa, 72kDa tipo colagenasa IV), MONA, CLG4A, metaloproteinasa de la matriz 2 (gelatinasa A, 72kD gelatinasa, 72kD tipo colagenasa IV), CLG4, 72kDa gelatinasa, 72kDa tipo colagenasa IV), matriz metaloproteinasa-2, MMP-II, 72 KDa gelatinasa, colagenasa tipo IV-A, MMP-2, metaloproteinasa de la matriz-II, TBE-1, gelatinasa neutrófila, CE 3.4.24.24, CE 3.4.24; GenBank: AAH02576.1); y Meloe.

Por ejemplo, en algunas situaciones, un anticuerpo anti CD3 que tiene un primer dominio de unión puede comprender al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis regiones hipervariables (RHV) que se seleccionan de (a) una RHV-H1 que consta en una secuencia de aminoácidos con N°. de ID de SEC.: 1; (b) una RHV-H2 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.° de ID de SEC.: 2; (c) una RHV-H3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 3; (d) una RHV-L1 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 4; (e) una RHV-L2 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 5; y (f) una RHV-L3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 6, como 40G5c, puede tener un segundo dominio

de unión que se une con CD20.

En algunas situaciones, un anticuerpo anti CD3 que tiene un primer dominio de unión puede comprender al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis regiones hipervariables (RHV) que se seleccionan de (a) una RHV-H1 que consta en una secuencia de aminoácidos con N°. de ID de SEC.: 1; (b) una RHV-H2 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.° de ID de SEC.: 2; (c) una RHV-H3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 3; (d) una RHV-L1 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 4; (e) una RHV-L2 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 5; y (f) una RHV-L3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 6, como 40G5c, puede tener un segundo dominio de unión que se une con HER2. El segundo dominio de unión que se liga con HER2 puede, por ejemplo, comprender de al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis regiones hipervariables (RHV) que se seleccionan de (a) una RHV-CD20 que consta en una secuencia de aminoácidos con N°. de ID de SEC.: 169; (b) una RHV-H2 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.° de ID de SEC.: 170; (c) una RHV-H3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 171; (d) una RHV-L1 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 172; (e) una RHV-L2 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 173; y (f) una RHV-L3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 174, como las que tiene el anticuerpo anti HER2, hu4D5. En algunas situaciones, el segundo dominio de unión que une HER2 contiene al menos una (p.ej., 1, 2, 3, o 4) de las regiones del marco de las cadenas pesadas FR-H1, FR-H2, FR-H3, y FR-H4 que consiste en las secuencias de N.º de ID de SEC.: 549-552, respectivamente, y/o al menos una (p.ej., 1, 2, 3, o 4) de las regiones del marco de la cadena liviana FR-L1, FR-L2, FR-L3, y FR-L4 que consiste en las secuencias de N.º de ID de SEC.: 553-556, respectivamente. En algunas situaciones, el segundo dominio de unión que se liga con HER2 puede, por ejemplo, comprender de (a) un dominio de VH que consta de una secuencia de animoácidos que tiene al menos una identidad de secuencia del 90% (p.ej., con una identidad de secuencia de al menos el 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%) con, o la secuencia de, N.° de ID de SEC.: 270; (b) un dominio de VL que consta de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una identidad de secuencia del 90% (p.ej., con una identidad de secuencia de al menos el 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%) con, o la secuencia de, N.° de ID de SEC.: 271; o (c) un dominio de VH como en (a) y un dominio de VL como en (b).

En algunas situaciones, un anticuerpo anti CD3 que tiene un primer dominio de unión puede comprender al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis regiones hipervariables (RHV) que se seleccionan de (a) una RHV-H1 que consta en una secuencia de aminoácidos con N°. de ID de SEC.: 7; (b) una RHV-H2 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.° de ID de SEC.: 8; (c) una RHV-H3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 9; (d) una RHV-L1 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 10; (e) una RHV-L2 que consiste en una secuencia de

aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 11; y (f) una RHV-L3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 12, como 38E4v1, puede tener un segundo dominio de unión que se une con HER2. El segundo dominio de unión que se liga con HER2 puede, por ejemplo, comprender de al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis regiones hipervariables (RHV) que se seleccionan de (a) una RHV-CD20 que consta en una secuencia de aminoácidos con N°. de ID de SEC.: 169; (b) una RHV-H2 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.° de ID de SEC.: 170; (c) una RHV-H3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 171; (d) una RHV-L1 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 172; (e) una RHV-L2 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 173; y (f) una RHV-L3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 174, como las que tiene el anticuerpo anti HER2, hu4D5. En algunas situaciones, el segundo dominio de unión que se liga con HER2 puede, por ejemplo, comprender de (a) un dominio de VH que consta de una secuencia de animoácidos que tiene al menos una identidad de secuencia del 90% (p. ej., con una identidad de secuencia de al menos el 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%) con, o la secuencia de, N.° de ID de SEC.: 270; (b) un dominio de VL que consta de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una identidad de secuencia del 90% (p. ej., con una identidad de secuencia de al menos el 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%) con, o la secuencia de, N.° de ID de SEC.: 271; o (c) un dominio de VH como en (a) y un dominio de VL como en (b).

.

En algunas versiones, también se pueden utilizar anticuerpos biespecíficos para localizar agentes citotóxicos en células que expresan un antígeno tumoral, como los antígenos tumorales que aparecen en la Tabla 1 (p. ej. CD20, FcRH5, HER2, LYPD1, LY6G6D, PMEL17, LY6E, CD19, CD33, CD22, CD79A, CD79B, EDAR, GFRA1, MRP4, RET, Steap1, o TenB2). También se pueden preparar anticuerpos biespecíficos como fragmentos o anticuerpos completos.

Entre las técnicas para crear anticuerpos específicos se encuentran, pero no se limitan a, coexpresión recombinante de dos pares de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina con especificidades diferentes (consulte Milstein y Cuello, *Nature* 305: 537 (1983)), WO 93/08829, y Traunecker et ál., *EMBO J.* 10: 3655 (1991)), ingeniería "botón en ojal" (consulte, p. ej., patente de EE.UU. N.° 5.731.168). Se puede utilizar la ingeniería de "botón en ojal" para generar un primer grupo que contenga un botón y un segundo grupo que contenga un ojal que se pueda unir con el botón del primer grupo. El botón de los anticuerpos mutiespecíficos de la invención puede estar en un grupo anti-CD3 en una versión. De forma alternativa, el botón de los anticuerpos mutiespecíficos de la invención puede estar en un grupo anti-objetivo/antígeno en una versión. El ojal de los anticuerpos mutiespecíficos de la invención puede estar en un grupo anti-CD3 en una versión. De forma alternativa, el ojal de los anticuerpos multiespecíficos de la invención puede estar en un grupo anti-objetivo/antígeno en una versión. También se pueden crear anticuerpos multiespecíficos con tecnología de cruzado de inmunoglobulina

(también conocida como intercambio de dominio Fab o formato CrossMab) (consulte p. ej., WO2009/080253; Schaefer et ál., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108:11187-11192 (2011)). También se pueden crear anticuerpos multiespecíficos por medio de efectos reguladores electrostáticos para la creación de moléculas heterodiméricas del Fc del anticuerpo (WO 2009/089004A1); con una unión cruzada de dos más anticuerpos o fragmentos (consulte, p. ej., patente de EE.UU. N.° 4.676.980, y Brennan et ál., Science, 229: 81 (1985)); con una cremallera de leucina para producir anticuerpos biespecíficos (consulte, p. ej., Kostelny et ál., J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992)); con tecnología "diacuerpo" para crear fragmentos de anticuerpo biespecíficos (consulte, p. ej., Hollinger et ál., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)); y con dímeros de fragmento Fv de cadena sencilla (sFv, por su sigla en inglés) (consulte, p. ej., Gruber et ál., J. Immunol., 152:5368 (1994)); y preparando anticuerpos triespecíficos como se indica, p. ej., en Tutt et ál. *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

Los anticuerpos creados con tres o más sitios de unión de antígenos funcionales, entre ellos los "anticuerpos pulpo", también se incluyen en este documento (consulte, p. ej., US 2006/0025576A1).

Estos anticuerpos, o sus fragmentos, también pueden incluir "fragmentos FAb de doble acción" o "DAF" (por su sigla en inglés) que constan de un sitio de unión de antígeno que se une a CD3 y a otro antígeno diferente (p. ej., una segunda molécula biológica) (consulte, p. ej., US 2008/0069820).

7. Variantes de Anticuerpos

Se contemplan en algunas versiones las variantes de las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos anti-CD3 de la invención (p. ej., los anticuerpos anti-CD3 biespecíficos de la invención que se unen a CD3 y a una segunda molécula biológica como, p. ej., el antígeno de superficie de una célula, p. ej., el antígeno de un tumor, como los anticuerpos TDB de la invención o las variantes correspondientes). Por ejemplo, se puede desear aumentar la afinidad de unión u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Se pueden preparar variantes de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo al ingresar las modificaciones apropiadas en la secuencia de nucleótidos que codifica al anticuerpo, o con una síntesis peptídica. Entre estas modificaciones se encuentran, por ejemplo, las eliminaciones de, o inserciones en o sustituciones de los residuos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Cualquier combinación de eliminación, inserción o sustitución puede llegar a la construcción final, siempre que la construcción final tenga las características esperadas, por ejemplo, unión de antígenos.

a. Variantes de Sustitución, Inserción y Eliminación

En algunas versiones, se incluyen las variantes de anticuerpos que tienen una o más sustituciones de aminoácidos. Entre los sitios de interés para la mutagénesis por sustitución se encuentran las RHV y FR. En la Tabla 2 aparecen las sustituciones conservadoras con el título "sustituciones preferidas". En la Tabla 2 se incluyen más

cambios considerables con el título “sustituciones ilustrativas”, y como se describe posteriormente en referencia a las clases de cadenas laterales de los aminoácidos. Se pueden introducir sustituciones de aminoácidos en un anticuerpo de interés y se pueden seleccionar los productos según la actividad deseada, por ejemplo, aumento/mantenimiento de la unión de antígenos, disminución en la inmunogenicidad o aumento de ADCC o CDC.

TABLA 2. Sustituciones de Aminoácidos Ilustrativas y Preferidas

Original Residuo	**Sustituciones Ilustrativas**	**Sustituciones Preferidas**
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

modificaciones (p. ej., mejoras) en ciertas propiedades biológicas (p. ej., aumento de la afinidad, disminución de la inmunogenicidad) relativas al anticuerpo original o habrá

conservado sustancialmente ciertas propiedades biológicas del anticuerpo original. Una variante de sustitución ilustrativa es un anticuerpo madurado por afinidad que puede generarse convenientemente, p. ej., con técnicas de maduración por afinidad por medio de fagos como las que se describen aquí. Brevemente, se mutan uno o dos residuos RHV y se presentan los anticuerpos variables en los fagos y se selecciona según cierta actividad biológica (p. ej., afinidad de unión).

Se pueden realizar alteraciones (p. ej., sustituciones) en las RHV, p. ej., para aumentar la afinidad de los anticuerpos. Se pueden realizar esas alteraciones en los "puntos de acceso" de RHV, p. ej., los residuos decodificados por codones que tienen una mutación en una frecuencia alta durante el proceso de maduración somática (consulte, p. ej., Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)), o residuos que contactan con los antígenos, con la prueba de afinidad de unión de la variación resultante de VH o VL. Maduración por afinidad construyendo y seleccionando de genotecas secundarias como se describe, p. ej., en Hoogenboom et ál en Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien et ál., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001).) En algunas versiones de maduración por afinidad, se introduce diversidad en los genes variables seleccionados para madurar con cualquiera de varios métodos (p. ej., RCP con tendencia al error, intercambio de cadenas o mutagénesis dirigida por oligonucleótidos). Entonces se crea una genoteca secundaria. Se examina la genoteca para identificar cualquier variante en los anticuerpos con la afinidad deseada. Otro método para introducir diversidad incluye un método dirigido por RHV, en el que se hacen aleatorios varios residuos RHV (p. ej., entre 4 y 6 residuos por vez). Los residuos RHV involucrados en la unión de antígenos pueden identificarse específicamente, p. ej., utilizando modelado o mutagénesis por barrido de alanina. Se suele concentrar sobre CDR-H3 y CDR-L3.

En algunas versiones, puede haber sustituciones, inserciones o eliminaciones dentro de una o mas RHV siempre que las alteraciones no reduzcan sustancialmente la habilidad del anticuerpo para unirse con el antígeno. Por ejemplo, se pueden convertir en RHV a las alteraciones conservadoras (p. ej., las sustituciones conservadoras que se incluyen aquí) que no reduzcan sustancialmente la afinidad de unión. Esas alternaciones pueden estar, por ejemplo, por fuera de residuos en contacto con antígenos en las RHV. En algunas versiones de la variante de las secuencias VH y VL que se mencionan antes, cada RHV no tiene alteración o contiene no más de una, dos o tres sustituciones de aminoácidos.

Un método útil para identificar los residuos o regiones de un anticuerpo que pueden ser objeto de mutagénesis se llama "mutagénesis por barrido de alanina" como describe Cunningham y Wells (1989) Science, 244:1081-1085. En este método, se identifica y reemplaza un residuo o grupo de residuos objetivo (p. ej., residuos cargados como arg, asp, his, lys y glu) con aminoácidos neutrales o con carga negativa (p. ej., alanina o polialanina) para determinar si se afecta la interacción del anticuerpo con el antígeno. Se pueden introducir más sustituciones en los sitios de los aminoácidos que demuestran

sensibilidad funcional a las sustituciones iniciales. Opcional, o adicionalmente, se puede agregar una estructura de cristal de un complejo antígeno-anticuerpo para identificar los puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Esos residuos de contacto o linderos pueden ser objeto o eliminarse como candidatos para la sustitución. Se pueden evaluar las variantes para determinar si contienen las propiedades deseadas.

Las inserciones en la secuencia de aminoácidos incluyen fusiones de amino o carboxilo terminales que puede variar desde un residuo hasta polipéptidos que contengan cientos de residuos, así como las inserciones intrasecuencia de uno o varios residuos de aminoácidos. Entre los ejemplos de las inserciones terminales se encuentra un anticuerpo con un residuo metionil N-terminal. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión de N- o C-terminal del anticuerpo con una enzima (p. ej., para ADEPT) o un polipéptido que aumenta la vida media del suero del anticuerpo.

b. Variantes de Glucosilación

En ciertas versiones, los anticuerpos anti-CD3 de la invención (p. ej., los anticuerpos anti-CD3 biespecíficos de la invención que se unen a CD3 y a una segunda molécula biológica como, p. ej., un antígeno de superficie celular, p. ej., el antígeno de un tumor, como los anticuerpos TDB de la invención o las variantes correspondientes) pueden alterarse para aumentar o disminuir cuanto se glucosila el anticuerpo. Se puede lograr agregar o eliminar sitios de glucosilación a un anticuerpo anti-CD3 de la invención alterando la secuencia de aminoácidos para que se creen o eliminen uno o más de los sitios de glucosilación.

Cuando el anticuerpo involucra una región Fc, se puede alterar el hidrato de carbono unido a él. Los anticuerpos nativos que producen las células de los mamíferos generalmente incluyen un oligosacárido biantenario y ramificado que por lo general se liga por una unión N- con Asn297 del dominio CH2 de la región Fc. Consulte, p. ej., Wright et ál. *TIBTECH* 15:26-32 (1997). El oligosacárido puede incluir varios hidratos de carbono, p. ej., manosa, N-acetilglucosamina (GlcNAc), galactosa y ácido siálico, así como una fucosa unida a un GlcNAc en la "raíz" de la estructura del oligosacárido biantenario. En algunas versiones, se pueden realizar las modificaciones del oligosacárido en un anticuerpo de la invención para crear variantes de anticuerpo con ciertas propiedades mejoradas.

En una versión, se incluyen las variantes del anticuerpo anti-CD3 que tienen una estructura de hidrato de carbono sin fucosa unida (directa o indirectamente) a una región Fc. Por ejemplo, la cantidad de fucosa en dicho anticuerpo puede variar entre 1% y 80%, 1% y 65%, 5% y 65% o 20% y 40%. La cantidad de fucosa se determina calculando la cantidad promedio de fucosa dentro de la cadena de azúcar en Asn297, en relación a la cantidad de glicoestructuras unidas a Asn297 (p. ej., estructuras complejas, híbridas y altas en manosa) como se mide con la espectrometría de masas MALDI-TOF, como se describe por ejemplo en WO 2008/077546. Asn297 hace referencia al residuo

de asparagina ubicado por la posición297 en la región Fc (numeración UE de los residuos de la región Fc); sin embargo, Asn297 también puede encontrarse ±3 aminoácidos arriba o abajo de la posición 297, o sea, entre las posiciones 294 y 300, por algunas variaciones menores en la secuencia de los anticuerpos. Dichas variantes fucolizadas podrían mejorar la función ADCC. Consulte, p. ej., presentación de patentes de EE.UU. N.° US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Entre los ejemplos de publicaciones relacionadas con variantes de anticuerpos "desfucolizados" o "deficientes en fucosa" se encuentran: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki et ál. *J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et ál. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004). Entre los ejemplos de líneas celulares capaces de producir anticuerpos desfucolizados se encuentran las células CHO Lec 13 sin fucolización de proteínas (Ripka et ál. *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); Presentación de patente de EE.UU. N.º US 2003/0157108 A1, Presta, L; y WO 2004/056312 A1, Adams *et ál*., en espacial en el ejemplo 11) y líneas celulares knockout, tales como el gen alfa-1,6-fucolsiltransferasa, *FUT8, células de* knockout CHO (consulte, por ejemplo a Yamane-Ohnuki et ál. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004); Kanda, Y. et ál*., Biotechnol. Bioeng*., 94(4):680-688 (2006); y WO2003/085107).

También se proporcionan variantes de los anticuerpos anti-CD3 con oligosacáridos bisectados, por ejemplo, en los cuales se bisecta con GIcNAc un oligosacárido biantenario ligado a la región Fc del anticuerpo. Es posible que tales variantes hayan reducido la fucosilación y/o mejorado la función de la ADCC. Se describen ejemplos de tales variantes de anticuerpos, p.ej., en WO 2003/011878 (Jean-Mairet et ál.), Presentación de patente de EE.UU. N.º 6.602.684 (Umana et ál.) y US 2005/0123546 (Umana *et ál.*). También se proporcionan variantes de anticuerpos con al menos un residuo de galactosa en el oligosacárido unido a la región Fc. Es posible que estas variantes de anticuerpos hayan mejorado la función de la CDC. Estas variantes de anticuerpos se describen, por ejemplo, en WO 1997/30087 (Patel et ál.), WO 1998/58964 (Raju, S.) y WO 1999/22764 (Raju, S.).

c. Variantes de la región Fc

En algunas versiones, se puede introducir una o más modificaciones a los amino ácidos en la región Fc de un anticuerpo anti-CD3 de la invención (por ejemplo, un anticuerpo anti-CD3 biespecífico de la invención que se une al CD3 y a una segunda molécula biológica, p.ej., a un antígeno de superficie celular, un antígeno tumoral, como un anticuerpo TDB de la invención o sus mismas variantes), por lo tanto se genera una variante de la región Fc (consulte, p.ej., US 2012/0251531). La variante de la región Fc puede comprender una secuencia de la región Fc humana, p.ej., una región Fc humana IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, que incluye una modificación a un amino ácido, p.ej., una

sustitución, en una o más posiciones de amino ácidos.

En algunas versiones, la invención contempla una variante del anticuerpo anti-CD3 que posee algunas pero no todas las funciones de efector, lo que la convierte en una buena candidata para las presentaciones en las que si bien la semivida del anticuerpo *in vivo* es importante, algunas funciones de efector son innecesarias o perjudiciales, como un complemento o una ADCC. *También es posible realizar ensayos de citotoxicidad* in vitro *y/o* in vivo para confirmar la reducción/agotamiento de la actividades de la CDC y/o de la ADCC. Por ejemplo, es posible realizar ensayos de unión de receptores Fc (FcR) para garantizar que el anticuerpo carece de unión FcγR (por lo tanto, es probable que carezca de actividad ADCC), pero sigue manteniendo la capacidad de unión FcRn. Las células primarias para la mediación de ADCC, células NK, expresan Fc(RIII solamente, mientras que los monocitos expresan Fc(RI, Fc(la expresión de FcR RII y Fc(RIII. Fen células hematopopéyicas se resume en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991). Se presentan ejemplos, no restrictivos, de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad de la ADCC de una molécula de interés, en la patente de EE.UU. N.º 5.500.362 (consulte, p.ej., Hellstrom, I., et ál. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83:7059-7063 (1986)) y Hellstrom, I et ál., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82:1499-1502 (1985); 5,821,337 (consulte Bruggemann, M. et ál., *J. Exp. Med.* 166:1351-1361 (1987)). Por otra parte, se pueden utilizar métodos de determinación no radioactivos (consulte, p.ej., el ensayo de citotoxicidad no radiactivo ACTI™ para la citometría de flujo (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA; y el ensayo de citotoxicidad no radiactivo CytoTox 96® (Promega, Madison, WI). La células efectoras útiles para estos ensayos incluyen las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células asesinas naturales (NK). Por otro lado, o adicionalmente, se puede determinar la actividad de la ADCC de la molécula de interés *in vivo*, p.ej., en un modelo de animal como el que presenta Clynes et ál. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 95:652-656 (1998). También se pueden realizar ensayos de unión de C1q para confirmar que el anticuerpo es incapaz de unir C1q, y, en consecuencia, carece de actividad CDC. Consulte, p.ej. el método ELISA de unión C1q y C3c en WO 2006/029879 y en WO 2005/100402. A fin de evaluar la activación del complemento, se puede realizar un ensayo de CDC (consulte, por ejemplo, Gazzano-Santoro *et ál. J. Immunol. Métodos* 202:163 (1996); Cragg, M.S. et ál. *Blood.* 101:1045-1052 (2003); y Cragg, M.S. y M.J. Glennie *Blood.* 103:2738-2743 (2004)). Los ensayos de la unión FcRn y la eliminación/semivida *in vivo* también pueden realizarse con métodos conocidos (consulte, p.ej. Petkova, S.B. et ál. *Int'l. Immunol.* 18(12):1759-1769 (2006)).

Los anticuerpos con función de efector disminuida incluyen aquellos con sustitución de uno o más de los residuos de las región Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 (de las patentes de EE.UU. N.° 6.737.056 y 8.219.149). Estos mutantes Fc incluyen mutantes Fc con sustituciones en dos o más posiciones de aminoácidos 265, 269, 270, 297 y 327, incluido el mutante Fc llamado "DANA" con sustitución en los residuos 265 y 297 a la alanina (patente de EE.UU. N.° 7.332.581 y 8.219.149).

En algunas versiones, se sustituye la prolina en la posición 329 de una región Fc humana en estado natural en el anticuerpo con glicina o arginina o un residuo de aminoácido lo suficientemente grande para destruir el sandwich de prolina dentro de la interfaz del receptor Fc/Fc.gamma. que se forma entre la prolina 329 del Fc y los residuos triptófanos Trp 87 y Trp 110 de FcgRIII (Sondermann et ál.: Nature 406, 267-273 (20 de julio 2000)). En algunas versiones, el anticuerpo incluye al menos una sustitución más de aminoácido. En una versión, la sustitución adicionada de aminoácido es S228P, E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297D o P331S, e incluso en otra versión, la sustitución adicionada de aminoácido es L234A y L235A de la región humana Fc IgG1 o S228P y L235E de la región humana Fc IgG4 (consulte, p.ej., US 2012/0251531) e incluso en otra versión, la sustitución adicionada de aminoácido es L234A y L235A y P329G de la región humana Fc IgG1.

Se describen ciertas variantes de anticuerpo con unión a FcR mejorada o disminuida (consulte, p.ej., Patente de EE.UU. N.º 6.737.056; WO 2004/056312, y Shields et ál.*, J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001)).

En algunas versiones, una variante de anticuerpo incluye una región Fc con una o más sustituciones de aminoácidos que mejoran la ADCC, p.ej., sustituciones en las posiciones 298, 333, y/o 334 de la región Fc (numeración de residuos de la UE).

En algunas versiones, las alteraciones se realizan en la región Fc que resultan en la unión de C1q alterada (es decir, mejorada o disminuida) y/o en Citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), p.ej., como lo describe la Patente de EE.UU. N.º 6.194.551, WO 99/51642 e Idusogie et ál. *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

Los anticuerpos con semividas aumentadas y unión mejorada para el receptor Fc neonatal (FcRn), el cual es responsable de la transferencia de IgC materno al feto (Guyer et ál, *J. Immunol.* 117:587 (1976) y Kim et ál., *J. Immunol.* 24:249 (1994)), se describen en US2005/0014934A1 (Hinton et ál.). Esos anticuerpos incluyen una región Fc con una o más sustituciones ahí mismo que mejoran la unión de la región Fc con FcRn. Tales variantes Fc incluyen aquellas con sustituciones en uno o más residuos de la región Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 o 434, p.ej., sustitución del residuo de la región Fc 434 (patentes de EE.UU. N.° 7.371.826).

También consulte Duncan & Winter, *Nature* 322:738-40 (1988), patente de EE.UU. N.° 5.648.260, patente de EE.UU. N.° 5.624.821 y WO 94/29351 en relación a otros ejemplos de las variantes de la región Fc.

En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD3 (p.ej., el anticuerpo anti-CD3 bioespecífico) contiene una región Fc que incluye una mutación N297G. En algunos entornos, el anticuerpo anti-CD3 que incluye la mutación N297G comprende un grupo de anti-CD3 que está compuesto por un primer dominio de unión que consta de las siguientes seis RHV: (a) una RHV-H1 que comprende una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 1; (b) una RHV-H2 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 2; (c) una RHV-H3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de

SEC.: 3; (d) una RHV-L1 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 4; (e) una RHV-L2 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 5; y (f) una RHV-L3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 6; y un grupo anti-CD20 que consiste en un segundo dominio de unión que incluye los siguientes seis RHV: (a) un RHV-H1 que comprende la secuencia de amino ácido con N.º de ID de SEC.: 157; (b) una RHV-H2 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 158; (c) una RHV-H3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 159; (d) una RHV-L1 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 160; (e) una RHV-L2 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 161; y (f) una RHV-L3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 162.

En algunas versiones, el anticuerpo anti-CD3 que incluye la mutación N297G comprende un grupo de anti-CD3 que está compuesto por un primer dominio de unión que consta de (a) una HV que comprende una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 184 y (b) un dominio de VL que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 185 y un grupo anti-CD20 que comprende un segundo dominio de unión que consta de (a) un dominio de HV que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 266 y (b) un dominio de VL que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 267.

En algunas versiones, el anticuerpo anti-CD3 que incluye la mutación N297G puede comprender uno o más dominios constantes de cadenas pesadas, donde el o los dominios constantes de cadenas pesadas son seleccionados de un primer dominio CH1 ($CH1_1$), un primer dominio CH2 ($CH2_1$), un primer dominio CH3 ($CH3_1$), un primer dominio CH1 ($CH1_2$), un segundo dominio CH2 ($CH2_2$) y un segundo dominio CH3 ($CH3_2$). En algunas ocasiones, al menos uno o los dominios constantes de cadenas pesadas está emparejado con otro dominio constante de cadenas pesadas. En algunas ocasiones, los dominios $CH3_1$ y $CH3_2$ comprenden una protuberancia o una cavidad, donde la protuberancia o cavidad en el dominio $CH3_1$ puede posicionarse en la cavidad o la protuberancia respectiva del dominio $CH3_2$. En algunas ocasiones, los dominios $CH3_1$ y $CH3_2$ se encuentran en una interfaz entre la protuberancia y cavidad mencionadas. En algunas ocasiones, los dominios $CH2_1$ y $CH2_2$ comprenden una protuberancia o una cavidad, donde la protuberancia o cavidad en el dominio $CH2_1$ puede posicionarse en la cavidad o la protuberancia respectiva del dominio $CH2_2$. En otras ocasiones, los dominios $CH2_1$ y $CH2_2$ se encuentran en una interfaz entre la protuberancia y cavidad mencionadas. En algunas ocasiones, el anticuerpo anti-CD3 es un anticuerpo IgG1.

En otras versiones, el anticuerpo anti-CD3 que incluye la mutación N297G comprende un grupo de anti-CD3 que está compuesto por un primer dominio de unión que consta de (a) una HV que comprende una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 184 y (b) un dominio de VL que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 185 y un grupo anti-CD20 que comprende un segundo dominio de unión que consta de (a) un dominio de HV que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de

SEC.: 266 y (b) un dominio de VL que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 267, donde (a) el grupo anti-CD3 comprende mutaciones por sustitución de T366S, L368A, Y407V y N297G y (b) el grupo anti-CD20 comprende mutaciones por sustitución de T366W y N297G.

d. Variantes de anticuerpos creados con cisteína

En ciertas versiones, es posible querer crear anticuerpos creados con cisteína, p.ej., "thioMAbs", en el cual se sustituye uno o más residuos de un anticuerpo con residuos de cisteína. En versiones particulares, los residuos sustituidos ocurren en sitios accesibles del anticuerpo. La sustitución de esos residuos con cisteína hace que los grupos de tiol se posicionen ahí mismo en sitios accesibles del anticuerpo y pueden utilizarse para conjugar el anticuerpo con otras fracciones, como fracciones de medicamentos o fracciones de medicamentos de enlace para crear un inmunoconjugado, como se describe más adelante. En algunas versiones, se puede sustituir con cisteína a uno o más de los siguientes residuos: V205 (numeración Kabat) de la cadena ligera, A118 (numeración de la UE) de la cadena pesada y S400 (numeración de la UE) de la cadena pesada de la región Fc. Es posible generar anticuerpos creados con cisteína de acuerdo a lo descrito en, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N.° 7.521.541.

e. Derivados de anticuerpos

En algunas versiones, se puede introducir una o más modificaciones al anticuerpo anti-CD3 de la invención (p.ej., un anticuerpo anti-CD3 biespecífico de la invención que se une al CD3 y a una segunda molécula biológica, p.ej., a un antígeno de superficie celular, un antígeno tumoral, como un anticuerpo TDB de la invención o sus mismas variantes) para que dispongan de fracciones no protéicas conocidas y disponibles. Las fracciones adecuadas capaces de ser derivadas del anticuerpo incluyen pero no se limitan a polímeros solubles en agua. Ejemplos no restrictivos de polímeros solubles en agua incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/polietilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrán, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, poli-1, 3-dioxolano, poli-1, 3, 6-trioxano, copolímero de anhidro maleico/etileno, poliaminoácidos (ya sean homopolímeros o copolímeros aleatorios) y polietilenglicol de dextrán o poli (n-vinil pirrilidona), homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de etileno/óxido de polipropileno, poliol polioxietilado (p.ej., glicerol), alcohol polivinílico y mezclas correspondientes. Los propionaldehídos de polietilenglicol pueden presentar ventajas en el proceso de fabricación debido a su estabilidad en el agua. El polímero puede presentar un cierto peso molecular y puede estar o no ramificado. El número de polímeros ligados al anticuerpo puede variar y, si se liga más de un polímero, pueden ser la misma o diferentes moléculas. En general, el número y/o tipo de polímeros utilizados para derivar puede determinarse con base en consideraciones que incluyen, pero no se limitan a, las propiedades particulares o funciones del anticuerpo que deben mejorarse, ya sea que el derivado del anticuerpo se

utilizará en una terapia bajo determinadas condiciones, etc.

En otra versión, se proporcionan los conjugados de un anticuerpo y la fracción no proteica que puede ser calentada por selección mediante la exposición a radiación. En una versión, la fracción no proteica es un nanotubo de carbono (Kam et ál., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102: 11600-11605 (2005)). La radiación puede ser de cualquier longitud de onda, pero no se limita a longitudes de onda que no dañan células ordinarias, pero que calientan la fracción no proteica a una temperatura en la que se mata a las células próximas a la fracción no proteica del anticuerpo.

B. Métodos recombinantes y composiciones

Es posible producir con los métodos recombinantes y las composiciones anticuerpos anti-CD3 de la invención (p. ej., los anticuerpos anti-CD3 biespecíficos de la invención que se unen a CD3 y a una segunda molécula biológica como, p. ej., el antígeno de la superficie celular, p. ej., el antígeno de un tumor, como los anticuerpos TDB de la invención o las variantes correspondientes), según lo descrito en la patente de EE.UU. N.° 4.816.567. En una versión, se presenta el ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-CD3 aquí descrito. Tal ácido nucleico puede codificar una secuencia de aminoácidos que incluye el VL y/o una secuencia de aminoácidos que incluye el VH del anticuerpo (p.ej. las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo). En otra versión, se presentan uno o más vectores (p.ej., los vectores de expresión) que incluyen el mencionado ácido nucleico. En otra versión, se presenta una célula huésped que incluye el mencionado ácido nucleico. En una de dichas versiones, una célula huésped consta de (p.ej., fue transformada con): (1) un vector que consta de un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que consta del VL del anticuerpo y una secuencia de aminoácidos que consta del VH del anticuerpo o (2) un primer vector que consta de un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que consta del VL de un anticuerpo y un segundo vector que consta de un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que consta del VH del anticuerpo. En una versión, la célula huésped es eucariota, p.ej., la célula del ovario de un hamster chino (CHO) o una célula linfoide (p.ej., la célula Y0, NS0, Sp20). En una versión, se presenta el método para formar un anticuerpo anti-CD3, donde el método comprende el cultivo de una célula huésped que consta de un ácido nucleico que codifica al anticuerpo, como se presenta arriba, en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo y, de manera optativa, recupera el anticuerpo de la célula huésped (o el medio de cultivo de la célula huésped).

Para la producción recombinante de un anticuerpo anti-CD3, se aísla e inserta ácido nucleico codificante de un anticuerpo, como se describe anteriormente, en uno o más vectores para una clonación y/o expresión adicional en una célula huésped. Es posible aislar y secuenciar dicho ácido nucleico fácilmente por medio de procedimientos convencionales (p. ej., mediante sondas oligonucleótidas que son capaces de unirse específicamente a genes codificantes de las cadenas pesadas y livianas del anticuerpo).

Dentro de las células huésped consideradas apropiadas para la clonación o expresión de

los vectores codificantes de anticuerpos se incluyen las células procariotas y eucariotas que se describen en el presente. Por ejemplo, es posible producir anticuerpos en bacterias, en particular, cuando no se requiere glucosilación ni la función efectora de Fc. Para la expresión de fragmentos de anticuerpos y polipéptidos en bacterias, véase, p. ej., los siguientes números de las patentes de EE.UU.: 5,648,237, 5,789,199, y 5,840,523. (Véase, a su vez, Charlton, *Methods in Molecular Biology, Vol. 248* (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), págs. 245-254, descripción de la expresión de fragmentos de anticuerpos en *E. coli*.) Después de la expresión, es posible aislar el anticuerpo de la pasta de células bacterianas en una fracción soluble y se puede purificar aún más.

Además de las procariotas, los microbios eucariotas tales como los hongos filamentosos o las levaduras son huéspedes adecuados de clonación o expresión para vectores codificantes de anticuerpos como, por ejemplo, cepas de hongos o levaduras cuyas vías de glucosilación se han "humanizado", resultando, así, en la producción de un anticuerpo con un patrón de glucosilación parcialmente o totalmente humano. Véase Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004), y Li et al., *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006).

Las células huésped consideradas apropiadas para la expresión de anticuerpos glicosilados se derivan, a su vez, de organismos pluricelulares (invertebrados y vertebrados). Entre los ejemplos de células de invertebrados se incluyen las células de los insectos y de las plantas. Se han identificado numerosas cepas baculovirales que se pueden usar en conjunción con las células de los insectos, especialmente para la transfección de las células de la *Spodoptera frugiperda*.

A su vez, es posible usar los cultivos de las células vegetales como huéspedes. *Véase, p. ej.*, los siguientes números de las patentes de EE.UU.: 5,959,177, 6,040,498, 6,420,548, 7,125,978, y 6,417,429 (descripción de la tecnología PLANTIBODIES™ para la producción de anticuerpos en plantas transgénicas).

Las células de los vertebrados también se pueden usar como huéspedes. Por ejemplo, las líneas celulares de los mamíferos que se adaptan para crecer en suspensión pueden resultar útiles. Algunos ejemplos de aquellas líneas celulares huésped de los mamíferos que pueden resultar útiles son: una línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7); una línea de riñón embrionario humano (293 o células 293, como se describe, p. ej., en Graham et al., *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); células de riñón de hámster neonato (BHK); células de Sertoli de ratón (células TM4, como se describe, p. ej., en Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1); células de riñón de mono verde africano (VERO-76); células de carcinoma cervical humano (HELA); células de riñón canino (MDCK); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A); células de pulmón humano (W138); células de hígado humano (Hep G2); tumor mamario de ratón (MMT 060562); células TRI, como se describe, p. ej., en Mather et al*., Annals N.Y. Acad. Sci*. 383:44-68 (1982); células MRC 5; y células FS4. Entre otras de las líneas celulares huésped de los mamíferos que pueden resultar útiles se incluyen las células del ovario del hámster chino (CHO), incluidas las células DHFR-CHO (Urlaub et al., Proc. *Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 77:4216 (1980)); y las líneas celulares de mieloma como, por ejemplo, Y0,

NS0 y Sp2/0. Para una revisión de ciertas líneas celulares huésped de los mamíferos que resultan apropiadas para la producción de anticuerpos, véase, p. ej., Yazaki y Wu, *Methods in Molecular Biology, Vol. 248* (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), págs. 255-268 (2003).

C. Ensayos

Es posible identificar, seleccionar o caracterizar los anticuerpos anti-CD3 de la invención (p. ej., los anticuerpos anti-CD3 biespecíficos de la invención que se unen a CD3 y a una segunda molécula biológica como, p. ej., el antígeno de la superficie celular, p. ej., el antígeno de un tumor, como los anticuerpos TDB de la invención o las variantes correspondientes) que se proporcionan en el presente en relación con sus propiedades químicas o físicas y/o las actividades biológicas por medio de varios ensayos conocidos en la materia.

1. Ensayos de unión y demás ensayos

En un aspecto, se prueba un anticuerpo anti-CD3 de la invención en relación con su actividad de unión de antígenos, por ejemplo, a través de métodos tales como ELISA, Western blot, etc.

En otro aspecto, es posible usar ensayos de competencia para identificar un anticuerpo que compite con un anticuerpo anti-CD3 de la invención para la unión con el CD3.

En un ensayo ejemplar de competición, se incuba el CD3 inmovilizado en una solución que comprende un primer anticuerpo etiquetado que se une al CD3 y un segundo anticuerpo no etiquetado que se analiza en relación con su capacidad para competir con el primer anticuerpo en la unión al CD3. El segundo anticuerpo se puede encontrar presente en un hibridoma sobrenadante. A modo de control, se incuba el CD3 inmovilizado en una solución que comprende un primer anticuerpo etiquetado, pero no así el segundo anticuerpo no etiquetado. Después de la incubación bajo condiciones permisivas para la unión del primer anticuerpo al CD3, se elimina el anticuerpo excedente sin unir y se mide la cantidad de etiquetas asociadas al CD3 inmovilizado. Si la cantidad de etiquetas asociadas al CD3 inmovilizado es significativamente más reducida en la muestra de la prueba relativa a la muestra de control, esto indica, entonces, que el segundo anticuerpo compite con el primer anticuerpo en la unión con el CD3. Véase, p. ej., Harlow y Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cap.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

2. Ensayos de actividad

En un aspecto, se proporcionan ensayos para la identificación de los anticuerpos anti-CD3 correspondientes con actividad biológica. La actividad biológica puede incluir, por ejemplo, la unión al CD3 (p. ej., CD3 en la superficie de una célula T) o un fragmento peptídico correspondiente, ya sea *in vivo*, *in vitro*, o *ex vivo*. En el caso de un anticuerpo anti-CD3 multiespecífico (p. ej., biespecífico) de la invención (p. ej., un anticuerpo TDB

con un brazo anti-CD3 y un brazo que reconoce una segunda molécula biológica, p. ej., un antígeno de la superficie celular, p. ej., un antígeno de un tumor), la actividad biológica puede incluir, a su vez, activación de la célula efectora (p. ej., activación de la célula T (p. ej., CD8+ y/o CD4+ célula T)), expansión de la población de células efectoras (es decir, una reducción en la población de las células que expresan la segunda molécula biológica en su superficie celular), y/o matanza de las células objetivo. Se proporcionan los anticuerpos con dicha actividad biológica *in vivo* y/o *in vitro.* En ciertas realizaciones, un anticuerpo de la invención se analiza en relación con dicha actividad biológica, como se describe en detalle en los Ejemplos que se encuentran a continuación.

En algunas representaciones, la actividad comprende la capacidad de sostener la eliminación de células B y/o la activación de células T citotóxicas. En ciertas representaciones, se evalúan las células anti-B que buscan anticuerpos anti-CD3 de la invención (tales como una TDB anti-CD20) para tal eliminación de células B y/o la activación del efecto citotóxico de la actividad de las células T biológicas mediante cualquiera de los métodos aquí descritos, en particular los exjemplos. En algunas representaciones de cualquiera de los ensayos de estas actividades, las PBMC pueden aislarse a partir de sangre entera de donantes saludables por separación Ficoll. Particularmente, la sangre de seres humanos puede extraerse en jeringas con heparina y las PBMC aisladas con Leucosep y Ficoll Paque Plus. De ser necesario, se pueden separar las células CD4+T y CD8+T con kits Miltenyi conforme las instrucciones del fabricante.

Además, las células pueden lavarse en un medio de RPMI con un 10% de FBS, suplementado con GlutaMax, penicilina y estreptomicina; y se agregaron ~0,2 millones de células suspendidas a una placa con fondo en U de 96 pocillos. Las células pueden cultivarse en RPMI 1640 suplementado con 10% de FBS a 37 °C en una incubadora de cultivo de células estándar humidificada. Para los ensayos de eliminación de células BJAB, se pueden incubar 20.000 células BJAB con células efectoras, ya sea células T purificadas o huPBMC, como lo indican las proporciones según el ensayo, en presencia de diversas concentraciones de anticuerpos TDB durante 24 horas. Para los ensayos de eliminación de células B endógenas, se pueden incubar 200.000 huPBMC en diversas concentraciones de anticuerpos TDB durante 24 horas.

Tras el cultivo, las células pueden lavarse con un tampón FACS (BSA al 0.05 %, azida de Na al 0.05 % en PBS) y suspenderse en 100µl de un tampón FACS con 1 µg/ml de yoduro de propidio. Los datos pueden recopilarse en un citómetro de flujo FACSCalibur y analizarse con FlowJo. Las células B vivas pueden descartarse como células PI-CD19 o PI-CD20+B mediante FACS y puede obtenerse el recuento de células absoluto con perlas FITC agregadas a la mezcla de la reacción como control de recuento interno. El porcentaje (%) de eliminación de células puede calcularse con base en los controles no tratados con TDB. Las células T activadas se pueden detectar por la expresión de superficie de CD69 y CD25 mediante el uso de anti-CD69-FITC y anti-CD25-PE.

D. Inmunoconjugados

La invención, a su vez, proporciona inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo

anti-CD3 que se conjuga a uno o más agentes citotóxicos, tales como medicamentos o agentes quimioterapéuticos, agentes inhibidores del crecimiento, toxinas (p. ej., toxinas proteicas, toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal, o animal, o fragmentos de la misma), o isotopos radioactivos.

En una realización, un inmunoconjugado es un conjugado de anticuerpo y fármaco (ADC) donde se conjuga un anticuerpo a uno o más medicamentos, que incluye, pero no se limita a, un maitansinoide (véase los siguientes números de las patentes de EE.UU.: 5,208,020, 5,416,064 y la patente europea EP 0 425 235 B1); una auristatina como, por ejemplo, las fracciones DE y DF del fármaco monometil auristatina (MMAE y MMAF) (véase los siguientes números de las patentes de EE.UU.: 5,635,483 y 5,780,588, y 7,498,298); una dolastatina; una calicheamicina o derivado de la misma (véase los siguientes números de las patentes de EE.UU.: 5,712,374, 5,714,586, 5,739,116, 5,767,285, 5,770,701, 5,770,710, 5,773,001, y 5,877,296; Hinman et al., *Cancer Res.* 53:3336-3342 (1993); y Lode et al., *Cancer Res.* 58:2925-2928 (1998)); una antraciclina como, por ejemplo, daunomicina o doxorrubicina (véase Kratz et al., *Current Med. Chem.* 13:477-523 (2006); Jeffrey et al., *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 16:358-362 (2006); Torgov et al., *Bioconj. Chem.* 16:717-721 (2005); Nagy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 97:829-834 (2000); Dubowchik et al., *Bioorg. & Med. Chem. Letters* 12:1529-1532 (2002); King et al., *J. Med. Chem.* 45:4336-4343 (2002); y el siguiente número de las patentes de EE.UU.: 6,630,579); un metotrexato; una vindesina; un taxano como, por ejemplo, docetaxel, paclitaxel, larotaxel, tesetaxel y ortataxel; un tricoteceno; y CC1065.

En otra realización, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo anti-CD3, como se describe en el presente, conjugado con una toxina enzimáticamente activa o con un fragmento de la misma, que incluye, pero no se limita a, difteria de cadena A, fragmentos activos no vinculantes de la toxina de la difteria, exotoxina de cadena A (a partir de Pseudomonas aeruginosa), ricina de cadena A, abrina de cadena A, modeccina de cadena A, alfa-sarcina, proteínas de Aleurites fordii, proteínas de diantina, proteínas de Phytolacca americana (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de Momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de Saponaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y tricotecenos.

En otra realización, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo anti-CD3, como se describe en el presente, conjugado con un átomo radioactivo para formar un radioconjugado. Se encuentra disponible una variedad de isotopos radioactivos para la producción de radioconjugados. Algunos ejemplos incluyen At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32}, Pb^{212} e isotopos radioactivos de Lu. Cuando el radioconjugado se usa para la detección, puede comprender un átomo radioactivo para los estudios cintigráficos, por ejemplo, tc99m o I123, o una etiqueta de espín para las imágenes por resonancia magnética nuclear (NMR) (también conocida como resonancia magnética (MRI)), como, por ejemplo, iodo-123 nuevamente, iodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

Se puede conjugar un anticuerpo con un agente citotóxico por medio de una variedad de

agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales como, p. ej., N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados de imidoésteres bifuncionales (como, p. ej., dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (como, p. ej., disuccinimidil suberato), aldehídos (como, p. ej., glutareldehído), compuestos bis-azido (como, p. ej., bis (p-azidobenzoil) hexandiamina), derivados bis-diazonio (como, p. ej., bis-(p-diazoniumbenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (como, p. ej., 2,6-diisocianato de tolieno), y compuestos de flúor bis-activos (como, p. ej., 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina según se describe en Vitetta et al., *Science* 238:1098 (1987). El ácido triaminepentaacético 1-isotiocianatobencil-3-metildietileno (MX-DTPA) etiquetado con carbono-14 es un agente quelante ejemplar para la conjugación de radionucleótidos en el anticuerpo. Véase WO94/11026. El enlace puede ser un "enlace escindible" que facilita la liberación de un fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, es posible usar un enlace ácido lábil, un enlace peptídico, un enlace fotolábil, un enlace dimetil o un enlace con contenido de disulfuro (Chari et al., *Cancer Res.* 52:127-131 (1992); Patente de EE.UU. No. 5,208,020).

Los presentes inmunoconjugados o ADCs contemplan expresamente, pero no se limitan a, los conjugados preparados con re-agentes de enlace cruzado, que incluyen, pero no se limitan a, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC, y sulfo-SMPB, y SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfona)benzoato) que se encuentran comercialmente disponibles (p. ej., en Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., EE.UU.).

E. Métodos y composiciones para el diagnóstico y la detección

En ciertas realizaciones, cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 de la invención (p. ej., los anticuerpos anti-CD3 biespecíficos de la invención que se unen a CD3 y a una segunda molécula biológica como, p. ej., un antígeno de la superficie celular, p. ej., el antígeno de un tumor, como los anticuerpos TDB de la invención o las variantes correspondientes) es útil para la detección de la presencia de un CD3 en una muestra biológica. El término "detección", según su uso en el presente, incluye la detección tanto cuantitativa como cualitativa. En ciertas realizaciones, una muestra biológica comprende una célula o un tejido.

En una realización, se proporciona un anticuerpo anti-CD3 para ser usado en un método de diagnóstico o detección. En un aspecto adicional, se suministra un método para la detección de la presencia de un CD3 en una muestra biológica. En ciertas realizaciones, el método implica contactar la muestra biológica con un anticuerpo anti-CD3, según se describe en el presente, bajo condiciones permisivas para la unión del anticuerpo anti-CD3 al CD3, y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo anti-CD3 y el CD3. Dicho método puede ser *in vitro* o *in vivo*.

En ciertas realizaciones, se proporcionan anticuerpos anti-CD3 etiquetados. Las etiquetas incluyen, pero no se limitan a, etiquetas o fracciones que se detectan

directamente (como, por ejemplo, etiquetas fluorescentes, cromofóricas, electrodensas, quimioluminiscentes y radiactivas), como así también fracciones, tales como enzimas o ligandos, que se detectan indirectamente, por ejemplo, a través de una reacción enzimática o de una interacción molecular. Las etiquetas ejemplares incluyen, pero no se limitan a, los radioisótopos ^{32}P, ^{14}C, ^{125}I, ^{3}H, y ^{131}I, fluoróforos como, por ejemplo, quelatos de tierra rara o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, luceriferasas, por ejemplo, la luciferasa de luciérnaga y la luciferasa bacteriana (Patente de EE.UU. No. 4,737,456), luciferina, 2,3-dihidroftalazinedionas, la peroxidasa de rábano rusticano (HRP), la fosfatasa alcalina, la β-galactosidasa, la glucoamilasa, la lisozima, la sacarida, las oxidasas como, por ejemplo, la glucosa oxidasa, la galactosa oxidasa y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, las oxidasas heterocíclicas como, por ejemplo, la uricasa y la xantina oxidasa, acoplada con una enzima que emplea peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor de un tinte como, por ejemplo, HRP, la lactoperoxidasa o la microperoxidasa, biotina/avidina, etiquetas de espín, etiquetas con bacteriófagos, radicales libres estables, y similares.

F. Formulaciones farmacéuticas

Las formulaciones farmacéuticas de un anticuerpo anti-CD3 de la invención (p. ej., el anticuerpo anti-CD3 biespecífico de la invención que se une al CD3 y a una segunda molécula biológica como, por ejemplo, un antígeno de la superficie celular como, p. ej., un antígeno de un tumor, como un anticuerpo TDB de la invención o la variante correspondiente) se preparan al mezclar dicho anticuerpo con el grado deseado de pureza con uno o más portadores farmacéuticamente aceptados de carácter opcional (*Pharmaceutical Sciences de Remington,* 16a edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los portadores farmacéuticamente aceptados son, por lo general, no tóxicos para los receptores en las dosis y las concentraciones empleadas, e incluyen, pero no se limitan a: tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluidos el ácido ascórbico y la metionina, conservantes (como el cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; butil, fenol o alcohol bencílico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m- cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas como, p. ej., albúmina sérica, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos incluyendo glucosa, mañosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; iones formadores de sales como el sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos proteicos de Zn), y/o agentes tensoactivos no iónicos tales como el polietilenglicol (PEG). Los presentes portadores farmacéuticamente aceptables de carácter ejemplar incluyen, a su vez, agentes intersticiales para la dispersión farmacológica tales como glicoproteínas

hialuronidasa solubles activas a pH neutro (sHASEGP), por ejemplo, glicoproteínas hialuronidasa PH-20 solubles en humanos tales como rHuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.). Ciertas sHASEGPs ejemplares y los métodos de uso, incluido rHuPH20, se describen en los siguientes números de las publicaciones de las patentes de EE.UU.: 2005/0260186 y 2006/0104968. En un aspecto, una sHASEGP se combina con uno o más glicosaminoglicanos adicionales como, por ejemplo, las condroitinas.

Las formulaciones de anticuerpos liofilizadas de carácter ejemplar se describen en la patente de EE.UU. No. 6,267,958. Las formulaciones de anticuerpos acuosas incluyen las descriptas en la patente de EE.UU. No. 6,171,586 y WO2006/044908, las últimas formulaciones incluyen un tampón de histidina-acetato.

La presente formulación puede contener, a su vez, más de un ingrediente activo según sea necesario en relación con la indicación específica que se esté tratando, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no se afectan negativamente entre sí. Por ejemplo, podría resultar deseable proporcionar un agente terapéutico adicional (p. ej., un agente quimioterapéutico, un agente citotóxico, un agente inhibidor del crecimiento, y/o un agente anti-hormonal, como los mencionados anteriormente). Dichos ingredientes activos se encuentran presentes de manera apropiada en combinación en cantidades que son efectivas para los propósitos previstos.

Los ingredientes activos se pueden atrapar en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacilato), respectivamente; en sistemas coloidales de suministro de fármacos (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se describen en *Pharmaceutical Sciences de Remington,* 16a edición, Osol, A. Ed. (1980).

Es posible elaborar preparaciones de liberación sostenida. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el anticuerpo, matrices que están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas.

Las formulaciones a usar para la administración *in vivo* son, por lo general, estériles. La esterilidad se puede lograr con facilidad, por ejemplo, por medio de la filtración a través de membranas de filtración estériles.

G. Métodos y composiciones terapéuticos

Es posible usar cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 de la invención (p. ej., los anticuerpos anti-CD3 biespecíficos de la invención que se unen a CD3 y a una segunda molécula biológica como, p. ej., el antígeno de la superficie celular, p. ej., el antígeno de un tumor, como los anticuerpos TDB de la invención o las variantes correspondientes) en los métodos terapéuticos.

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-CD3 para ser usado como un medicamento. En otros aspectos, se proporciona un anticuerpo anti-CD3 para ser usado

en el tratamiento o en el retraso correspondiente al progreso de un trastorno de proliferación celular (p. ej., cáncer) o de un trastorno autoinmunitario (p. ej., artritis). En ciertas realizaciones, se proporciona un anticuerpo anti-CD3 para ser usado en un método de tratamiento. En ciertas realizaciones, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD3 para ser usado en un método de tratamiento de un individuo con un trastorno de proliferación celular o con un trastorno autoinmunitario que comprenda la administración a dicho individuo de una cantidad efectiva del anticuerpo anti-CD3. En una realización de la antes mencionada naturaleza, el método comprende, a su vez, la administración al individuo de una cantidad efectiva de, al menos, un agente terapéutico adicional, según se describe anteriormente. En otras realizaciones, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD3 para ser usado en la mejora de la función inmunitaria de un individuo que padezca un trastorno de proliferación celular o un trastorno autoinmunitario. En ciertas realizaciones, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD3 para ser usado en un método para la mejora de la función inmunitaria de un individuo que padezca un trastorno de proliferación celular o un trastorno autoinmunitario que comprenda la administración al individuo de una cantidad efectiva del anticuerpo anti-CD3 para activar las células efectoras (p. ej., células T, p. ej., CD8+ y/o CD4+ células T), expandir (incrementar) una población de células efectoras, reducir una población de células objetivo (p. ej., una célula que expresa una segunda molécula biológica reconocida por un anticuerpo anti-CD3 de la invención como, por ejemplo, un anticuerpo TDB biespecífico de la invención), y/o matar una célula objetivo (p. ej., célula objetivo de un tumor). Un “individuo”, conforme a cualquiera de las realizaciones anteriores, puede ser un humano.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD3 para ser usado en la fabricación o preparación de un medicamento. En una realización, el medicamento se usa para el tratamiento de un trastorno de proliferación celular (p. ej., cáncer) o de un trastorno autoinmunitario (p. ej., artritis). En una realización adicional, el medicamento es para ser usado en un método de tratamiento de un trastorno de proliferación celular o de un trastorno autoinmunitario que comprenda la administración a un individuo con un trastorno de proliferación celular o con un trastorno autoinmunitario de una cantidad efectiva del medicamento. En una realización de la antes mencionada naturaleza, el método comprende, a su vez, la administración al individuo de una cantidad efectiva de, al menos, un agente terapéutico adicional, según se describe anteriormente. En una realización adicional, el medicamento se usa para activar las células efectoras (p. ej., células T, p. ej., CD8+ y/o CD4+ células T), expandir (incrementar) una población de células efectoras, reducir una población de células objetivo (p. ej., una célula que expresa una segunda molécula biológica reconocida por un anticuerpo anti-CD3 de la invención como, por ejemplo, un anticuerpo TDB biespecífico de la invención), y/o matar células objetivo (p. ej., célula objetivo de un tumor) en el individuo. En una realización adicional, el medicamento es para ser usado en un método para la mejora de la función inmunitaria de un individuo que padezca un trastorno de proliferación celular o un trastorno

autoinmunitario que comprenda la administración al individuo de una cantidad efectiva del medicamento para activar las células efectoras (p. ej., células T, p. ej., CD8+ y/o CD4+ células T), expandir (incrementar) una población de células efectoras, reducir una población de células objetivo (p. ej., una célula que expresa una segunda molécula biológica reconocida por un anticuerpo anti-CD3 de la invención como, por ejemplo, un anticuerpo TDB biespecífico de la invención), y/o matar una célula objetivo (p. ej., célula objetivo de un tumor). Un "individuo", conforme a cualquiera de las realizaciones anteriores, puede ser un humano.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para el tratamiento de un trastorno de proliferación celular (p. ej., cáncer) o de un trastorno autoinmunitario (p. ej., artritis). En una realización, el método comprende la administración al individuo que padezca un trastorno de proliferación celular o un trastorno autoinmunitario de una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-CD3. En una realización de la antes mencionada naturaleza, el método comprende, a su vez, la administración al individuo de una cantidad efectiva de, al menos, un agente terapéutico adicional, según se describe anteriormente. Un "individuo", conforme a cualquiera de las realizaciones anteriores, puede ser un humano.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para la mejora de la función inmunitaria de un individuo que padezca un trastorno de proliferación celular o un trastorno autoinmunitario en un individuo con un trastorno de proliferación celular o con un trastorno autoinmunitario. En una realización, el método comprende la administración al individuo de una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-CD3 para activar las células efectoras (p. ej., células T, p. ej., CD3+ y/o CD8+ células T), expandir (incrementar) una población de células efectoras, reducir una población de células objetivo (p. ej., una célula que expresa una segunda molécula biológica reconocida por un anticuerpo anti-CD4 de la invención como, por ejemplo, un anticuerpo TDB biespecífico de la invención), y/o matar una célula objetivo (p. ej., célula objetivo de un tumor). En una realización, un "individuo" es un humano.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para el tratamiento de un cáncer hematológico tal como un cáncer de células B (por ejemplo, linfoma de células B maduras) por medio de la administración de una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-CD3 de la invención, como un anticuerpo anti-CD3 biespecífico de la invención, como una TDB que busca células anti-B, como un CD20-TDB con un brazo anti-CD3 y un brazo anti-CD20. En un aspecto adicional de la realización, el linfoma de células B maduras es un linfoma no Hodgkin (NHL). En un aspecto adicional de la realización, el NHL es seleccionado del grupo que comprende: linfoma difuso de células B grandes semejantes a las del centro germinal (GCB), linfoma difuso de células B grandes semejantes a la célula B activada (ABC), linfoma folicular (FL), linfoma de células de manto (MCL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfoide crónica (CLL), linfoma de zona marginal (MZL), leucemia linfocítica de célula pequeña (SLL), linfoma linfoplasmacítico (LL), macroglobulinemia de Waldenstrom (WM), linfoma del sistema nervioso central (CNSL),

linfoma de Burkitt (BL), leucemia prolinfocítica de células B, linfoma esplénico de zona marginal, leucemia de células vellosas, linfoma o leucemia esplénico, inclasificable, linfoma esplénico difuso de células B pequeñas de la pulpa roja, variante de leucemia de células vellosas, macroglobulinemia de Waldenstrom, enfermedades de cadenas pesadas, enfermedad de cadenas pesadas alfa, enfermedad de cadenas pesadas gamma, enfermedad de cadenas pesadas μ, mieloma de células plasmáticas, plasmocitoma óseo solitario, plasmocitoma extraóseo, linfoma de zona marginal nodal de tejido linfoide asociado a mucosa (linfoma MALT), linfoma de zona marginal nodal, linfoma de zona marginal nodal pediátrico, linfoma folicular pediátrico, linfoma primario cutáneo de células del centro folicular, linfoma de células grandes B rico en células T/histiocitos, linfoma primario del sistema nervioso central, linfoma cutáneo primario, linfoma tipo pierna, linfoma difuso de células B grandes positivo al virus de Epstein-Barr del anciano, linfoma difuso de células B grandes asociado con la inflamación crónica, granulomatosis linfomatoide, linfoma primario mediastinal de células B (tímico), linfoma de células B grandes intravascular, linfoma de células B grandes positivo al ALK, linfoma plasmablástico, linfoma de células B grandes tras enfermedad de Castleman asociada a infección por virus HHV8, linfoma primario de efusión: linfoma de células B, inclasificable, con características intermedias entre linfoma difuso de células B grandes y linfoma de Burkitt, y linfoma de células B, inclasificable, con características intermedias entre linfoma difuso de células B grandes y linfoma clásico de Hodgkin. En una realización preferente de la invención, el método abarca el tratamiento de un cáncer que comprende linfoma difuso de células B grandes semejantes a las del centro germinal (GCB), linfoma difuso de células B grandes semejantes a la célula B activada (ABC), linfoma folicular (FL), linfoma de células de manto (MCL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfoide crónica (CLL), linfoma de zona marginal (MZL), leucemia linfocítica de célula pequeña (SLL), linfoma linfoplasmacítico (LL), macroglobulinemia de Waldenstrom (WM), linfoma del sistema nervioso central (CNSL), linfoma de Burkitt (BL).

En una realización, el método comprende la administración a un individuo que padezca dicho cáncer hematológico (como un cáncer de células B, por ejemplo, linfoma de células B) de una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-CD3 de la invención, como un anticuerpo TDB biespecífico, como un CD20-TDB que comprende un brazo dirigido a anti-CD20 y un brazo dirigido a anti-CD3. En una realización, un CD20 TDB es co-administrado con rituximab y obinutuzumab.

En una realización adicional, el anticuerpo anti-CD3 de la invención (por ejemplo, el CD20 TDB), con o sin un anticuerpo monoclonal CD20, es administrado con un agente quimioterapéutico y/o un conjugado de anticuerpo y fármaco (ADC). En otra realización, el agente terapéutico es un modificador biológico.

En un aspecto adicional de la invención, el tratamiento adicional comprende un anticuerpo anti-CD20. En una realización, el anticuerpo anti-CD20 es rituximab. En una realización, el anticuerpo anti-CD20 es un anticuerpo B-Ly 1 humanizado. En una

realización, el anticuerpo B-Ly 1 humanizado es obinituzumab. En una realización, el anticuerpo anti-CD20 es ofatumumab, ublituximab, o ibritumomab tiuxetan.

En un aspecto adicional de la invención, el tratamiento adicional comprende un agente alquilante. En una realización, el agente alquilante es 4-[5-[Bis(2-cloroetil)amino]-1-metilbenzimidazol-2-il]ácido butanoico y las sales del mismo. En una realización, el agente alquilante es bendamustina.

En un aspecto adicional de la invención, el tratamiento adicional comprende un inhibidor de BCL-2. En una realización, el inhibidor de BCL-2 es 4-(4-{[2-(4-clorofenil)-4,4-dimetilciclohex-1-en-1-il]metiyl}piperazin-1-il)-N-({3-nitro-4-[(tetrahidro-2H-piran-4-ilmetil)amino]fenil}sulfonil)-2-(1H-pirrolo[2,3-b]piridin-5-iloxi)benzamida y las sales de la misma. En una realización, el inhibidor de BCL-2 es venetoclax (CAS n.°: 1257044-40-8).

En un aspecto adicional de la invención, el tratamiento adicional comprende un inhibidor de fosfoinositida 3-quinasa (PI3K). En una realización, el inhibidor de PI3K inhibe la isoforma delta de PI3K (p.ej. P110δ). En algunas realizaciones, el inhibidor de PI3K es 5-fluoro-3-fenil-2 - [(1S) -1- (7H-purin-6-ilamino) propil] -4 (3H) -quinazolinona y las sales de la misma. En algunas realizaciones, el inhibidor de PI3K es idelalisib (CAS n.°: 870281-82-6). En una realización, el inhibidor de PI3K inhibe las isoformas alfa y delta de PI3K. En algunas realizaciones, el inhibidor de PI3K es 2-{3-[2-(1-isopropil-3-metil-1H-1,2–4-triazol-5-il)-5,6-dihidrobenzo[f]imidazo[1,2-d][1,4]oxazepin-9-il]-1H-pirazol-1-il}-2-metilpropanamida y las sales de la misma.

En un aspecto adicional de la invención, el tratamiento adicional comprende un inhibidor de tirosina quinasa de Bruton (BTK). En una realización, el inhibidor de BTK es1-[(3R)-3-[4-amino-3-(4-fenoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il]piperidin-1-il]prop-2-en-1-ona y las sales de la misma. En una realización, el inhibidor de BTK es ibrutinib (CAS n.°: 936563-96-1).

En un aspecto adicional de la invención, el tratamiento adicional comprende talidomida o un derivado de la misma. En una realización, la talidomida o un derivado de la misma es (RS)-3-(4-amino-1-oxo 1,3-dihidro-2H-isoindol- 2-il) piperidina-2,6-diona y las sales de la misma. En una realización, la talidomida o un derivado de la misma es lendalidomida (CAS n.°: 191732-72-6).

En un aspecto adicional de la invención,el tratamiento adicional comprende una o más de ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina o prednisolona (CHOP). En una realización, el tratamiento adicional comprende además un anticuerpo anti-CD20 según lo antes descrito (p.ej. GA-101 o Rituxan®). Puede utilizarse, sin limitación, cualquiera de los métodos y tratamientos anteriores para cualquier tipo de cáncer, que incluye, por ejemplo, el tratamiento de un cáncer de células B o cáncer de mama.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para el tratamiento de cánceres HER2 positivos. En una realización, el método comprende la administración a un individuo que padezca dicho cáncer de una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-HER2 de la invención, como un anticuerpo TDB biespecífico, con un brazo dirigido anti-

HER2 y un brazo dirigido anti-CD3. En una realización preferente, el HER2-TDB posee un perfil de toxicidad aceptable cuando se lo administra en una dosis efectiva al paciente. En una realización, el brazo CD3 del HER2-TDB con un perfil de toxicidad aceptable es un brazo CD3 de baja afinidad. En una realización, el brazo CD3 del HER2-TDB con un perfil de toxicidad aceptable es 40G5c.

En una realización preferente, el cáncer HER2 positivo es un cáncer de mama HER2 positivo o cáncer gástrico HER2 positivo. En una realización, un HER2 TDB es co-administrado con uno o más agentes terapéuticos adicionales que se dirigen a la vía HER. En una realización, el agente terapéutico que se dirige a la vía HER es seleccionado de un inhibidor EGFR, un inhibidor HER2, un inhibidor HER3, y/o un inhibidor HER4. En una realización, un HER2 TDB es co-administrado con uno o más agentes terapéuticos adicionales seleccionados de trastuzumab (Herceptin®), T-DM1 (Kadcyla®) y pertuzumab (Perjeta®). En una realización, un HER2 TDB es co-administrado con trastuzumab. En una realización, un HER2 TDB es co-administrado con T-DM1. En una realización, un HER2 TDB es co-administrado con pertuzumab. En una realización, un HER2 TDB es co-administrado con trastuzumab y pertuzumab. En una realización, un HER2 TDB es co-administrado con T-DM1 y trastuzumab.

En un aspecto adicional, la invención proporciona formulaciones farmacéuticas que comprenden alguno de los anticuerpos anti-CD3 previstos en el presente, p.ej. para utilizar en alguno de los métodos clínicos anteriores. En una realización, una fórmula farmacéutica comprende alguno de los anticuerpos anti-CD3 previstos en el presente y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización, una formulación farmacéutica comprende alguno de los anticuerpos anti-CD3 previstos en el presente y, al menos, un agente clínico adicional, por ejemplo, según lo descrito en el presente.

Los anticuerpos de la invención pueden utilizarse solos o en combinación con otros agentes en un tratamiento. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención puede coadministrarse con, al menos, un agente clínico adicional. En ciertas realizaciones, un agente clínico adicional es un agente quimioterapéutico, agente inhibidor del crecimiento, agente citotóxico, agente utilizado en terapia de radiación, agente anti-angiogénesis, agente apoptótico, agente anti-tubulina, u otro agente, tal como un antagonista del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (p.ej. un inhibidor de tirosina quinasa), inhibidor de HER1 / EGFR (p.ej. erlotinib (Tarceva*TM*), inhibidor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (p.ej. Gleevec*TM* (mesilato de imatinib)), un inhibidor de la COX-2 (p.ej. celecoxib), interferón, citoquinas, anticuerpos que no sean el anticuerpo anti-CD3 de la invención, como un anticuerpo que se une a uno o más de los siguientes receptores ErbB2, ErbB3, ErbB4, PDGFR-beta, BlyS, APRIL, BCMA VEGF, o VEGF objetivo, TRAIL/Apo2, PD-1, PD-L1, PD-L2, u otro agente bioactivo o de química orgánica.

En algunas modalidades, la invención proporciona un método en el que el agente clínico adicional es un glucocorticoide. En una realización, el glucocorticoide es dexametasona.

Dichas terapias de combinación indicadas anteriormente abarcan la administración

combinada (donde dos o más agentes clínicos se incluyen en las mismas formulaciones o formulaciones separadas) y la administración separada, en cuyo caso, se pueden producir la administración del anticuerpo de la invención antes, simultáneamente, o después de la administración del agente o agentes clínicos adicionales. En una realización, la administración del anticuerpo anti-CD3 y la administración de un agente clínico adicional se producen en un mes o en el plazo de aproximadamente una, dos o tres semanas, o en aproximadamente uno, dos, tres, cuatro, cinco, o seis días, el uno del otro. También se puede usar cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 de la invención (p. ej., los anticuerpos anti-CD3 biespecíficos de la invención que se unen a CD3 y a una segunda molécula biológica como, p. ej., el antígeno de la superficie celular, el antígeno de un tumor, como el anticuerpo TDB de la invención o la variante correspondiente) en combinación con el tratamiento de radiación.

Un anticuerpo de la invención (o cualquier agente clinico adicional) se puede administrar por cualquier medio adecuado, que incluye parenteral, intrapulmonar e intranasal, y, si se desea para el tratamiento local, la administración intralesional. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, o subcutánea. En algunas representaciones, el anticuerpo se administra por vía subcutánea. En algunas representaciones, el anticuerpo anti-CD3 que se daministra mediante inyección subcutánea exhibe una respuesta menos tóxica en el paciente en que el mismo anticuerpo anti-CD3 le es administrado por inyección intravenosa. La dosis puede administrarse por cualquier vía adecuada, por ejemplo, mediante inyecciones, como inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica. En el presente se contemplan varios cronogramas de administración de la dosis que incluyen, por ejemplo, administraciones únicas o múltiples, en diversos puntos de tiempo, administración en bolo e infusión de pulso.

Los anticuerpos de la invención se formularían, dosificarían y administrarían de manera coherente con la buena práctica médica. Los factores a considerar en este contexto incluyen el trastorno particular a tratar, el mamífero específico que se trata, la condición clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de suministro del agente, el método de administración, el cronograma de la administración y otros factores conocidos por los médicos. El anticuerpo no necesariamente debe ser, pero se formula opcionalmente con uno o más agentes utilizados en la actualidad para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad del anticuerpo presente en la formulación, el tipo de trastorno o tratamiento y otros factores analizados anteriormente. En general, se utilizan en las mismas dosis y vías de administración que se describen en el presente, o aproximadamente del 1 al 99% de las dosis descritas en el presente, o en cualquier dosis y por cualquier vía que se determine que es empíricamente/clínicamente adecuada.

Para la prevención o el tratamiento de la enfermedad, la dosis adecuada de un anticuerpo de la invención (cuando se usa solo o en combinación con uno o más de otros

agentes clínicos adicionales) dependerá del tipo de enfermedad a tratar, el tipo de anticuerpo, la gravedad y el curso de la enfermedad, si el anticuerpo se administra con fines preventivos o clínicos, tratamiento previo, la historia clínica del paciente y la respuesta al anticuerpo, y la discreción del médico tratante. El anticuerpo se administra convenientemente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos.

Como propuesta general, la cantidad clínicamente eficaz del anticuerpo anti-CD3 administrada a humanos estará en el rango de alrededor de 0,01 a 100 mg/kg del peso corporal del paciente ya sea mediante una o más administraciones. En algunas realizaciones, el anticuerpo utilizado es de alrededor de 0,01 a 45 mg/kg, alrededor de 0,01 a 40 mg/kg, alrededor de 0,01 a 35 mg/kg, alrededor de 0,01 a 30 mg/kg, alrededor de 0,01 a 25 mg/kg, alrededor de 0,01 a 20 mg/kg, alrededor de 0,01 a 15 mg/kg, alrededor de 0,01 a 10 mg/kg, alrededor de 0,01 a 5 mg/kg, o alrededor de 0,01 a 1 mg/kg administrador diariamente, por ejemplo. En una realización, un anticuerpo anti-CD3 descrito en el presente se administra a humanos a una dosis de alrededor de 100 mg, alrededor de 200 mg, alrededor de 300 mg, alrededor de 400 mg, alrededor de 500 mg, alrededor de 600 mg, alrededor de 700 mg, alrededor de 800 mg, alrededor de 900 mg, alrededor de 1000 mg, alrededor de 1100 mg, alrededor de 1200 mg, alrededor de 1300 mg o alrededor de 1400 mg el día 1 de los ciclos de 21 días. La dosis puede administrarse como una dosis única o con dosis múltiples (p.ej. 2 o 3 dosis), como infusiones. Para las dosis repetidas durante varios días o más, según la condición, el tratamiento se mantendría, en general, hasta que se produzca una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Una dosis ejemplar del anticuerpo estaría en el rango de alrededor de 0,05 mg/kg a alrededor de 10 mg/kg. Por lo tanto, una o más dosis de alrededor de 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas) podría administrarse al paciente. Dichas dosis pueden administrarse intermitentemente, por ejemplo, cada semana o cada tres semanas (p.ej. de modo tal que el paciente reciba de aproximadamente dos a unas veinte o, por ejemplo, alrededor de seis dosis del anticuerpo anti-CD3). Puede administrarse una dosis de carga inicial más elevada, seguida de una o más dosis más bajas. El avance de este tratamiento se monitoriza fácilmente a través de técnicas y ensayos convencionales.

En algunas realizaciones, los métodos pueden comprender además un tratamiento adicional. El tratamiento adicional puede ser terapia de radiación, cirugía, quimioterapia, terapia genética, terapia de ADN, terapia viral, terapia de ARN, inmunoterapia, trasplante de médula osea, nanoterapia, terapia de anticuerpo monoclonal o una combinación de los anteriores. El tratamiento adicional puede ser en forma de tratamiento adyuvante o neoadyuvante. En algunas realizaciones, el tratamiento adicional es la administración del inhibidor de molécula pequeña enzimática o del agente anti-metastásico. En algunas realizaciones, el tratamiento adicional es la administración de agentes limitantes de efectos secundarios (p.ej. agentes destinados a disminuir la ocurrencia o gravedad de los efectos secundarios del tratamiento, como los agentes antinauseosos, etc.). En algunas realizaciones, el tratamiento adicional es la terapia de radiación. En algunas

realizaciones, el tratamiento adicional es cirugía. En algunas realizaciones, el tratamiento adicional es una combinación de terapia de radiación y cirugía. En algunas realizaciones, el tratamiento adicional es la irradación gamma. En algunas realizaciones, el tratamiento adicional puede ser una administración separada de uno o más de los agentes clínicos antes descritos.

H. Artículos de fabricación

En otro aspecto de la invención, se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento, la prevención o el diagnóstico de los trastornos antes descritos. El artículo de fabricación comprende un envase y una etiqueta o un inserto del empaque en o asociado con el envase. Los envases adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas, bolsas de solución IV, etc. Los envases pueden estar formados de diversos materiales como vidrio o plástico. El envase contiene una composición que es por sí misma o combinada con otra composición eficaz para tratar, prevenir o diagnosticar la condición y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el envase puede tener una bolsa de infusión o un vial que tiene un tapón perforable con una aguja de inyección hipodérmica). Por lo menos un agente activo de la compoisición es un anticuerpo de la invención. La etiqueta o el inserto del empaque indica que la composición se utiliza para tratar la condición de elección. Por otra parte, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer envase con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un anticuerpo de la invención; y (b) un segundo envase con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un agente citotóxico o de otro modo clínico adicional. El artículo de fabricación en esta realización de la invención puede comprender, además, un inserto del empaque que incique que la composiciones pueden utilizarse para tratar una condición especíica. Opcional o adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo (o tercer) envase que comprende una solucíoon amortiguadora farmacéuticamente aceptable, como agua bacteriostática para inyección (BWFI), solución salina amortiguada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, que incluyen otras soluciones amortiguadoras, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

III. EJEMPLOS

Los siguientes son ejemplos de métodos y composiciones de la invención. Se entiende que pueden ponerse en práctica otras diversas versiones, dada la descripción general proporcionada anteriormente.

Ejemplo 1. Generación de Anticuerpos Anti-CD3

Antígenos CD3ε

A. CD3ε humano y macaco biespecíficos+ CD3γ fusionado con IgG2a-Fc de ratón (CD3εγ-muFc)

El ADNc que codifica porciones extracelulares de CD3ε humano o de mono cynomolgus (macaco) o CD3γ se fusionó en el C-terminal con un IgG2a de ratón en Fc para generar fusiones de CD3-Fc. Los ADNc que codifican los dominios extracelulares de CD3ε y CD3γ humano o macaco se generaron con ARN total de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) activada con anti-CD3/anti-CD28. Las PBMC normales se activaron mediante anti-CD3 y anti-CD28 inmovilizados por placa en RPMI complementado con un 10% de FBS durante 72 h. El ARNm total se aisló con un mini kit RNeasy de Qiagen. Se clonó el ADNc con iniciadores específicos de genes por RT-PCR en vectores TOPO con productos de PCR amplificados con polimerasa Taq siguiendo el protocolo proporcionado con el kit de clonación TOPO TA de Invitrogen. Los fragmentos resultantes se introdujeron en un vector de expresión mamífero que contiene un dominio Fc de IgG2a murino por subclonación libre de restricciones con polimerasa de ADN de alta fidelidad Phusion (New England Biolabs, Catálogo n.° M0530L). Los fragmentos de CD3 se amplificaron de esta manera con la superposición de las regiones contenidas en el plásmido de la plantilla para orientarlos directamente en forma descendente de la secuencia de la señal y el N-terminal al Fc murino.

Tanto para las construcciones humana como de macaco, el CD3ε-Fc que contiene el plásmido se co-expresó temporalmente con el CD3γ-Fc que contiene el plásmido en las células CHO mamíferas. Los heterodímeros de CD3ε/γ se purificaron con sefarosa de proteína A (Pharmacia Biotech).

B. Conjugados de KLH de péptido de N-terminal (CD3ε-KLH)

Se sintetizaron fragmentos de péptidos que contienen secuencias de N-terminal de CD3ε de macaco y humano. Los fragmentos destinados a la inmunización se conjugaron con hemocianina de lapa californiana (KLH), una proteína portadora ampliamente utilizada para generar una respuesta inmune importante. Al añadir la cisteína de origen natural en la posición 28 para el CD3ε de macaco y humano permitía el acoplamiento de KLH activada por maleimida a la cisteína de C-terminal que contiene tiol.

*C. CD3ε-26mero-CD3*γ de cadena sencilla *(CD3εγ)*

Los ADNc que codifican porciones extracelulares de subunidades CD3ε y CD3γ humanas fueron generados por RCP. Los aminoácidos 1-97 de CD3ε humano y los aminoácidos 1-81 de CD3γ humano se conectaron con un conector peptídico flexible de 26 aminoácidos para formar una construcción de CD3ε-26mero-CD3γ (CD3εγ) (Figura 1). La construcción se clonó en un vector de expresión con un His-tag para la secreción de *E. coli* con el promotor de fosfatasa alcalina y la secuencia de la señal de secreción STIII. CD3εγ se purificó en una columna Ni y posteriormente se volvió a plegar. A continuación, el CD3εγ debidamente plegado se purificó luego con una columna de afinidad OKT3.

Además, para algunos experimentos de aglutinación, se compró CD3ε comercial a Creative Biomart, Shirley, New York 11967 (Número de catálogo CD3E-2194H).

Inmunizaciones

A. Inmunizaciones de ratón

Se inmunizó a ratones BALB/c o C57BL/6 (2 µg o 10 µg/inyección por ratón). Los antígenos, suspendidos en adyuvante de monofosforil lípido A /trehalosa dicorinomicolato, se inyectaron en la almohadilla de la pata a intervalos de 3 a 4 días por un total de 12-15 refuerzos. Tres días después del refuerzo previo a la infusión final, se recolectaron linfocitos de bazos y nódulos linfáticos de ratones inmunizados. Los linfocitos de los ratones aislados se fusionaron con células de mieloma SP2/0-Ag14 (Recolección de cultivo tipo estadounidense) con el aparato Cyto Pulse CEEF-50 (Cyto Pulse Sciences). Brevemente, después de lavar dos veces con medio C de Citofusion (N.° de cat. LCM-C), las células del bazo y las células SP2/0-Ag14 aisladas se mezclaron en una proporción de 1:1 y luego se suspendieron a 10 millones de células/ml en medio C de Citofusion, se realizó electrofusión de acuerdo con la instrucción del fabricante. Las células fusionadas se cultivaron en medio C de ClonaCell-HY (N.° de cat. 03803) durante la noche a 37 °C en una incubadora de CO_2 al 7%. Al día siguiente, las células fusionadas se centrifugaron y luego se suspendieron en 10 ml de medio C de ClonaCell-HY y luego se mezclaron suavemente con 90 ml de medio D basado en metilcelulosa ClonaCell-HY (N.° de cat. 03804) que contiene componentes de HAT. Las células se colocaron en placas OmniTray (Thermo Scientific) y se permitió su crecimiento a 37 °C en una incubadora de CO_2 al 7%. Después de 6 a 7 días de incubación, se recogieron clones de hibridoma individuales con ClonePix FL (Molecular Devices) y se transfirieron en placas de cultivo de células de 96 pozos (N.° 353075, Becton Dickinson) con medio E de 200 µl/pozo de ClonaCell-HY (N.° de cat. 03805). Los medios de cultivo de hibridoma se cambiaron antes de la evaluación ELISA.

B. Inmunizaciones de conejo

Se realizaron inmunizaciones en conejos con 0,5 mg/inyección con CD3ε-KLH humano y de macaco CFA/IFA cada 2 semanas por 5 inyecciones (d0, d14, d28, d42, d56). Se tomaron sangrados los días 52 y 66.

Las fusiones y selecciones de PEG se realizaron de la siguiente manera: Se evaluaron los clones para unión a la porción N-terminal de CD3ε conjugada con tiroglobulina (THY) con ELISA. Se determinó que todos los clones positivos tienen una reacción cruzada con CD3ε de macaco mediante ELISA y se seleccionaron 16 clones únicos para subclonación. Se extrajo el ARN total del sedimento celular congelado y se purificó con un kit RNeasy de Qiagen siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADNc de primera cadena se sintetizó con un paso de RT-PCR (Qiagen). Los dominios VH y VL de conejo se amplificaron aún más con PCR con un protocolo descrito para generar genotecas inmunes de conejo (Kontermann y Dubel. *Antibody Engineering*. 1: 115-123, 2010). Se

designó la degeneración moderada para representar los genes de inmunoglobulina de la línea germinal del conejo común.

Selección de anticuerpos

A. Selección de hibridoma de ratón

3 días después del cambio de medios, se seleccionaron supernadantes de hibridoma mediante ELISA para la unión con CD3ε tanto humano como de macaco, como se describe a continuación. Todos los clones positivos de ELISA se seleccionaron además mediante citometría de flujo para la unión a células T Jurkat humanas, PBMC humanas y PBMC de macaco (Figuras 2 y 3). Se purificaron supernadantes de hibridoma mediante cromatografía de afinidad de Proteína A, luego se realizó una filtración estéril (tamaño de poro de 0,2-µm, Nalge Nunc International, NY, EE.UU.) y se almacenaron a 4°C en PBS. Se confirmaron mAbs purificados mediante ELISA antes de la evaluación en ensayos funcionales. Se determinó el isotopo mAb con un kit para isotipos de anticuerpos monoclonales de ratón de Roche Diagnostics Corporation.

La Figura 4A muestra las secuencias de aminoácidos de dominios variables de cadena ligera y pesada de los anticuerpos anti-CD3 13A3, 72H6 y 19B1. La Figura 4A también delimita las secuencias de HVR para cada uno de los tres anticuerpos. Las Figuras 4B, 4C, 5A y 5B muestran las secuencias de aminoácidos de dominios variables de cadena ligera y pesada de otros anticuerpos anti-CD3.

B. Selección después de las inmunizaciones de conejo

Se clonaron ocho secuencias de cadena pesada individuales y seis secuencias de cadena ligera individuales de las líneas de células de hibridoma. La Figura 7 muestra las secuencias de cadena pesada y ligera para uno de estos anticuerpos, Rab17. Debido a la gran similitud en la secuencia se decidió enfocarse en 6 pares pesados y ligeros. Los 6 anticuerpos resultantes se expresaron como IgG quiméricos de conejo/humano a pequeña escala (cultivos de 100 ml de 293S) y se seleccionaron para la unión a CD3 epsilon mediante ELISA.

Caracterización de anticuerpos: ensayos de afinidad de unión y actividad de activación de células T

A. Ensayo ELISA de unión de CD3εγ

El ensayo ELISA de unión de CD3εγ se llevó a cabo en placas ELISA de microtitulación de 96 pozos (Greiner, Alemania) recubiertos con aminoácidos de N-terminal de CD3ε ya sea humano/de macaco conjugados con THY o CD3ε/γ ya sea humano/de macaco fusionado con Fc murino a 2 µg/ml en una solución amortiguadora de carbono de 0,05 M (pH 9,6), 4°C durante la noche. Después de lavar tres veces con solución amortiguadora de lavado (0,05% Tween 20 en PBS), las placas se bloquearon con 200 µL de diluyentes de ensayo ELISA con BSA. Se añadieron e incubaron 100 µL de supernadantes cultivados o mAb purificados diluidos durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres

veces y se incubaroncon IgG Fc anti ratón de cabra conjugado con HRP durante 1 hora. Después de lavar tres veces, se detectó una enzima ligada al agregar 100 µL/pozo de sustrato de TMB (BioFX Laboratories, MD, EE.UU.) durante 5 minutos. Se detuvieron las reacciones al agregar 100 µL/pozo de reactivo de detención (BioFX Laboratories, MD, EE.UU.) y la detección de color a A_{630} *nm*.

B. Análisis de citometría de flujo

Células T Jurkat humanas, PBMC humanas o PBMC de macaco se lavaron dos veces con solución amortiguadora de tinción de FACS (solución salina amortiguada con fosfato que contiene un 1% de suero fetal bovino) y luego se suspendieron en solución amortiguadora de tinción de FACS hasta una concentración final de 5 x 10^6 celulas/ml. Se agregaron células de 100 µl a la placa de cultivo de tejido de 96 pozo con fondo en U (#353077, Becton Dickinson) y se agregaron 100 µl de supernadantes de hibridoma o mAbs purificados diluidos. Después de 30 minutos de incubación en hielo, se lavaron las células dos veces con solución amortiguadora de tinción de FACS y se tiñeron posteriormente con anticuerpo IgG anti ratón de cabra conjugado con FITC o aloficocianina (APC)(#1012-11, Southern Biotech) a una dilución de 1:300 durante 30 minutos. Después de lavar dos veces con solución amortiguadora de tinción de FACS, las células se analizaron mediante citometría de flujo FACSCalibur (BD Biosciences). Los datos se analizaron con el software FlowJo (Tree Star, Inc.).

C. Ensayo de activación de célula T humana

Se recolectó sangre humana en jeringas heparinizadas y se aisló PBMC con Leucosep (Greiner Bio-one, n.° de cat. 227290P) y Ficoll Paque Plus (GE Healthcare Biosciences, n.° de cat. 95038-168), según lo recomendado por la fabricación. Las células se lavaron en medio RPMI que contiene un 10% de FBS, complementado con GlutaMax (Gibco, n.° de cat. 35050-061), penicilina y estreptomicina (Gibco, n.° de cat.15140-122), y se agregaron ~0,2 millones de células suspendidas a una placa con fondo en U de 96 pocillos. Se agregaron anticuerpos anti-CD3 entre 0,01 y 10 µg/ml. Después cultivar durante ~ 20 horas, se lavaron las células con solución amortiguadora FACS (0,5% BSA, 0,05% azida de Na en PBS). Luego se tiñeron las células con anti-CD69-FITC (BD, cat n.° 555530), anti-CD25-PE (BD, cat n.° 555432) anti-CD4-APC (BD, cat n.° 555349) o anti-CD8-APC (BD, cat n.° 555369) en solución amortiguadora FACS, se lavaron con solución amortiguadora FACS y se suspendieron en 100 ul de solución amortiguadora de FACS que contiene 1µg/ml de yoduro de propidio. Se recopilaron los datos en un citómetro de flujo FACSCalibur y se analizaron con FlowJo. Se determinó el grado de activación de las células T comparando el porcentaje de población CD69 + y CD25 + en las células CD4 + o CD8 + T.

D. Ensayo de activación de células T en macacos

Se extrajo sangre de macaco en tubos heparinizados. Se lisaron glóbulos rojos dos veces

con tampón de lisis de glóbulos rojos ACK (0,874% de NH4Cl, 0,1% de KHCO3, 0,00368 de EDTA de disodio). Las células se lavaron en medio RPMI que contiene un 10% de FBS, complementado con GlutaMax (Gibco, n.° de cat. 35050-061), penicilina y estreptomicina (Gibco, n.° de cat.15140-122), y se agregaron ~0,2 millones de células suspendidas a una placa con fondo en U de 96 pocillos. Se agregaron anticuerpos anti-CD3 a 10 µg/ml. Después cultivar durante ~ 20 horas, se lavaron las células con solución amortiguadora FACS (0,5% BSA, 0,05% azida de Na en PBS). Luego se tiñeron las células con anti-CD69-FITC (BD, n.° de cat. 555530), anti-CD25-PE (BD, n.° de cat. 555432) anti-CD4-APC (BD, n.° de cat. 551980) en solución amortiguadora FACS, se lavaron con solución amortiguadora FACS y se suspendieron en 100 µg de solución amortiguadora de FACS que contiene 1 µg/ml de yoduro de propidio. Se recopilaron los datos en un citómetro de flujo FACSCalibur y se analizaron con FlowJo. Se determinó el porcentaje de activación de células T al comparar el porcentaje de la población de CD69+ y CD25+ en las células T CD4+.

Generación de variantes de anticuerpos anti-CD3

A. Clonación y secuenciación de hibridomas de reacción cruzada humano/macoco de ratón CD3εγ

Se extrajo el ARN total de células de hibridoma de ratón con el kit RNeasy (Qiagen) y se sintetizó ADNc de primera cadena con un kit SuperScript III RT (Invitrogen). Se amplificaron genes de anticuerpo con RCP de polimerasa Taq con corrección de errores con una mezcla de cebadores 5' degenerados y cebadores 3' Cγ□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□Se purificaron los productos RCP y se obtuvieron las regiones variables de los anticuerpos de cadenas ligeras y pesadas mediante la secuenciación del producto de RCP. Se digirieron las regiones variables de anticuerpo de cadenas ligeras y pesadas con enzimas de restricción adecuadas y se clonaron en los vectores de expresión pRK respectivos. Los anticuerpos murinos se expresaron en 293 células.

B. Humanización

Se alinearon las secuencias de hibridomas de reacción cruzada de humano/macaco CD3εγ hasta lograr el consenso humano o los dominios variables pesados o ligeros de la línea germinal más homólogos posibles (Figura 7). Se derivó una secuencia de consenso llamada mu40G5c de los dominios variables de cadena pesada o ligera de los clones de hibridona relacionados (Figura 7). Se diseñaron regiones hipervariables (HVR) en marcos humanos de selector para generar injertos de CDR humanizados (consulte, por ejemplo, las figuras 8A-8F). Variantes humanizadas se evaluaron en forma de fragmentos Fab o como IgG. Las posiciones de dominio VL 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) y las posiciones de dominio VH 26-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) se utilizaron para los injertos (Figuras 8A-8F). También se generaron variantes adicionales que incluyeron varias combinaciones de una o más posiciones de vernier de ratón y se evaluaron para

determinar la afinidad de unión (consulte, p.ej., las Figuras 9A-9F). Se incorporaron residuos de dominio de variables murinas en posiciones seleccionadas de *vernier* en una secuencia humanizada final con base en su capacidad para mejorar la afinidad de unión. La Figura 10 muestra las afinidades de unión monovalentes para los anticuerpos humanizados seleccionados para los diferentes antígenos CD3ε. La Figura 11 muestra las afinidades de unión para las variantes de afinidad del anticuerpo anti-CD3 humanizado 38E4 (38E4v1-38E4v9) y 40G5c.

C. Mapeo parátopo

Cada residuo en HVR-L3 y HVR-H3 de hu38E4 se mutó por separado a la alanina con la mutagénesis Kunkle. Además, la posición 95 en HVR-H3 también se mutó a serina, treonina o glutamato. Se expresaron la variantes con estas mutaciones puntuales como Fab en células HEK293 y se seleccionaron inicialmente con un método de cinética de ciclo único en un Biacore T100. También se aumentaron las variantes seleccionadas y se purificaron para un método convencional de cinética por multiciclo. Para la cinética de ciclo único, se inmovilizaron chips de sensor Biacore serie S CM5 con anticuerpos Fab anti-humanos (kit de captura de Fab humana, GE Healthcare). Cada Fab fue capturado de sobrenadante de cultivo y las concentraciones crecientes (que van desde 3 nM a 250 nM en tampón de IESE) de CD3εγ humano fueron inyectados secuencialmente con un caudal de 30 µl/min en un solo ciclo de análisis sin regeneración de la superficie entre las inyecciones; se adquirió una disociación de 10 min para cada ciclo. Para el ciclo múltiple de cinética convencional, se inmobilizaron CD3εγ humano, CD3εγ macaco o un 27-mer péptido sobre chip sensor Biacore serie S CM5 con el uso del kit de acoplamiento amino de Biacore. Diluciones seriadas 3 veces de cada variante Fab se inyectaron con un caudal de 30 µl/min. Cada muestra se analizó con un protocolo de Asociación de 3 minutos y disociación de 3 minutos. En ambos métodos, los chips Biacore se regeneraron mediante 10 mM glicina (pH 1.7). Se corrigió la respuesta de unión mediante sustracción en blanco y se utilizó un modelo de Languir 1:1 de colocación simultánea de k_{on} y k_{off} para el análisis de la cinética. Los efectos de estas mutaciones, resumidos en la figura 12, indican residuo de la cadena ligera R96 y residuos de cadena pesada Y97, R99 y F100b juegan un papel crítico en el enlace a CD3εγ.

D. Mapeo epítopo CD3

Se introdujeron mutaciones de la alanina en CD3ε1-27-Fc para evaluar el reconocimiento de epítopos de anticuerpos de anti-CD3ε N-terminal vinculante. Se inmovilizó cada variante de CD3ε1-27-Fc en placas Nunc Maxisorp de un día para el otro en PBS a 2 µg/ml a 4 °C. Tras bloquear las placas con leche en polvo al 2% en PBS con 0,05% de Tween 20 durante 1h, se agregó 100 µl de 3 nM anti-CD3ε a cada uno bueno y se dejó enlazar durante 1h a 25 °C. Después de 6 lavados con PBS con un 0,05% Tween 20, se detectó la unión de anticuerpos por la adición de anti-ratón IgG-HRP de anticuerpo secundario, como se muestra en la figura 13A.

CD3εγ se sub clonó en un Fagémido M13 que contiene una etiqueta de gD C-terminal seguido de un codón de parada ámbar, para que pueda aparece en fago o expresarse en una cepa no supresora de *E. coli*. Se utilizó este Fagémido CD3εγ como una plantilla para hacer las mutaciones individuales de alanina en CD3ε mediante mutagénesis Kunkel. Cada mutante de alanina CD3ε que aparece en Fago, se confirmó por secuenciación del ADN aislado de una sola colonia, crecido durante la noche en 2YT/Carb plus fago KO7 ayudante y se purificó mediante la precipitación de PEG. El efecto de la mutación de alanina en CD3εγ en la unión de anticuerpos anti-CD3 se evaluó mediante un fago ELISA. Se inmovilizó cada anticuerpo anti-CD3 en una placa maxisorp NUNC a 2 µg/ml de tampón PBS durante la noche a 4 °C. Se agregó el sobrenadante fago purificado que muestra una variante de alanina CD3εγ (1.0 OD450) a la placa y se dejó enlazar a temperatura ambiente con agites durante 1 h. Después del lavado, se detectó fago ligado con anti-M13-HRP (GE Healthcare cat. # 45-001-419). Se comparó el ligado de cada variante de alanina CD3εγ con el ligado fago CD3εγ tipo salvaje (figura 13B). También se caracterizaron las variantes de alanina que afectaron enlace con anticuerpos anti-CD3, por la evaluación de enlace como una función de la concentración de fago (Figura 13C).

Para cuantificar el impacto de las mutaciones de alanina en CD3 en la unión de anticuerpos, se expresaron mutantes de alanina de CD3 en una cepa de no supresora de *E. coli*. Las variantes CD3εγ secretadas fueron capturadas de la fracción periplásmica cruda mediante el uso del anticuerpo anti-CD3 UCHT1v9. Se inmobilizó a UCHT1v9 en un chip serie S CM5 a través del acoplamiento de amina mediante el uso del kit de captura del anticuerpo anti-humano IgG (Fc) (BR-1008-39) de GE Healthcare. Se realizaron mediciones SPR en el instrumento Biacore 4000, mediante el software de evaluación cinética. Para medir las afinidades vinculantes monovalentes, se utilizaron anticuerpos anti-CD3 biespecíficos, en los cuales un brazo era el anti-CD3 a ser probado y el brazo reconoció un antígeno irrelevante. Los anticuerpos anti-CD3 biespecíficos se transmitieron por el sobrenadante capturado en una serie de concentración de diluciones dobles de 0,39 a 100 nM. La cinética resultante (figura 13D) se midió y calculó con el software de Biacore 4000 BIAevaluation (código de producto 28-9664-57).

E. Mapeo estructural del lugar de unión de CD3ε

1. Hu38E4.v1 Fab

Se mezcló Hu38E4.v1 Fab, disuelto en NaCl 0,15 M, 25 mM tris, pH 7,5 a 10 mg/ml y un doble exceso molar (1 mg) de péptido CD3ε, QDGNEEMGGITQTPYK (N.° de ID de SEC.: 284) (Figura 14A) y se sometió a ensayos de cristalización. Se realizó la proyección inicial con una matriz rala de precipitados en formato de difusión de vapor por gota sentada. Los cristales optimizados se desarrollaron en una mezcla 1:1 con una solución de depósito con 70% de v/v de metilpentano, y 0,1 m de tampón HEPES a un pH de 7,5. El depósito se utilizó como crioprotector. Los cristales se transferirieron a temperatura criogénica por inmersión súbita en nitrógeno líquido.

Los datos de difracción de co-cristales péptidos hu38E4.v1 y CD3ε se recopilaron en

línea de haz del Advanced Photon Source hu38E4, con un detector CCD v1. Luego, se integraron las defracciones registradas pueden y se ampliaron con el uso del programa HKL2000.

La estructura se escalonó mediante el método de reemplazo molecular (MR) utilizando el programa Phaser. El modelo de búsqueda de MR fue una sub-unidad Fab derivada de una estructura cristalina del complejo HGFA/Fab (código PDB: 2R0L). El péptido de complejo CD3ε se desarrolló en la estructura basada en un mapa Fo-Fc. Como consecuencia, la estructura se refinó con los programas REFMAC5 y PHENIX, implementando las funciones objetivo de probabilidad, el método de refinamiento de factor-B individual anisotrópico y el método de refinamiento TLS, para lograr la convergencia. Las estadísticas de datos y el refinamiento se muestran en la tabla 3A.

TABLA 3A. Recopilación de datos y estadísticas de refinamiento para el complejo hu38E4.v1/CD3ε

Grupo de espacio	P3221
Células unitarias	a=73,2Å, b=73,2Å,c=183,7Å α=90° β=120° γ=90°
Resolución	50,0 - 1,95 Å
Cantidad total de reflejos	42632 (4188)[1]
Integridad (%)	100 (100)
Redundancia	19,7 (8,3)
I/σ	7,1 (3,0)
Rsym[2]	0,112 (0,812)
Rango de resolución	50 - 1,95 Å
Rcryst[3] / Rfree[4]	0,152/0,185
Atomos que no son de hidrógeno	3960
Moléculas de agua	446
Promedio B, General	21,97
Promedio B, Proteína	20,63
Promedio B, Agua	32,27
longitudes de enlace r.m.s.d.	0,009 Å
ángulos r.m.s.d.	1,258°

[1]Los valores entre paréntesis son para la cubierta con resolución más alta, que es 2,02 Å–1,95 Å.

[2]Rsym = $\Sigma|I_{hi} - I_h|/ \Sigma I_{hi,}$ donde I_{hi} es la intensidad aumentada de la observación relacionada con la simetría *i*th del reflejo *h e* I_h es el valor medio.

[3]Rcryst = $\Sigma_h|F_{o,h} - F_{c,h}| / \Sigma_h F_{o,h}$, donde $F_{o,h}$ y $F_{c,h}$ son las amplitudes de factor estructural observadas y calculadas para el reflejo *h*.

[4]El valor de R_{libre} se calcula para el 5% de las reflexiones escogidas de forma aleatoria en el perfeccionamiento.

La estructura cristalina del complejo péptido Fab/CD3ε hu38E4.v1 se determinó a una resolución del 1.9Å. La estructura reveló que el péptido CD3ε hace un pequeño giro y se inserta profundamente en la hendidura entre las cadenas pesadas y ligeras de Fab 38E4.v1 (figuras 14B y 14C). La unión entierra 666 Å2 del área de superficie accesible de solvente entre el péptido y el fragmento Fab y consiste en una intrincada red de enlace interacciones iónicas, hidrofóbicas y de hidrógeno (Figura 14D). El anillo de piroglutamato (pyroglu) N-terminal se empaca contra la cadena pesada Tyr33 y hace un enlace de hidrógeno con la cadena pesada His35 en RHV-H1. La cadena lateral abultada del residuo F100b en HVR-H3 empuja a His35 en una orientación adecuada para su interacción con pyroglu y explica la pérdida de enlace observada cuando F100b muta a alanina, un residuo de la cadena lateral pequeño. Además, en consonancia con los resultados del análisis de alanina, el R96 en CDR-L3 hace una unión hidrógena crítica con el grupo carboxilo en el pyroglu, mientras que Y97 en CDR-H3 hace una unión hidrógena con el Met7 del péptido CD3ε (figura 14E). Curiosamente, mientras que la substitución de alanina en R99 en CDR-H3 tiene un impacto dramático en la unión del antígeno, la estructura revela que esta cadena apunta fuera del péptido CD3ε y no se involucra en las interacciones con el péptido. En cambio, R99 hace amplios contactos con varios residuos en CDR-H3, entre ellos un enlace de hidrógeno con D101 y un empaque hidrofóbico contra Y100a que también impacta en el residuo vernier, Y49 LC (figura 14F). Estas interacciones son, probablemente, importantes para el apoyo y la disposición general de los bucles CDR en el 38E4.v1 Fab organizando la crítica hendidura central entre las cadenas pesadas y ligeras para permitir el enlace de péptido CD3ε.

La Figura 14G identifica todos los residuos de la 38E4.v1 Fab que estaban decididos a residir dentro de 5 Å desde el péptido CD3ε. Estos residuos de contacto antígeno son idénticos entre hu38E4.v1 y hu40G5c, con la excepción que ese residuo G96 de hu38E4.v1 es un residuo de serina (S96) en hu40G5 (ver figura 14 H, que representa la ubicación del residuo de contacto G96 de hu38E4.v1).

Los contactos entre anti-CD3 (38E4.v1) y el péptido $CD3_{\varepsilon\gamma}$ se calculan con base en el análisis de alanina. Los epítopos reconocidos por el 38E4v1 anti-CD3 son contactos con una distancia de 3,5 Angstroms o menos, como en la siguiente tabla 3B. De este análisis, se descubrió que los epítopos CD3 Gln1 (PCA1, ácido piroglutámica), Asp2, Glu6 y Met7 son un contacto importante que forman residuos con la paratopes de la cadena ligera y las regiones variables de la cadena pesada del anticuerpo CD3.

TABLA 3B. Contactos de CD3 para el complejo hu38E4.v1/CD3ε

Cadena de anticuerpos	**Residuos**	**Nombre del átomo**	**Átomo**	**Péptido CD3**	**Residuos**	**Nombre del átomo**	**Átomo**	**Distancia**
/L/	96(ARG)	NH2	N	**/A/**	**1(PCA)**	**O**	**O**	2,76
/H/	35(HIS)	NE2	N	/A/	1(PCA)	OE	O	2,85*
/L/	96(ARG)	NH1	N	**/A/**	**1(PCA)**	**O**	**O**	2,9
/L/	96(ARG)	CZ	C	/A/	1(PCA)	O	O	3,24
/H/	33(TYR)	CG	C	/A/	1(PCA)	OE	O	3,27
/L/	96(ARG)	NH2	N	/A/	1(PCA)	OE	O	3,28
/H/	100(TYR)	CD1	C	/A/	1(PCA)	O	O	3,33
/H/	33(TYR)	CB	C	/A/	1(PCA)	OE	O	3,34
/L/	96(ARG)	NH2	N	/A/	1(PCA)	CD	C	3,35
/H/	33(TYR)	CD2	C	/A/	1(PCA)	OE	O	3,44
/H/	50(TRP)	CH2	C	/A/	1(PCA)	N	N	3,45
/H/	33(TYR)	CD2	C	/A/	1(PCA)	CD	C	3,47
/H/	50(TRP)	CZ3	C	/A/	1(PCA)	N	N	3,48
/L/	**94(LEU)**	**N**	**N**	/A/	2(ASP)	OD1	O	2,71
/H/	50(TRP)	CH2	C	/A/	2(ASP)	OD1	O	3,23
/L/	92(PHE)	O	O	/A/	2(ASP)	CB	C	3,44
/H/	100(TYR)	CE1	C	/A/	2(ASP)	O	O	3,48

/L/	**91(SER)**	**O**	**O**	**/A/**	**3(GLY)**	**N**	**N**	2,88
/L/	27(ASN)d	ND2	N	**/A/**	**3(GLY)**	**O**	**O**	2,96
/L/	**92(PHE)**	**O**	**O**	**/A/**	**3(GLY)**	**N**	**N**	3,22
/L/	32(TYR)	OH	O	/A/	3(GLY)	O	O	3,3
/L/	32(TYR)	CZ	C	/A/	3(GLY)	O	O	3,42
/L/	32(TYR)	CE2	C	/A/	3(GLY)	O	O	3,42
/L/	91(SER)	O	O	/A/	3(GLY)	CA	C	3,49
/L/	**92(PHE)**	**O**	**O**	**/A/**	**4(ASN)**	**N**	**N**	2,81
/L/	27(ARG)f	NH1	N	**/A/**	**4(ASN)**	**O**	**O**	3,06
/L/	92(PHE)	O	O	/A/	4(ASN)	CB	C	3,11
/L/	92(PHE)	CZ	C	/A/	4(ASN)	OD1	O	3,43
/L/	32(TYR)	OH	O	/A/	6(GLU)	OE1	O	2,58*
/L/	30(LYS)	NZ	N	/A/	6(GLU)	OE2	O	2,74*
/L/	27(ARG)f	NH1	N	**/A/**	**6(GLU)**	**O**	**O**	2,77
/L/	27(ASN)d	ND2	N	**/A/**	**6(GLU)**	**O**	**O**	3,04
/L/	30(LYS)	NZ	N	/A/	6(GLU)	OE1	O	3,2
/L/	30(LYS)	CD	C	/A/	6(GLU)	OE1	O	3,35
/L/	30(LYS)	NZ	N	/A/	6(GLU)	CD	C	3,36
/H/	100(TYR)	CE2	C	/A/	6(GLU)	OE1	O	3.4
/H/	98(SER)	CA	C	/A/	6(GLU)	OE2	O	3,42
/H/	100(TYR)	OH	O	/A/	6(GLU)	CB	C	3,44
/L/	32(TYR)	CZ	C	/A/	6(GLU)	OE1	O	3,47
/H/	97(TYR)	OH	O	**/A/**	**7(MET)**	**N**	**N**	2,87
/L/	27(ARG)f	NE	N	**/A/**	**7(MET)**	**O**	**O**	2,95
/H/	97(TYR)	OH	O	/A/	7(MET)	CB	C	3,49
/L/	27(ARG)f	CD	C	/A/	7(MET)	O	O	3,5

*Representa la vinculación de hidrógeno entre dos cadenas laterales.
Las células sombreadas grises representan los contactos de la vinculación de hidrógeno confiables.
Los contactos en negrita son enlaces del hidrógeno formados entre las cadenas laterales y la columna vertebral de la cadena principal.

2. SP34v52 Fab

SP34v52 Fab se disolvió en 0,25 M NaCl, pH de MES 25 mM 5,5 a 10 mg/mL. La proyección de cristalización inicial se realizó con una matriz rala (PEGII, Qiagen) en un formato de difusión de vapor por gota sentada. Se encontró un hit de cristalización en una gota con el depósito que contiene 0,2 M $CaCl_2$; 0,1M HEPES pH 7,5 y 30% w/v PEG 4000. Se desarrollaron cristales optimizados de una mezcla de proteína µL 2 y 2 µL de la solución de depósito que contiene 20-23% w/v PEG 3350; 0,1M, pH HEPES 7,2, 0,1 M de $CaCl_2$. Se utilizó el método de difusión de vapor por gota colgante y la caída final de cristalización se incubó a 18 °C.

Se recolectaron los datos de difracción de SP34v52 Fab en línea de haz de Stanford Synchrotron Light Source 12-2, con un detector de PILATUS. Luego, se integraron las defracciones registradas con un programa XDS y se ampliaron con el uso del programa SCALA. La estructura se escalonó mediante el método de reemplazo molecular (MR) utilizando el programa Phaser. El modelo de búsqueda de MR es una sub-unidad Fab derivada de una estructura cristalina del complejo HGFA/Fab (código PDB: 2R0L). El péptido de complejo CD3ε se desarrolló en la estructura con base en un mapa Fo-Fc. Como consecuencia, la estructura se refinó con los programas REFMAC5 y PHENIX, implementando las funciones objetivo de probabilidad, el método de refinamiento de factor-B individual anisotrópico y el método de refinamiento TLS, para lograr la convergencia. Las estadísticas de datos y el refinamiento se muestran en la tabla 4.

TABLA 4. Recopilación de datos y estadísticas de refinamiento para SP34v52

Grupo de espacio	P622
Células unitarias	a=b=146.3Å, c=80.1Å α=90° β=90° γ=120°
Resolución	50,0 - 2,50 Å
Cantidad total de reflejos	18004 (170)[1]
Integridad (%)	100 (100)
Redundancia	19,3 (19,7)
I/σ	24,0 (3,6)
Rsym[2]	0,127 (0,896)
Rango de resolución	50 - 2,50 Å
Rcryst[3] / Rfree[4]	0,152/0,185
Atomos que no son de hidrógeno	3451
Moléculas de agua	123

Promedio B, General	29,59
Promedio B, Proteína	29,81
Promedio B, Agua	22,47
longitudes de enlace r.m.s.d.	0,007 Å
ángulos r.m.s.d.	1,163°

[1]Los valores entre paréntesis son para la cubierta con resolución más alta, que es 2,51 Å–2,50 Å.

[2]Rsym = $\Sigma|I_{hi} - I_h|/ \Sigma I_{hi,}$ donde I_{hi} es la intensidad aumentada de la observación relacionada con la simetría *i*th del reflejo *h e* I_h es el valor medio.

[3]Rcryst = $\Sigma_h|F_{o,h} - F_{c,h}| / \Sigma_h F_{o,h}$, donde $F_{o,h}$ y $F_{c,h}$ son las amplitudes de factor estructural observadas y calculadas para el reflejo *h*.

[4]El valor de R_{libre} se calcula para las reflexiones de 5% escogidas de forma aleatoria no incluidas en el refinamiento.

En las figuras 14I-14L, las estructuras de cristal de los Fabs hu38E4.v1 y SP34v52 se comparan en la misma orientación. Cuando el péptido CD3ε fue superpuesto en el Fab SP34v52 con la misma orientación que en el hu38E4.v1, se observaron choques evidentes del péptido con SP34v52 (Figura 14L). Los residuos HVR-H2, R50 y R52 de SP34v52, que no estaban presentes en hu38E4.v1 ni en hu40G5c, se hallaron importantes para la unión de CD3 por SP34v52 (Figura 14L). Estos datos demuestran que hu38E4.v1 y hu40G5c se unen con CD3 de una forma distinta que SP34v52.

La estructura de cristal de hu38E4.v1 en el complejo con el péptido N-terminal de CD3Εγ se encuentra ilustrada en las Figuras 14M y 14N. La Figura 14M proporciona una vista ampliada de las interacciones intermoleculares clave involucradas en el contacto del sexto residuo en $CD3_{\varepsilon\gamma}$. Con una vista alejada, la Figura 14N muestra un modelo de llenado de espacio del complejo del péptido Fab/CD3, donde el quinto residuo está apuntando por completo hacia afuera del sitio de interacción. El sexto residuo, como se muestra, está involucrado en las interacciones con Fab y los puntos dentro del sitio activo.

Ejemplo 2. Generación y selección de Anticuerpos biespecíficos dependientes de células T (TBD)

Un método para emplear el alto potencial citotóxico de las células T para erradicar las células tumorales ha sido el uso de los anticuerpos biespecíficos dependientes de linfocitos T (TBD). Se han informado respuestas clínicas alentadoras con moléculas como blinatumomab dirigidas a células B, el anticuerpo BiTE CD19/CD3-biespecífico. Sin embargo, la promesa clínica de muchas modalidades de anticuerpos biespecíficos informadas ha sido limitada por las responsabilidades, que incluyen farmacocinética desfavorable, toxicidad y/o problemas de producción. En consecuencia, inicialmente, hemos generado y caracterizado anticuerpos TBD anti-CD3 con combinaciones variadas de los grupos de antígeno antitumoral y anti-CD3 (p. ej., anti-CD20, anti-FcRH5, anti-HER2, anti-LYPD1, anti-LY6E, anti-LY6G6D, anti-PMEL17, anti-CD19, anti-CD22, anti-CD33, anti-CD79A, anti-CD79B, anti-EDAR, anti-GFRA1, anti-MRP4, anti-RET, anti-Steap1, anti-TenB2), producidos como anticuerpos de cuerpo entero en el formato de botón en el ojal (knob-into-hole). Inesperadamente, observamos que ciertas combinaciones (pares) particulares de grupos de antígeno antitumoral y anti-CD3 resultaron en TDB que presentan una actividad favorable en relación con los otros TDB.

Los anticuerpos TBD se produjeron como anticuerpos de longitud completa en el formato de botón en ojal (knob-into-hole) como IgG1 humana, como se describió previamente (Atwell y otros. *J. Mol. Biol.* 270: 26-35, 1997). La mitad de los anticuerpos se expresaron en *E. coli* o en células de ovarios de hámster chino (CHO), purificados por cromatografía de afinidad de proteínas A, y los pares adecuados de anticuerpos medios se hibridaron *in vitro* como se describió anteriormente (Spiess y otros. *Nat. Biotechnol.* 2013). Si la producción de anticuerpos TDB se llevó a cabo en células CHO, el anticuerpo puede incluir una mutación de glicosilación, por ejemplo, en el residuo N297 (p. ej., N297G), de manera tal que el anticuerpo TDB era una variante sin efector e incapaz de iniciar citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC). La Figura 15 muestra una visión general esquemática de la producción de TDB CD3/CD20.

Luego de la hibridación, los TBD CD3/CD20 se purificaron mediante cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) y se caracterizaron por filtración analítica en gel, espectrometría de masas y electroforesis en gel de poliacrilamida. Los anticuerpos

purificados funcionan como un pico único (>99% de la señal) en la filtración en gel con menos del 0,2% de agregados. No se detectaron homodímeros por medio de la espectometría. Los grupos anti-CD20 analizados en la generación de TDB CD3/CD20 incluyeron 2H7v16, 2H7v114, 2H7v511, y GA101. Los grupos anti-CD3 analizados en la generación de TDB CD3/CD20 incluyeron UCHT1v1, UCHT1v9, UCHT1vM1, 72H6, 13A3, 30A1, 41D9a, SP34v52, 40G5c, 38E4v1-38E4v9, 21B2, 125A1 y 21A9. Los TDB CD3/CD20 se analizaron en relación con la unión con CD3, así como con la actividad, según lo evaluado por los ensayos de destrucción de células B *in vitro* y ensayos de activación de células T.

A. Afinidad de unión

Las afinidades de unión para cada uno de los TDB CD3/CD20 se examinaron por medio de análisis FACS o Biacore, como se describió anteriormente para los anticuerpos anti-CD3. En resumen, para los ensayos de unión de Biacore, se inmobilizó CD3εγ humano en el chip sensor Biacore CM5 Serie S, utilizando el kit de acoplamiento de amino de Biacore y los TDB CD3/CD20 o variantes de Fab presentes estaban en el flujo. Para los ensayos de unión de FACS, se incubaron células Bjab (para antígenos de células B) o células Jurkat (para antígenos CD3) con varias concentraciones de anticuerpos TDB a 4 °C durante 30 minutos. Luego, las células fueron enjuagadas e incubadas con el segundo anticuerpo (anti-huIgG-PE; BD Bioscience) durante otros 15 minutos, antes de ser enjuagadas nuevamente y preparadas para el análisis de FACS. La figura 16 muestra los resultados de ensayos de unión de FACS *in vitro* de los TDB CD3/CD20. Los resultados demuestran que las combinaciones particulares del grupo de anticuerpo anti-CD3 y el grupo del antígeno antitumoral (p. ej., grupo anti-CD20) resultan en anticuerpos TDB con propiedades de unión más favorables. La figura 17 muestra las afinidades de unión monovalentes y bivalentes para estos TDB CD3/CD20 particulares. La combinación particular de 2H7v16 con los grupos anti-CD3 (p.ej., UCHT1v9), por ejemplo, resultó en un TDB CD3/CD20 que mostró una unión sorprendentemente fuerte con las células Bjab y Jurkat en comparación con otros TDB CD3/CD20 analizados con diferentes grupos anti-CD20. La afinidad de unión de otros TDB CD3/CD20 con un grupo anti-CD20 2H7v16 y varios grupos anti-CD3 también fueron analizados (observe las Figuras 18-24).

B. Ensayos in vitro de activación de células T y eliminación de células B.

Los TDB CD3/CD20 generados también se analizaron para determinar su capacidad para soportar la eliminación de células B y la activación del efecto citotóxico de las células T. En estos ensayos, se obtuvieron líneas de células tumorales B (Bjab) a partir de ATCC y se aislaron las PBMC de la sangre completa de los donantes sanos por medio de separación Ficoll. De se necesario, se separaban las células CD8+T y CD4+T con los kits Miltenyi, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células fueron cultivadas en RPMI1640 complementado con 10% FBS (Sigma-Aldrich) a 37 °C en un incubador de cultivos celulares humidificado estándar. Para los ensayos de eliminación de células Bjab,

20.000 células Bjab fueron incubadas con células efectoras ya sea como huPBMCs o células T purificadas, en relaciones indicadas por el ensayo, en presencia de varias concentraciones de anticuerpos TDB durante un período de tiempo indicado por el ensayo. Para los ensayos de eliminación de células B endógenas, se incubaron 200.000 huPBMCs con varias concentraciones de anticuerpos TDB durante la cantidad de horas indicada en el ensayo. Al final de cada ensayo, las células B vivas fueron separadas como células PI-CD19+ o PI-CD20+ B por medio de FACS, se obtuvo un recuento de células absoluto, con perlas FITC agregadas a la mezcla de la reacción como control de recuento interno. El porcentaje de eliminación de células se calculó con base en los controles no tratados con TDB. Las células T activadas fueron detectadas por la expresión de superficie de CD69 y CD25.

Las eficacias variadas de los anticuerpos TDB generados con biespecificidad para CD3 y una segunda molécula biológica (en esta instancia, CD20), enfatizan las contribuciones impredecibles y críticas de ambos grupos de anticuerpos en la generación de un TDB ejemplar de alta eficacia (consulte Figuras 25-49).

Ejemplo 3. Caracterización de TDB CD3/CD20 ejemplares (TDB CD20)

Caracterizamos en más detalle dos de los TDB CD3/CD20 (TDB CD20) ejemplares descritos anteriormente, que mostraron una alta eficacia en los ensayos *in vitro* de eliminación de células B y activación de células T. El grupo CD20 de cada anticuerpo TDB era el clon 2H7.v16 de anti-CD20 (observe la figura 50), mientras que el grupo CD3 era el clon UCHT1v9 (consulte, p-ej, Zhu, et ál *Int. J. Cancer*. <62> 62 319-324, 1995) o el clon 40G5c de macaco de reacción cruzada (consulte, p.ej., Figura 51), que comparte actividades comparables.

Materiales y métodos

A. Producción de anticuerpos

Los anticuerpos biespecíficos dependientes de células T (TDB) se produjeron como anticuerpos de longitud completa en el formato de botón en ojal (knob-into-hole) como IgG1 humana, como se describió previamente (Atwell y otros. *J. Mol. Biol.* 270: 26-35, 1997). La mitad de los anticuerpos se expresaron en *E. coli, y por lo tanto aglicosilados, purificados por cromatografía de afinidad de proteína A, y los pares adecuados de anticuerpos medios se hibridaron* in vitro como se describió anteriormente (Spiess et al. *Nat. Biotechnol.* 2013). Luego de la hibridación, los anticuerpos se purificaron mediante cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) y se caracterizaron por filtración analítica en gel, espectrometría de masas y electroforesis en gel de poliacrilamida. Los anticuerpos purificados funcionan como un único pico (>99% de la señal) en la filtración en gel sin agregados detectados (figura 52A) y no se detectaron homodímeros con la espectrometría de masas (figura 52B).

B. Ensayos in vitro de activación de células T y eliminación de células B.

Se obtienen líneas de células tumorales B a partir de ATCC y se aislaron las PBMC de la sangre completa de los donantes sanos por medio de separación Ficoll. Se separaban las células CD8+T y CD4+T con los kits Miltenyi, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células se cultivaban en RPMI1640 complementado con 10%FBS (Sigma-Aldrich). Para los ensayos de eliminación de células B, las células B vivas fueron separadas como células PI-CD19+ B por medio de FACS, se obtuvo un recuento de células absoluto con perlas FITC agregadas a la mezcla de la reacción como control de recuento interno. Las células T activadas fueron detectadas por la expresión de superficie de CD69 y CD25. La inducción de la granzima B intracelular fue detectada por medio de FACS. La concentración de perforina en el medio se detecta por medio de ELISA (eBioscience). Todos los anticuerpos se adquirieron en BD Bioscience.

C. Estudios de eficacia in vivo en modelos murinos

Los ratones SCID y NSG humanizados fueron adquiridos en Jackson Labs. Los ratones transgénicos con CD20 humano y los ratones transgénicos con CD3 humano fueron producidos como se describe anteriormente (Gong et ál. *J. Immunol.* 174. 817-826, 2005 y de la Here et ál. *J. Exp. Med.* 173: 7-17, 1991), y los ratónes trasgénicos dobles con CD20/CD3 humanos fueron producidos cruzando los dos ratones transgénicos simples. Los modelos de linfoma humano en ratones fueron generados inyectando 5 x 10^6células Bjab-luciferase solas o mezcladas con 10 x 10^6 PBMC de donante humano en HBSS de manera subcutánea en los flancos derechos de 40 ratones hembra. Se trató a los ratones por vía intravenosa con vehículo o TDB CD20 0,5 mg/kg una hora después de la inoculación y una semana después del tratamiento inicial. Los tumores se medían 1-2 veces por semana, y los pesos corporales dos veces por semana después de hasta 7 días a partir del tratamiento final. Si no se observaba pérdida de peso, se dejaba de medir el peso de cierto animal. Si la pérdida de peso era de más del 15% del peso total del cuerpo, los ratones afectados se pesaban a diario, y si excedía el 20%, se sacrificaban (o se dejaban a cargo del personal veterinario). Las observaciones clínicas se realizaron dos veces por semana a lo largo de todo el estudio, para monitorear la salud de los animales, y se sacrificaron todos los animales con tumores de un tamaño o condición que pudiera interferir con la salud o la actividad del mismo. De lo contrario, los animales se sacrificaban 6 meses después del tratamiento inicial o en caso de ulceración del tumor o si el volumen de este excedía 2500 mm^3.

Los modelos de ratones con leucemia linfocítica crónica (CLL) derivada de pacientes se generaron según la descripción anterior (Bagnara et ál. *Blood.* 117 5463-5472, 2011). En resumen, las 5 x 10^5 células T activadas fueron purificadas de PBMC de CLL e inyectadas de manera retro-orbital en los ratones NSG. Después del injerto de la célula T, 2 x 10^7 PBMC CLL se inyectaron de manera retro-orbital. Después de 14 días, la circulación de las células B y T trasplantadas fue confirmada por el análisis FACS. Los animales implantados exitosamente fueron tratados posteriormente, 3,5 semanas después, con

anticuerpos TDB administrados por vía intravenosa, inyectados en la vena de la cola. Los animales fueron sacrificados 6 o 14 días después del tratamiento. Se extrajo la sangre completa por punción del seno retro-orbital utilizando pipetas heparinizadas, y fue trasferida de inmediato a tubos heparinizados, mientras los animales estaban anestesiados, o por punción cardíaca terminal, con una jeringa heparinizada, después de la eutanasia con CO2. Después de la eutanasia con CO2, se recolectaron los bazos. Para todos los estudios, se realizaron observaciones clínicas dos veces por semana para supervisar la salud de los animales. Se medía el peso corporal de los animales al menos una vez por semana. Se aislaron las PBMC después de la lisis celular de glóbulos rojos, y se analizaron por medio de FACS para células B (muCD45+CD19+) y células T (muCD90.2+CD4+, o muCD90.2+CD8+). Todos los anticuerpos utilizados son adquiridos en BD Biosciences o eBiosciences.

D. Estudio PKPD en monos cynomolgus

Todos los estudios en monos cynomolgus se realizaron utilizando monos cynomolgus criados con esa finalidad, no tratados previamente, de origen chino. Para el estudio de PKPD de dosis única, se administró a 3 monos cynomolgus machos una dosis única en bolo lento IV de 1mg/kg de TDB CD20; para la repetición del estudio de dosis, se administró a 4 monos cynomolgus una dosis en bolo lento IV de 1mg/kg de TDB CD20 una vez por semana, por un total de 4 dosis. Se recolectó la sangre completa o los tejidos en los momentos seleccionados para el recuento de células B y células T por medio de FACS. Se recolectó el suero y se almacenó a -70 °C hasta que se analizó por medio de ELISA para determinar la cantidad de artículo de prueba en cada muestra de suero. Se usaron los perfiles de tiempo-concentración sérica de cada animal para estimar los parámetros farmacocinéticos (PK) utilizando el software WinNonlin (Pharsight; Mountain View, CA).

TDB CD20 de alta calidad producido como un IgG de cuerpo completo, humanizado, con propiedad PK de anticuerpo convencional

Para explorar las propiedades objetivo que pueden afectar la potencia de TDB dirigido a células B, que incluyen la identidad del antígeno, tamaño del dominio extracelular y la distancia de epítopo de la membrana, creamos más de 40 TDB dirigidos a epítopes en CD3Ɛ, CD19, CD20, CD22, CD79a y CD79b diferentes. Los resultados representativos se muestran en la Figura 56I. Hallamos que los TDB más potentes fueron aquellos dirigidos a los antígenos para el cáncer con dominios extracelulares pequeños (ECD) y epítopes cercanos a la membrana de la célula objetivo. Entre los mejores objetivos, se encontraron CD20, CD79a y CD79b, con potencias de alrededor de 10 ng/ml o 67 pM para la eliminación de células B de donante normal por parte de las células T autólogas.

TDB anti-CD20/CD3 (CD20-TDB) se describe aquí como una prueba del concepto de molécula, que exhibe la actividad farmacológica de estos TDB dirigidos a células B. Los TDB CD20 fueron producidos como IgG de cuerpo completo, totalmente humanizados,

con arquitectura de anticuerpo natural de bacterias, libres de homodímeros y agregados (Figura 52). La propiedad farmacocinética (PK) de TDB CD20 en ratas, una especie no vinculante, se asemeja a la de otros anticuerpos IgG humanos, con una vida media de cerca de 7 días (Figura 53).

La eliminación de células B con TDB CD20 depende de las células T a lo largo de la vía de granzima-perforina.

Para evaluar TDB CD20 como tratamiento potencial para trastornos proliferativos de células, tales como neoplasias de células CD20 + B, primero investigamos su mecanismo de acción como un anticuerpo biespecífico identificador de células T. A diferencia de la actividad de ADCC, que es el principal mecanismo de acción del tratamiento clásico del anticuerpo monoclonal, TDB CD20 no requiere la región Fc para su actividad. La porción F(ab')2 de TDB CD20 retuvo la misma potencia que el TDB CD20 IgG de cuerpo completo en la eliminación de células B (Figura 54A). TDB CD20 es un agonista condicional, que requiere expresión de objetivo, células T y anticuerpos para la actividad. La actividad de eliminación de células B de TDB CD20 depende de las células T, dado que no se detectó eliminación de células B con PBMC agotadas de células CD3+ T (Figura 54B). Se requiere la expresión del objetivo para la activación de células T, dado que la falta de expresión de CD20 resulta en la ausencia de células T activadas (Figura 54). TDB CD20 es capaz de activar a las células CD4+ y CD8+T, como se mide por la inducción de CD69 y CD25 en las células T (Figura 54D). Se puede lograr una eliminación de células B comparable con células T como efectores, mientras que las células CD8+T parecen más potentes en la eliminación de células BJAB, dado que las células CD8+T resultaron en un mayor rango de eliminación celular que la misma cantidad de células CD4+T (Figura 54C). Sin embargo, la sobreregulación de granzima es más frecuente dentro de las células CD8+T (Figura 54E), así como se detectaron niveles más altos de liberación de perforina y granzimas A y B (no mostradas) asociada con las células CD8+T en el medio, por medio de ELISA (Figura 54F). Las células T activadas son capaces de proliferación (Figura 55). El recuento general de células T, sin embargo, no aumentó de manera significativa después de 24 horas en presencia de TDB CD20 y de células B sin suplemento de citoquinas *in vitro*, probablemente debido a las condiciones del cultivo. De hecho, se observó una expansión robusta de células B *in vivo* en los estudios de eficacia con modelos murinos y en monos cynomolgus (Figuras 58A y 67C).

Potencia de TDB CD20 para la eliminación de las células B de leucemia/linfoma y de las células B autólogas *in vitro*

También se analizó la potencia de TDB CD20 para la eliminación de células B con más de una docena de líneas de células B de leucemia/linfoma *in vitro*. Para evaluar la potencia de CD20-TDB, se seleccionaron 8 líneas que representaran las células con un amplio rango de nivel de expresión de CD20 (Figura 56B). Las curvas de dosis-respuesta de eliminación de células B se muestran con las 8 líneas celulares, con PBMC aisladas, de

donante sano, como células efectoras (figura 56A). Significativamente, CD20-TDB no ha presentado actividad contra las células SU-DHL1, desprovistas de expresión de CD20. La potencia de CD20-TDB se correlacionó con los varios niveles de superficie CD20 detectados mediante la citometría de flujo (56A).. No obstante, TDB CD20 resulta potente en la eliminación de las 8 líneas, de forma dependiente de dosis, con EC50 que oscila entre 0,38 y 11 ng/ml para el ensayo de 24 horas. El alcance de eliminación celular varía entre 60% y 90% con hasta 1000 ng/ml de TDB en un ensayo de 24 horas (Figura 56C). En general, la eliminación completa de células B se logra con una mayor concentración del anticuerpo o un tiempo de ensayo prolongado. Las células SU-DHL-1 se incluyen en el ensayo de eliminación como control negativo de CD20, donde no se observa eliminación celular, lo que demuestra la necesidad de la expresión de objetivo para la actividad de TDB CD20. La actividad de TDB CD20 parece necesitar un nivel muy bajo de expresión de objetivo, como las células Nalm-6 y SC-1 que se muestran aquí tienen muy baja expresión de superficie de CD20 (Figura 56B). La afinidad de unión monovalente de TDB CD20 para CD20 es más débil que la afinidad de unión bivalente del anti-CD20 parental, con un K_D de 54 nM, determinado por Scatchard. Tomados en conjunto, el valor KD y la potencia de eliminación de células B de TDB CD20, la ocupación de receptores necesaria para la actividad de TDB CD20 es solamente menor que 0,1%. Los TDB generados para atacar diferentes antígenos de células B, también son efectivos en la mediación de la eliminación de células B, como se muestra en la figura 56D, donde los TDB dirigidos a 5 antígenos de células B diferentes, entra ellos, un TDB CD20 (TDB A: 2H7v16/UCHT1v9), eliminaron el 75% a 90% de las células B. El TDB CD20 también puede mediar en la eliminación de líneas de linfoma B adicionales con expresión del antígeno de superficie CD20 variable (figura 56E).

El TDB CD20 también resulta muy potente en la eliminación de células B autógenas, comprobado con PBMC humanas aisladas de la sangre periférica, de donantes sanos (figura 56F). En la figura 56F se muestran las curvas de dosis-respuesta de eliminación para 8 donantes aleatorios, así como un resumen de EC50 y el alcance de eliminación de células B (figura 56G) con 1000 ng/ml de anticuerpo en un ensayo de 24 horas, en 30 donantes. De las 30 muestras analizadas, del 57% al 96% de las células B fueron eliminadas con hasta 1000 ng/ml de anticuerpo en el plazo de 24 horas, con EC50 oscilando entre 0,43 y 135 ng/ml, con un valor promedio de menos de 3 ng/ml. El grado de eliminación de células B en el plazo de 24 horas por TDB CD20 es altamente comparable, o aún mayor, que la eliminación de células B por un scFv anti-CD3/anti-CD19 (Figura 56H).

El TDB CD20 resulta potente en provocar el agotamiento de células B *in vivo* en los modelos murinos.

Dado que nuestro TDB CD20 analizado no reconoce los antígenos murinos CD20 y CD3, utilizamos los ratones transgénicos con CD20 humano y CD3 humano (descritos anteriormente) para producir ratones transgénicos dobles con CD3/CD20 humanos para

estudios de eficacia *in vivo* subsiguientes. Como se muestra en la Figura 57A, los ratones transgénicos dobles con CD3/CD20 humanos expresan huCD3$_\varepsilon$ en la superficie de las células CD4+ y CD8+ T, además de huCD20 en la superficie de las células CD19+ B, en niveles detectables, en comparación con las células B y T derivadas humanas. Con ratones transgénicos con CD20 humano, solamente rituximab es capaz provocar el agotamiento de las células B, dado que TDB CD20 no puede captar células T murinas sin expresión de CD3 humano (figura 57B). Mientras que con los ratones transgénicos dobles con CD3/CD20 humanos, TDB CD20 es capaz de captar células T murinas que expresan huCD3 y además resulta potente para provocar el agotamiento de células B murinas que expresan huCD20 (figura 57C). El TDB CD20 parece ser más potente para provocar el agotamiento de las células B *in vivo*, dado que se detectan menos células B en los bazos de ratón 7 días después de una dosis única IV de TDB CD20 de 0,5 mg/kg que después de la administración de una dosis única de rituximab de 10 mg/kg. Aquí se usó como un control del isotipo un TDB HER2, que tiene el mismo grupo de CD3 mientras que con el otro grupo se une a HER2, y no mostró actividad alguna en la disminución celular.

Para explorar la menor dosis eficaz con la cual el TDB CD20 puede agotar las células B en ratones transgénicos dobles con CD3/CD20 de origen humano, los ratones fueron tratados con una dosis única de TDB CD20 que comenzó en 0,5 mg/kg y terminó en 0,00005 mg/kg. Luego, se monitoreó el recuento de células B en la sangre en el D1 (24 horas después de la dosis), el D8 y el D15. Se observó una disminución en el recuento de células B en el D1, y el agotamiento de las células B continuó hasta el D15 luego del tratamiento con TDB CD20 (Figura 58A). De manera coherente con esta observación en el recuento de células B en la sangre, se logró el agotamiento casi completo de las células B en el bazo de ratones en el D7 tras una dosis única de 0,5 mg/kg, mientras que una dosis más baja de 0,05 mg/kg provocó el agotamiento parcial de las células B en el bazo y un nivel aproximado de dosis de ED50 (Figura 58B). Un estudio de evolución temporal realizado con los ratones transgénicos dobles reveló que el agotamiento de las células B es casi completo en el bazo tan solo 3 días después del tratamiento de dosis única de 0,5 mg/kg, sin signos de recuperación significativa de las células B hasta el D14 (Figura 58A). Como se ve en la Figura 58C, el TDB CD20 media el agotamiento de las células B en la periferia de los huCD20/huCD3 transgénicos dobles, lo cual se detecta en la sangre tan solo dos horas después del tratamiento y se mantiene durante hasta siete días después del tratamiento. Además, las células T CD8+ y CD4+ activadas son detectables en la sangre en el plazo de dos horas desde la administración del TDB CD20 y disminuyen dos días después del tratamiento (Figura 58D).

Además, el TDB CD20 agotó las células B de la zona marginal (MZB, por sus siglas en inglés) (Figura 59A y Figura 59B) tan eficientemente como las células B foliculares (FOB, por sus siglas en inglés) (Figura 59A y Figura 59C) en el bazo de ratones, luego de una sola dosis IV de 0,5 mg/kg. Observamos que las células B del bazo disminuyeron ~ 50% con respecto al valor basal hasta el día 1 (24 horas después de la dosis) y continuaron

disminuyendo hasta alcanzar el punto más bajo en el día 3, que se mantuvo durante todo el estudio. Aparentemente, esto difiere de un informe previo con rituximab, donde se piensa que el microambiente cumple una función en la eficacia de rituximab, lo cual sugiere un modo de acción para el TDB CD20 *in vivo* diferente al de rituximab. La activación de las células T murinas suele observarse a los 30 minutos de la administración del tratamiento de TDB CD20 en la sangre, y en el plazo de las primeras 24 horas en el bazo en la mayoría de los casos (Figuras 59D y 59E). Luego de la activación de las células T, se observó un incremento del recuento de las células T en los D2 a D3 aproximadamente (Figura 59D y 59E), como resultado de la proliferación celular. Para el día 2, la mayoría de las células T ya no eran positivas para CD69, aunque los niveles de células CD69+CD8+ siguieron oscilando entre el 10% y el 30% durante el resto del estudio de dos semanas. No obstante, posiblemente debido a la muerte celular inducida por la activación, los recuentos de las células T tienden a disminuir tras la fase de expansión. El recuento de células T finalmente se recuperará luego del tratamiento con TDB, lo cual sugiere que el tratamiento con TDB CD20 no tiene un efecto inhibitorio de la regeneración de las células T murinas.

También se usaron ratones NSG humanizados para continuar con la validación de la potencia del TDB CD20 para el agotamiento de las células B en modelos murinos y en el marco de una dosis repetida. Los ratones reales inscriptos en el estudio que se muestran en las Figuras 60A-60D tenían 35-80% de células CD45+ humanas en la sangre periférica, y los rangos de las células CD4+, CD8+ y CD20+ fueron 12-25, 2,1-8,7 y 32-60% respectivamente (porcentaje informado como fuera de una ventana viable de leucocitos). En la Figura 60E, se muestran ejemplos representativos de este valor inicial. Los niveles de los antígenos objetivo CD3 y CD20 de estos ratones se compararon con los de donantes humanos normales y no se halló que fueran significativamente diferentes (Figura 60F). Los ratones NSG humanizados que se muestran en la Figura 59 fueron tratados con 3 dosis semanales de TDB CD20 de 0,5 mg/kg. Las células B se agotaron en la sangre en el D7, y no se detectó casi ninguna célula B en el D21 (Figura 60A). También se observó un agotamiento sólido de las células B en el bazo de los ratones tratados con TDB en el D21 (Figura 60B). Además, el tratamiento de los ratones NSG humanizados con TDB CD20 estimuló la proliferación de las células T y condujo al agotamiento de las células B, como se muestra en la Figura 60C. El recuento de las células T CD8+ se incrementó hasta 10 veces en la sangre en el D7 y retornó al valor basal o a un valor inferior en el D14 y en el D21 (Figura 60D). Se observó una tendencia similar en las células T CD4+.

CD20 TDB es potente para eliminar las células B de la CLL *in vitro* e *in vivo*

También realizamos pruebas para determinar la potencia del TDB CD20 para eliminar las células B de la leucemia con células T autólogas de pacientes con CLL, donde la carga tumoral B suele ser alta mientras que el recuento de células T es bajo y la función de las células T podría estar potencialmente deprimida (Riches et al. *Semin. Cancer Biol.* 20(6):

431-438, 2010). Las PBMC aisladas de la sangre periférica de nueve pacientes con CLL fueron incubadas con una sola dosis elevada de 1000 ng/mL de TDB CD20 durante hasta 48 horas. Como se muestra en la Figura 61A, TDB CD20 es potente en la eliminación de las células B de la CLL con células T autólogas. Para las 2 muestras que se ven, la carga tumoral de la leucemia de células B es del 70% con el 8,4% de las células T CD8+ en las PBMC para la muestra de paciente n.º 1, y del 80% con el 4,4% de las células T CD8+ para la muestra de paciente n.º 2. TDB CD20 aparentemente puede lograr una eliminación eficiente de células B con relaciones efector/objetivo muy bajas (1:8 y 1:18 con las 2 muestras que se ven aquí). La eliminación de las células B de la CLL con células T autólogas que produce TDB CD20 tiene una alta correlación con el recuento de células T CD8+ (Figura 61B). Descubrimos que el contenido de las células T variaba de manera significativa (entre el 0,4% y el 8% de las células mononucleares), y cabe destacar que observamos que el alcance de la citólisis de las células B en comparación con los valores previos al tratamiento se correlacionaba en gran medida con el contenido de las células T. Al suplementar con las células T CD8+ purificadas a las PBMC de la CLL, donde hay muy pocas células T análogas disponibles, las células B de la leucemia fueron eliminadas eficientemente por TDB CD20 de una forma dependiente de las células T (Figura 61C).

TDB CD20 también es potente para provocar el agotamiento de las células de leucemia CLL injertadas en ratones (Figura 62A). En resumen, se injertaron células de leucemia de pacientes a los ratones NSG luego de injertar células T autólogas activas obtenidas de los pacientes y el tratamiento se inició luego de confirmar que el injerto de leucemia se había establecido. La tinción de IHC de ejemplos representativos de bazos de ratones mostró el injerto exitoso de las células B de leucemia y de células T autólogas de pacientes con CLL en ratones NSG. Luego de una dosis única de 0,1 o 0,5 mg/kg del tratamiento con TDB CD20, se pudieron detectar pocas células B. El agotamiento de las células B también se observó con el tratamiento de rituximab, mientras que no se detectó agotamiento alguno de las células B con el TDB HER2 como control del isotipo. (Figura 62B).

En el contexto de la progresión del tumor, el tratamiento con TDB CD20 es efectivo para prevenir el crecimiento de tumores tipo linfoma de células B en presencia de un donante humano de PBMC. Los ratones SCID (inmunodeficiencia severa combinada) con trasplantes de células Bjab humanas desarrollaron tumores detectables cuando fueron tratados con el vehículo o con TDB CD20 solo para el día 12 luego de la inoculación. Además, el trasplante solo de las PBMC demoró la excrecencia de tumores, aunque estos ratones desarrollaron tumores detectables para el día 25 luego de la inoculación. Por lo tanto, TDB CD20 también es efectivo para prevenir el crecimiento de tumores *in vivo* en presencia de células efectoras PBMC (Figura 63).

La potencia de TDB CD20 requiere un muy bajo nivel de expresión de CD20.

Además del requisito diferente para la región de anticuerpo Fc para la actividad de TDB CD20 comparada con un anti-CD20 convencional, y de la posible dependencia del

microambiente del tumor, TDB CD20 también parece requerir un menor nivel de antígeno para la eliminación eficiente de las células B. Para las células Bjab, que tienen un alto nivel de expresión de CD20 (Figura 64A), se logró una eliminación de células comparable con rituximab y TDB CD20 (Figura 64B). Sin embargo, las células Nalm-6, SC-1 y OCI-Ly19, que tienen un nivel de expresión de CD20 mucho más reducido (Figura 64A) solamente fueron eliminadas con TDB CD20 mientras que no se detectó eliminación de estas células con rituximab (Figura 64C). El número estimado de copias de CD20 para estas líneas celulares bajas de CD20 es menor que 500, en base a los datos de scatchard y de la unión de FACS en comparación con las células BJAB (no se muestran los datos). Además, la afinidad de unión monovalente de TDB CD20 para CD20 es ~50-100 nM, significativamente menor que la afinidad de 1-5 nM de rituximab (ambas medidas con scatchard). En conjunto, la potencia de CD20-TDB es coherente con la noción de que la activación de TCR solamente requiere una ocupación de receptores baja de 10-100 moléculas (Purbhoo, M.A., et al. *Nat Immunol* 5:524-530, 2004; Irvine, D.J.,et al. *Nature* 419:845-849, 2002; Sykulev, Y., et al. *Immunity* 4:565-571, 1996).

TDB CD20 es activo en presencia de rituximab y esteroides

Como rituximab y su combinación con la quimioterapia se utilizan ampliamente para tratar neoplasias de células B en la práctica clínica, es importante explorar cómo se puede utilizar TDB CD20 en este contexto, dado que tanto TDB CD20 como rituximab se enfocan en el mismo antígeno. Aprovechamos al rituximab-DANA, una variante no efectora de rituximab (rituximab con sustituciones de los residuos 265 y 297 a la alanina (mutaciones DANA descritas en las patentes de EE. UU. n.º 7,332,581 y 8,219,149)), la cual solamente se une a CD20 sin actividad de eliminación de células B, según las pruebas realizadas en ratones transgénicos dobles con CD20/CD3 humanos (Figura 64D). El tratamiento previo de células B objetivo de donantes normales con esta molécula inerte de rituximab que compite con la unión de TDB CD20 tuvo un efecto extraordinariamente mínimo en la reducción de la actividad de TDB CD20. En concentraciones de hasta 250 µg/ml rituximab-DANA (5000 veces en exceso sobre el nivel del dosis EC50 de 42 ng/ml), observamos solamente pequeños cambios en las curvas de respuesta a la dosis *in vitro* (un cambio menor a 7 veces en la EC50, 42 en comparación con 320 ng/ml). Cabe destacar que TDB CD20 sigue siendo activo en este marco. Aunque la EC50 para TDB CD20 se incrementó hasta ~7 veces con la concentración más elevada de rituximab-DANA, el grado de eliminación de células B no cambió significativamente (Figura 65A). Esto es coherente con nuestros hallazgos previos, según los cuales, para la potencia de TDB CD20, se requiere un nivel muy bajo de expresión del antígeno, o una ocupación muy baja de receptores. Las observaciones *in vitro* se recapitularon *in vivo* en ratones transgénicos duales CD3/CD20 que fueron tratados previamente con 2 o 10 mg/kg de la proteína rituximab-DANA y posteriormente recibieron TDB CD20. Aquí, mostramos *in vivo* que TDB CD20 sigue provocando el agotamiento de células B en ratones tratados previamente con rituximab-DANA (Figura

66). Estos resultados indican una gran versatilidad en las combinaciones prospectivas de tratamientos para neoplasias de células B.

TDB CD20 es un anticuerpo que recluta células T, y su potencia depende de la activación de las células T. También se realizaron exploraciones para ver si el tratamiento previo con esteroides, que potencialmente podría tener un impacto en la respuesta inmune de las células T, afectaría la actividad de TDB CD20. *In vitro,* TDB CD20 seguía eliminando las células B en presencia de una alta concentración de dexametasona (Figura 65B).

Validación preclínica de TDB CD20 como tratamiento potencial para neoplasias de células B CD20+ en monos cynomolgus

También se realizó un estudio piloto PKPD para TDB CD20 en monos cynomolgus. En un estudio de dosis única, en el cual 3 animales fueron tratados una vez de forma intravenosa con 1mg/kg de TDB CD20, se observó el agotamiento completo de las células B en la sangre (Figura 67A), así como también en el bazo y en los nódulos linfáticos (Figuras 67B y 67C), 7 días después del tratamiento con el anticuerpo. Los controles históricos del vehículo se muestran como la media y la desviación estándar de 4 animales tratados con vehículo (Figura 67D). No se observó una pérdida de células aparente, ya que tanto las células T CD8+ como las células T CD4+ tenían niveles comparables o más elevados que los de los controles, cuando se calcularon como % de linfocitos. Se detectó la activación de las células T en la sangre 4 horas después de la administración de la dosis. No se detectó pérdida de células T, y se detectó un recuento de células T CD8+ aparentemente más elevado en la sangre 7 días después del tratamiento (Figura 67A).

El efecto a largo plazo del tratamiento con TDB CD20 en células inmunes también se examinó en un estudio de dosis repetida de 4 semanas seguido de un período de recuperación de 8 semanas. En la sangre de 4 animales tratados con una dosis semanal de 1mg/kg, los recuentos delas células B y T, así como también la concentración sérica de TDB CD20, se midieron y se graficaron para cada animal individual durante 77 días (Figura 68A). En los 4 animales, las células B no se detectaron en la sangre poco tiempo después del tratamiento y no regresaron mientras la concentración sérica de TDB CD20 permaneció por encima de 100 ng/ml (animal 4502 en comparación con los animales 4001, 4002 y 4503). Los recuentos de células T CD8+, así como también los de las células T CD4+ en menor medida, se incrementaron significativamente luego de la primera dosis y retornaron gradualmente al 25-150% de los valores basales. Si se consideran juntas, TDB CD20 es altamente activo en producir el agotamiento de las células B, sin comprometer a las células T.

La propiedad PK de TDB CD20 también se resumió en la Figura 68B, con las mediciones de la concentración sérica de TDB CD20 de ambos estudios. Como se mostró para el estudio de dosis repetidas, TDB CD20 mantuvo una buena exposición durante todo el estudio, con una eliminación de aproximadamente 17 ml/día/kg durante la primera dosis (D0-D7). La eliminación mediada por el objetivo parece ser más elevada durante la primera dosis (D0-D7), ya que el valor de eliminación disminuyó hasta

aproximadamente 6 ml/día/kg durante la cuarta dosis (D21-28).

Combinación de TDB CD20 con un antagonista de PD-L1 es un modelo tumoral singeneico

También se examinó la eficacia in vivo de un TDB CD20 en combinación con un antagonista de PD-L1 (un anticuerpo anti-PD-L1 isotipo IgG2a murino, 25A1, con mutaciones DANA) en un modelo tumoral singeneico. En este estudio, se utilizaron células de linfoma B A20-huCD20 de ratones que expresan el CD20 humano y un PD-L1 de ratón sobre su superficie celular para generar un modelo tumoral singeneico (consulte, p.ej., la Figura 69A). El TDB CD20 utilizado fue un isotipo IgG2a murino 2H7v16/2C11 TDB producido en formato "botón en ojal" (K&H, consulte, p.ej., Atwell et al., *J Mol Biol.*, 270:26-35, 1997), donde el grupo "botón" es anti-CD20 2H7v16 y el grupo "ojal" es anti-CD3 2C11 (Leo et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 84:1374-8, 1987). El antagonista de PD-L1 utilizado fue un isotipo IgG2a murino anti-PD-L1 con mutaciones Fc DANA (sustitución de los residuos 265 y 297 a la alanina; consulte, p.ej., las patentes de EE. UU. n.º 7,332,581 y 8,219,149).

En el Día -7, 65 ratones Balb/C fueron inoculados simultáneamente en el área torácica unilateral derecha con 2,5 millones de células A20pRK-CD20-GFP en HBSS en un volumen de 100 µl (que no debía exceder los 200 µl). Se permitió que los ratones desarrollaran tumores. Luego, los ratones fueron pesados y medidos de 1 a 2 veces por semana hasta que los tumores alcanzaron un volumen medio tumoral de aproximadamente 100 a 200 mm^3 (aproximadamente 7 días después de la inoculación). Los animales luego fueron divididos en los siguientes grupos de tratamiento: Grupo 1: 2,5 millones de A20/CD20, Vehículo, qwx3, IV, n=9; Grupo 2: 2,5 millones de A20/CD20, anti-CD20xCD3 K&H TDB (2H7v16-2C11 IgG2 murino), 0,5 mg/kg, qwx3, IV, n=9; Grupo 3: 2,5 millones de A20/CD20, aPDL1 (25A1, mIgG2a DANA), 10 mg/kg, tiwx3, IP, n=9; y Grupo 4: 2,5 millones de A20/CD20, aPDL1 (25A1, mIgG2a DANA), 10 mg/kg, tiwx3, IP + anti-CD20xCD3 K&H TDB (2H7-2C11 IgG2 murino), 0,5 mg/kg, qwx3, IV, n=9. A los ratones que no se reunieron en uno de los grupos de tratamientos mencionados debido a tumores disimilares, se les practicó la eutanasia. El tratamiento comenzó el Día 0, y todas las dosis de anticuerpos se administraron por vía intravenosa en un volumen de 100 ml como se describió más anteriormente.

Los tumores se midieron de 1 a 2 veces por semana. El peso corporal de los animales se midió dos veces por semanas hasta 7 días después del tratamiento final. Si no se observaba pérdida de peso, se dejaba de medir el peso. Si se observaba que la pérdida de peso era >15%, los ratones afectados se pesaban diariamente y se les practicaba la eutanasia si la pérdida de peso era mayor o igual al 20%. Durante todo el estudio, las observaciones clínicas se realizaron dos veces por semana para monitorear la salud de los animales, y se le practicó la eutanasia a todo animal que tuviera un tumor de un tamaño o condición que pudiera interferir con su salud o actividad.

Como se muestra en la Figura 69B, el tratamiento combinado de TDB CD20 con el

anticuerpo anti-PD-L1 (Grupo 4) exhibió un efecto sinérgico inesperado en la inhibición del crecimiento tumoral cuando se comparó con el tratamiento con TDB CD20, anticuerpo anti-PD-L1 o vehículo solos.

Combinación de TDB CD20 con un antagonista de PD-1 es un modelo tumoral singeneico

Adicionalmente, se probó también la eficacia *in vivo* de un CD20 TDB en combinación con un antagonista de PD-1 (un anticuerpo anti-PD1 con isotipo IgG2 murino, 8F11, con mutaciones DANA) en el modelo sinérgico de ratón B con linfoma A20/huCD20. En este estudio, el CD20 TDB usado fue un isotipo isotype 2H7v16/2C11 TDB IgG2a murino y el antagonista PD-1 usado fue un anticuerpo anti-PD-1 con isotipo IgG2 con mutaciones DANA Fc.

Se transfectaron células B de los ratones A20 para expresar CD20 y GFP humano y posteriormente se clasificó una única célula para determinar la selección clonal y la expansión para la implementación. Ratones Balb/c hembra (Charles River; Hollister, CA) de 8-10 semanas fueron inoculados subcuténeamente en la región torácica unilateral derecha con 2,5 millones de células A20.hCD20-GFPCuando los tumores alcanzaron un volumen medio de 100-200 mm^3, los ratones se seleccionaron y colocaron aleatoriamente en los siguientes cuatro grupos de tratamiento n=9 ratones/grupo) y el tratamiento con anticuerpo comenzó al día siguiente 1: Grupo 1 2,5 millones A20/CD20, vehículo, qwx3, IV); Grupo 2 (2,5 millones A20/CD20, anti-CD20xCD3 K&H TDB (2H7v16-2C11 IgG2 murino), 0,5 mg/kg, qwx3, IV); Grupo 3 (2,5 millones A20/CD20, anti-PD1 (8F11, mIgG2a DANA), 10 mg/kg, tiwx3, IP) y Grupo 4 (2,5 millones A20/CD20, anti-PD1 (8F11, mIgG2a DANA), 10 mg/kg, tiwx3, IP + anti-CD20xCD3 K&H TDB (2H7v16-2C11 IgG2 murino), 0,5 mg/kg, qwx3, IV).

Los ratones se trataron con vehículo o CD20 TDB a 0,5mg/kg semanalmente IV durante 3 semanas, y/o anticuerpo anti-PD-1 a 10mg/kg IV para la primera dosis, seguido de dosificación IP 3 veces por semana durante 3 semanas. (N=9 ratones/grupo)

Como se muestra en las Figuras 108A y 108B, el tratamiento combinado de CD20 TDB con anticuerpo anti-PD-1 (Grupo 4) mostró un efecto inesperado y sinergístico al mostrar el crecimiento del tumor al compararlo con el tratamiento con el anticuerpo CD20 TDB, anti-PD-1 o con vehículo solamente.

Ejemplo 4. Generación y caracterización de los TDB CD3/FcRH5 ejemplares. (TDB FcRH5)

Además, exploramos la capacidad de anticuerpos de TDB para reclutar las actividades citotóxicas de las células T de extirpación de las células tumorales mediante el reconocimiento de un antígeno de superficie celular diferente, FcRH5. Para ello, generamos y caracterizamos anticuerpos anti CD3 que tienen un brazo anti-CD3 y un brazo anti-FcRH5 (TDB de FcRH5). Como se describió anteriormente, los TBD FcRH5 se

produjeron como anticuerpos de longitud completa en el formato de botón en ojal (knob-into-hole) como IgG1 humana, como se describió previamente (Atwell et al. *J. Mol. Biol.* 270: 26-35, 1997). La mitad de los anticuerpos se expresaron en *E. coli*, purificados por cromatografía de afinidad de proteínas A, y los pares adecuados de anticuerpos medios se hibridaron *in vitro* como se describió anteriormente (Spiess et al. *Nat. Biotechnol.* 2013). Luego de la hibridación, los TBD FcRH5 se purificaron mediante cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC, por sus siglas en inglés) y se caracterizaron por filtración analítica en gel, espectrometría de masas y electroforesis en gel de poliacrilamida, como se describió anteriormente. Un grupo anti-FcRH5 utilizado en la generación de los TDB FcRH5 fue el del anticuerpo anti-FcRH5 1G7, que comprende: (a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos con n.° de ID de SEC.: 268 y (b) un dominio de VL que comprende una secuencia de aminoácidos con n.º de ID de SEC.: 269. Los grupos anti-CD3 examinados en la generación de los TDB FcRH5 incluían a UCHT1v9, 40G5c, 38E4v1 y 38E4v1.

Los TDB FcRH5 específicos se examinaron para detectar la unión de células T CD8+ (unión CD3), así como también la actividad, según lo evaluado por ensayos de citotoxicidad *in vitro* y ensayos de activación de células T.

A. Afinidad de unión

Las afinidades de unión para cada uno de los TDB FcRH5 se examinaron mediante análisis FACS, como se describió anteriormente para los TDB CD20. Brevemente, para ensayos de unión FACS, se incubaron células T CD8+ con distintas concentraciones de anticuerpos de TDB FcRH5 a 4 °C durante 30 minutos, luego las células se lavaron e incubaron con el segundo anticuerpo (anti-huIgG-PE, BD Bioscience) durante otros 15 minutos, antes de que las células fueran lavadas nuevamente y estuvieran listas para el análisis FACS. La figura 70 muestra los resultados de ensayos de unión de FACS *in vitro* de los TDB FcRH5. Los resultados demuestran que la combinación particular del grupo del anticuerpo anti-CD3, 38E4v1, emparejado con el grupo del anti-FcRH5, 1G7, da como resultado un anticuerpo FcRH5 con una afinidad de unión mayor con las células efectoras.

B. Ensayos in vitro de activación de células T y eliminación de células diana MOLP-2

Los TDB FcRH5 también se examinaron para determinar su capacidad para respaldar la eliminación de las células diana MOLP-2 que expresan FcRH5 y la activación del efecto citotóxico de las células T. *La citotoxicidad* in vitro se monitoreó mediante citometría de flujo. Las células diana se marcaron con CFSE de acuerdo con el protocolo del fabricante (Invitrogen, n.º C34554). Las células diana marcadas con el éster de succinimidilo de carboxifluorescenía (CFSE) y las células T CD8+ purificadas de PBMC humanas se mezclaron en una relación 3:1, con o sin TDB durante 48 horas. Las células se resuspendieron en un volumen igual de PBS + 2% FBS + 1 mM EDTA + yoduro de propidio (PI). El análisis de citometría de flujo se realizó en un FACSCalibur en formato

de automatización. El número de células diana vivas se contó mediante la apertura o cierre de las células negativas CFSE+/PI. El porcentaje de citotoxicidad se calculó de la siguiente manera: % de citotoxicidad (número de células diana vivas sin TDB, número de células diana vivas con TDB) / (número de células diana vivas sin TDB) x 100. Como se representa en las Figuras 71A y 71B, los TDB FcRH5 con UCHT1v9 o 38E4v1 para su grupo anti-CD3 mostraron una eliminación de células diana MOLP-2 sólida *in vitro* en comparación con el TDB FcRH5 que tiene 40G5c como su grupo anti-CD3.

Al realizar las pruebas para los ensayos de activación de las células T, las Figuras 72A a 72D, muestran que los TDB FcRH5 con UCHT1v9 o 38E4v1 para su grupo anti-CD3 eran capaces de inducir fuertemente la actividad de las células T *in vitro*, en comparación con el TDB FcRH5 que tiene 40G5c como su brazo anti-CD3. En estos ensayos, las células diana y las células T CD8+ purificadas se mezclaron en presencia o ausencia de TDB y se analizó la activación de las células T mediante la citometría de flujo. Al final de la incubación, las células se tiñeron con CD8-FITC (BD Bioscience, 555634) CD69-PE (BD Bioscience, 555531) y CD107a-Alexa-Fluor647 (eBioscience, 51-1079). Opcionalmente, después de que la superficie se tiñó con CD8-FITC y CD69-PE, las células se fijaron y se permeabilizaron con una solución de Cytofix/Cytoperm (BD Bioscience, 554722) y se tiñeron de forma intracelular con anti-granzima B-Alexa-Fluor647 (BD Bioscience, 560212). La activación de las células T se evaluó a través del porcentaje de células CD8+CD69+, CD8+CD107a+ y CD8+CD69+GranzymaB+.

Ejemplo 5. Generación y caracterización de los TDB CD3/HER2 ejemplares. (TDB HER2)

Además, exploramos la capacidad de anticuerpos de TDB para reclutar las actividades citotóxicas de las células T de extirpación de las células tumorales mediante el reconocimiento de un antígeno de superficie celular diferente, HER2. Para ello, generamos y caracterizamos anticuerpos anti CD3 que tienen un brazo anti-CD3 y un brazo anti-HER2 (TDB HER2). Como se describió anteriormente, los TDB HER2 se produjeron como anticuerpos de longitud completa en el formato de botón en ojal como IgG1 humana, como se describió previamente (Atwell et al. *J. Mol. Biol.* 270: 26-35, 1997). La mitad de los anticuerpos se expresaron en *E. coli* o en células de ovarios de hámster chino (CHO), purificados por cromatografía de afinidad de proteínas A, y los pares adecuados de anticuerpos medios se hibridaron *in vitro* como se describió anteriormente (Spiess et al. *Nat. Biotechnol.* 2013). Si la producción de anticuerpos TDB se llevó a cabo en células CHO, el anticuerpo incluyó una mutación de glicosilación, por ejemplo, en el residuo N297 (p. ej., N297G), de manera tal que el anticuerpo TDB era una variante sin efector e incapaz de iniciar citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés). Luego de la hibridación, los TBD HER2 se purificaron mediante cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC, por sus siglas en inglés) y se caracterizaron por filtración analítica en gel, espectrometría de masas y electroforesis en gel de poliacrilamida, como se describió anteriormente. Un grupo anti-

HER2 utilizado en la generación de los TDB HER2 fue el del anticuerpo anti-HER2 hu4D5, que comprende: (a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 270 y (b) un dominio de VL que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 271. Los TDB HER2 adicionales se generaron para dirigirse a diferentes regiones del dominio extracelular (ECD, por sus siglas en inglés) de HER2. Un anticuerpo anti-HER2, 2C4, se utilizó como un grupo anti-Her2 que consta de: (a) un dominio de VH que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 593 y (b) un dominio de VL que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 594. Otro anticuerpo anti-HER2 utilizado como un grupo anti-HER2 fue el del anticuerpo anti-HER2, 7C2, que consta de: (a) un dominio de VH que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 595 y (b) un dominio de VL que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 596. Otros grupos anti-HER2 utilizados en la generación de los TDB HER2 incluyeron variantes de afinidad hu4D5, hu4D5.91A y hu4D5.Y100A (descrito en US 7,435,797).

Los TDB HER2 específicos se examinaron para la unión de células T CD8+ (unión CD3) y células SKBR3 (unión Her2), así como para la actividad, según lo evaluado por ensayos de toxicidad *in vitro* y ensayos de activación de células T.

A. Afinidad de unión

Las afinidades de unión para cada uno de los TDB HER2 se examinaron mediante análisis FACS, como se describe anteriormente para los TDB CD20. Brevemente, para ensayos de unión FACS, se incubaron células Jurkat (para el antígeno CD3), células CD8+ humanas (para el antígeno CD3) o SKBR3 (para el antígeno Her2) con distintas concentraciones de anticuerpos de TDB HER2 a 4 °C durante 30 minutos, luego las células se lavaron e incubaron con el segundo anticuerpo (anti-huIgG-PE, BD Bioscience; o anti-huIgG-AlexaFluor647, Southern Biotech) durante otros 15 minutos, antes de que las células se lavaran nuevamnte y estuvieran listas para el análisis FACS. La media geométrica de fluorescencia se leyó mediante citometría de flujo. Las Figuras 73, 76A, 78A-78C, 79A y 80A-80B muestran los resultados de los ensayos de unión FACS *in vitro* de los TDB HER2.

Los múltiples grupos HER2 que se unen a diferentes regiones de HER2 se examinaron en combinación con múltiples grupos CD3 que se unen a distintas regiones de CD3ε para caracterizar las propiedades de unión de cada combinación. La Figura 76A proporciona la estructura cristalina del ECD HER2 y la del $CD3_{\varepsilon}$ y resalta las regiones a las que se unen los diferentes grupos HER2 y CD3. El anticuerpo HER2 hu4D5 se conoce como trastuzumab y se une a un epítopo en el dominio IV de HER2 que es la región proteica que está más cerca de la membrana celular. El anticuerpo monoclonal recombinante humanizado 2C4 (rhuMAb 2C4) también se conoce como pertuzumab, que se une a un epítopo en el dominio II de HER2 que está a 50 angstromios del lugar donde se une hu4D5. Pertuzumab (PERJETA®, Genentech, Inc, South San Francisco) representa el primero de una nueva clase de agentes conocidos como inhibidores de la dimerización de HER (HDI, por sus siglas en inglés) y de funciones para inhibir la capacidad de HER2

de formar heterodímeros u homodímeros activos con otros receptores HER (tales como EGFR/HER1, HER2, HER3 y HER4) (Harari and Yarden. *Oncogene* 19:6102-6114, 2000; Yarden and Sliwkowski. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2:127-137, 2001; Sliwkowski. *Nat. Struct. Biol.*

10:158-159, 2003; Cho et al. *Nature* 421:756-60, 2003; and Malik et al. *Pro. Am. Soc. Cancer Res.* 44:176-177, 2003). El anticuerpo murino anti-HER2 7C2 se une a un epítopo en el dominio I de HER2 (publicación de PCT N.° WO 98/17797) que está a 100 angstromios de la región de HER2 unido por hu4D5 (Figura 76A).

Además, la afinidad de unión del TDB HER2 se probó con múltiples grupos anti-CD3. Uno de los grupos anti-HER2 proporcionados se combinó con grupos de alta afinidad dirigidos a CD3 humanos, tales como SP34 y 38E4v1. Otras combinaciones de TDB HER2 incluyó los grupos de baja afinidad dirigidos a CD3 humanos 40G5c o el grupo de 2C11 dirigido al CD3 murino. UCHT1v9 por su grupo anti-CD3 y hu4D5 por su grupo anti-HER2, referido en este documento como TDB HER2 (UCHT1v9/hu4D5) o TDB HER2, se comparó con el anticuerpo anti-HER2, trastuzumab y los fragmentos trastuzumab Fab en un ensayo de Scatchard competitivo (Ramirez-Carrozzi et al. *Nature Immunology*. 12: 1159-1166, 2011). En este ensayo, la unión a SKBR-3 se determinó por la competencia de unión de ^{125}I-trastuzumab Fab con trastuzumab, trastuzumab Fab o TDB HER2 bioespecíficos. La Figura 74A muestra los resultados del competitivo ensayo de Scatchard *in vitro* de TBD HER2.

B. Ensayos in vitro sobre la eliminación de células diana SKBR3 y MCF7 y la activación de células T

Las combinaciones de TDB HER2 de uno de los tres grupos anti-HER2 (hu4D5, 2C4 y 7C2) con el grupo anti-CD3 de alta afinidad 38E4v1 o con el grupo de baja afinidad 40G5c se examinaron *in vitro* por su capacidad de mediar en la eliminación de células diana de células SKBR3 o MCF7 que expresan HER2 (Figura 77). La actividad *in vitro* de los TDB hu4D5 con cualquier grupo anti-CD3 demostró ser más eficaz que los TDB 2C4 y 7C2 en la mediación de la eliminación celular máxima de las células SKBR3 y MCF7 como se mide por su EC50 (Figura 78). Esta actividad de eliminación también dependía del grupo CD3 utilizado. La combinación del grupo anti-CD 3 38E4v1 con cualquiera de los grupos anti-HER2 hu4D5, 2C4 o 7C2 fue más eficaz que las combinaciones de TDB HER2 40G5c (Figura 79). La prueba adicional de las 6 combinaciones de TDB HER2 reveló que su actividad de eliminación de células diana no depende del nivel de la expresión de HER2 en las células diana. La figura 80 muestra que los TDB HER2 no eran selectivos para los altos HER2 que expresan las células diana SKBR3 sobre los bajos HER2 que expresan las células diana MCF7. La actividad del TDB HER2 era, en cambio, dependiente de la afinidad del grupo anti-HER2 de HER2 (Figura 81). Los TDB de baja afinidad HER2 retuvieron la actividad en células MCF7 que expresan HER2 bajos y no pudieron matar selectivamente a las células SKBR3 amplificadas de HER 2 (Figura 82).

Los TDB HER2 también se ensayaron para determinar la especificidad del grupo anti-HER2 para sus respectivos epítopos HER2. La actividad de eliminación del TDB HER2

hu4D5-40G5c se limitó cuando se combinó con concentraciones crecientes de Trastuzumab (hu4D5). Sin embargo, la eficacia de trastuzumab no se ve afectada por la combinación del TDB hu4D5 con el anticuerpo hu4D5 (Figura 83). Por el contrario, la eliminación de las células diana mediada por 2C4-40G5c o 7C2 38E4v1 bloqueada por la coadministración de los anticuerpos monoespecíficos bivalentes pertuzumab (2C4) o 7C2, respectivamente (Figura 83). Cuando los grupos anti-HER2 se probaron en múltiples ensayos de afinidad, todos los clones que demostraban actividad alta o media de TDB HER2 competían con trastuzumab o pertuzumab (Figura 84). Para la identificación de los TDB candidatos para el ensayo *in vivo*, los grupos CD3 de alta (38E4v1, 38E4 y SP34) y baja (40G5c y 2C11) afinidad se probaron *in vitro* con células T CD3+ humanizadas derivadas de ratones en combinación con los grupos anti-HER2 hu4D5, 2C4 y 7C2 (Figuras 85-86). A partir de este ensayo, se seleccionaron tres TDB candidatos según su actividad de eliminación para una mayor caracterización *in vivo*: hu4D5-SP34, hu4D5-2C11 y 2C4-38E4. El tratamiento de animales con tumores con expresión HER2 con el TDB HER2 hu4D5-2C11 resultó en un aumento en las células CD45+ y CD8+ en el tumor tan pronto como a las 4 horas luego del tratamiento. Tras un análisis adicional, los tumores tratados TDB HER2 revelaron un aumento en las células T IFNγ+ y PD1+ CD8+ y un aumento en presencia de células T reguladoras (Treg) (Figura 87B). La detección de un aumento de infiltrados inmunes en tumores también se relacionó con una disminución del volumen del tumor de los animales tratados TDB HER2, en comparación con el tratamiento de control del vehículo (Figura 87A). En la figura 88A, el grupo anti-HER2 hu4D5 se combinó con el grupo anti-CD3 de baja afinidad, 2C11 o con el grupo anti-CD3 de alta afinidad, SP34, y ambos resultaron en la regresión del tumor en ratones HER2 transgénicos. Sin embargo, esta respuesta no se observó con el grupo anti-GER2 2C4 de baja afinidad combinado con el grupo anti-CD3 de alta afinidad 38E4 (Figuras 88A-88B).

El TDB HER2 también se comparó con fragmentos de trastuzumab y trastuzumab Fab bivalentes por su capacidad de inhibir directamente la proliferación de SKBR3. Las células dianas que expresan HER2 se incubaron en placas de 96 pocillos a una densidad de 5×10^3 células/posillo y se incubaron durante la noche para la fijación celular antes del tratamiento con el anticuerpo o fragmento de anticuerpo designado. Se analizó la proliferación/viabilidad celular después de 6 días de tratamiento mediante el Ensayo de viabilidad celular luminiscente CELLTITERGLO® (Promega, Madison, WI). En la Figura 74B se muestran los resultados de este ensayo. Además, se realizó un ensayo *in vitro* de toxicidad con trastuzumab, trastuzumab producida en *E. coli* y TDB HER2 para medir su capacidad para inducir la citotoxicidad NK mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC) (Jefferis *Trends in Pharmacological sciences.* 30: 356-362, 2009; Simmons et al. *Journal of Immunological Methods*. 263: 133-147, 2002). Los anticuerpos producidos en E. *coli* no están glicosilados, lo que resulta en deterioro de la unión FcyR, que se necesita para mediar la ADCC. El ensayo de citotoxicidad se realizó como en Junttila et al. (*Cancer Research.* 70: 4481-4489, 2010) con un a kit de detección de

citotoxicidad; LDH (Roche, Mannheim, Alemania). Brevemente, las células lisadas se detectaron mediante la liberación de la deshidrogenasa láctica (LDH, por sus siglas en inglés) después de 4 horas de tratamiento con el anticuerpo especificado. Los resultados se muestran en la Figura 74C.

Los TDB HER2 también se probaron para determinar su capacidad para soportar la eliminación de las células diana SKBR3 que expresan HER2 y la activación del efecto citotóxico de las células T. *La citotoxicidad* in vitro se controló mediante citometría de flujo. Las células dianas se marcaron con éster de succinimidilo de carboxifluoresceína (CFSE, por sus siglas en inglés) de acuerdo con el protocolo del fabricante (Invitrogen, # C34554). Las células diana marcadas con CFSE y las células T CD8+ purificadas de PBMC humanos se mezclaron en cierta proporción E:T (como se indica en las leyendas de la figura), con o sin TDB por 24 horas. Al final de la incubación, las células se levantaron con tripsina y se juntaron de la placa. Las células se resuspendieron en un volumen igual de PBS + 2% FBS + 1 mM EDTA + yoduro de propidio (PI). El análisis de citometría de flujo se realizó en un FACSCalibur en formato de automatización. El número de células diana vivas se contó mediante la apertura o cierre de las células negativas CFSE+/PI. El porcentaje de citotoxicidad se calculó de la siguiente manera: % de citotoxicidad (número de células diana vivas w/o TDB, número de células diana vivas w/TDB) / (número de células diana vivas w/o TDB) x 100. Como se muestra en la Figura 75, el TDB HER2 mostró una eliminación de células diana SKBR3 *in vitro* fuerte comparada con el TDB HER2 que tenía una variante de afinidad hu4D5 91A o Y100A como su grupo anti-HER2 (EC50 de hu4D5/ UCHT1v9 TDB = 0,1 ng/ml; hu4D5.91A/ UCHT1v9 TDB = 25,5 ng/ml; hu4D5.Y100A/ UCHT1v9 TDB = no se puede determinar).

Además, la afinidad de unión de la variante hu4D5 de anti-HER2 (0,4 nM) al dominio extracelular de HER2 (ECD) es mayor que los grupos HER2 2C4 (2,0 nM) y 7C2 (1,7 nM), que se muestra en la Figura 76B. Además, la Figura 76C muestra que el TDB HER2 hu4D5 es un mediador más potente de la eliminación de las células diana MCF7 que el TDB HER2 2C4 y el TDB HER2 7C2. La cinética de la eliminación inducida por el TDB HER2 se ensayó adicionalmente. Como se observa en la Figura 94A, no se detectó actividad de eliminación significativa a las 4-12 horas. La eliminación fuerte se detectó a las 24 horas y la eliminación aumentó con el paso del tiempo. Como se muestra en las figuras 90A, 90C y 92C, la comparación adicional de los grupos anti-CD3 del TDB HER2 hu4D5 demostró la eficacia de los diferentes clones en la mediación de la eliminación de células SKBR3 que expresan HER2. En particular, dos TDB Her2, hu4D5/38E4c y hu4D5/40G5c, fueron sorprendentemente tan o más eficaces en la mediación de la eliminación de las células dianas que el TDB HER2 hu4D5/SP34 (Figuras 90B y 90C).

Cuando se probó para ensayos de activación de células T, la Figura 89 muestra que el TDB HER2 fue capaz de inducir sólidamente la actividad de la células T *in vitro*, en comparación con el TDB HER2 que tiene variante de afinidad hu4D5 91A o Y100A como su grupo anti-HER2. Tres grupos anti-CD3 (SP34, 38E4c y 40G5c) del TDB HER2 hu4D5 ensayados mostraron diferentes afinidades de unión para el antígeno CD3 en células T

CD8+ humanas, como se observa en la Figura 91A. No obstante, los tres TDB HER2 pudieron mediar la activación de células T CD8+ (Figura 91B). En la Figura 92D, se muestra un análisis adicional de la capacidad de los grupos anti-CD3 38E4 y 38E4c del TDB HER2 hu4D5 para mediar la activación de células T CD8+. Se ensayó aún más la cinética de la activación de células T mediante TDB HER2. Aparecieron signos tempranos de activación de células T (CD69) 4 horas después del inicio del tratamiento de TDB HER2. Sin embargo, los marcadores de activación tardía (CD107a extracelular) se detectaron más tarde en el punto temporal de 24 horas (Figura 94A). Además, la activación de células T no se detectó después de 48 horas cuando las células CD8+ se incubaron con TDB HER2 o células diana que no expresan HER2 humana (células BJAB). Se observó una sólida activación de células T cuando las células HER2+ SKBR3 se utilizaron como dianas acompañadas por la liberación de gránulos citotóxicos (Figura 93A).

También probamos la capacidad de TDB HER2 para inducir la eliminación de células diana BT474 y se ensayó la activación de células T para las siguientes cinco relaciones de células T CD8+ efectoras a las células diana: 1:5, 1:2, 1:1, 3:1, y 5:1. Este experimento revela que la citotoxicidad medida por la liberación de LDH se redujo significativamente mediante la titulación de células efectoras. Sin embargo, incluso con una relación E: T de 1: 1, se detectó una señal de LDH débil y la sólida activación de las células T (Figura 94B).

En estos ensayos, las células diana y las células T CD8+ purificadas se mezclaron en presencia o ausencia de TDB y se analizó la activación de células T mediante la citometría de flujo. Al final de la incubación, las células se tiñeron con CD8-FITC (BD Bioscience, 555634) CD69-PE (BD Bioscience, 555531) y CD107a-Alexa-Fluor647 (eBioscience, 51-1079). Opcionalmente, las células se tiñeron con CD8-FITC y CD69-PE, donde la activación de células T se evaluó por el porcentaje de CD8+CD69+ en las células CD8+. Alternativamente, después de que la superficie se tiñó con CD8-FITC y CD69-PE, las células se fijaron y se permeabilizaron con una solución de Cytofix/Cytoperm (BD Bioscience, 554722) y se tiñeron de forma intracelular con anti-granzima B-Alexa-Fluor647 (BD Bioscience, 560212). La activación de células T se evaluó por el porcentaje de células CD8+CD107a+.

Otro índice para la citotoxicidad mediada por células T para TDB HER2 (UCHT1v9 / hu4D5) medido es un ensayo de exocitosis de los gránulos. La Figura 93B muestra los resultados para la perforina soluble (Cell Sciences), granzima A y granzima B (eBioscience) detectados a partir del medio de crecimiento por el método ELISA de acuerdo con los protocolos del fabricante. En este ensayo, se utilizó un TDB control (10 ng/ml), uno que comparte el mismo grupo AD3 como TDB HER2 pero que tiene un grupo para la diana irrelevante, o TDB HER2 (10 ng/ml). Los anticuerpos se incubaron de manera individual por 18 horas con células diana SKBR3 y células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés) efectoras, que se separaron de la sangre de voluntarios sanos a través del medio de separación de linfocitos (MP

Biomedicals, Solon, OH). *La citotoxicidad* in vitro se midió mediante la liberación de LDH, como se describe anteriormente. Se realizó una serie de ensayos de apoptosis con TDB HER2 (1 ng/ml), PBMC efectoras y células diana SKBR3. Después de 24 horas de tratamiento, la exocitosis de gránulos coincidió con una significativa elevación inducida de TDB HER2 de la actividad de la caspasa 3/7 (CASPASE-GLO® ensayo 3/7, Promega), apoptosis (ensayo Cell Death Detection ELISAplus, Roche) y citotoxicidad tal como se midió por la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH), como se describe anteriormente (Figura 93C).

La capacidad de TDB HER2 para inducir la eliminación de HER2 o células 3T3 transfectadas con el vector se midió mediante el ensayo de citotoxicidad de LDH antes mencionado, donde no se detectó ninguna eliminación de células 3T3 transfectadas con el vector después de 19 horas. En cambio, las células 3T3 transfectadas HER2 se eliminaron de manera muy eficiente (Figura 93D). El ensayo de eliminación se modificó para bloquear la unión del grupo HER2 mediante trastuzumab Fab (1µg/ml) o el dominio extracelular HER2 soluble (HER2 ECD) (1 mg/ml) y dio lugar a la inhibición eficaz de la actividad de eliminación después de 24 horas (Figura 93E). Para confirmar que las células T dependen de la eliminación, se mermaron las células CD3+ del OPBMC mediante microperlas CD3+ de Miltenyi (# 130-050-101). La Figura 93F muestra la disminución que resultó en la pérdida de la actividad de eliminación de células diana después de 19 horas, tal como se evaluó mediante análisis de FACS en presencia de TDB HER2.

TDB HER2 induce la proliferación de células T

Para investigar si TDB HER2 induce la proliferación de células T, se co-cultivaron células T CD8 +, células diana (SKBR3) y TDB HER2 de 0,1 µg/ml, seguido por el cultivo de células T en ausencia de células diana y TDB HER2. La proliferación de células T se midió en el día 3 mediante citometría de flujo como una dilución de CFSE en las células CD8+/PI con divisiones celulares. Después de 3 días, el 75% de las células T pulsadas con TDB HER2 y las células diana se habían sometido a una división celular como se muestra en la Figura 95A. El número de células T inducidas TDB HER2 se ensayó mediante el etiquetado de células T CD8+ purificadas con CFSE de acuerdo con el protocolo del fabricante (Invitrogen, # C34554). Las células T CD8+ marcadas con CFSE se incubaron con células dianas en presencia o ausencia de TDB por 19 horas. Las células T se recogieron, lavaron y cultivaron de 2 a 7 días (RPMI+10% FBS). El número de células CD8+ vivas (CD8+/PI-) y el porcentaje de células dim CFSE se detectaron mediante FACS. En la Figura 95B, el número de células no aumentó. Complementar aún más el medio de crecimiento con IL-2 (20 ng/ml) proporcionó una señal de supervivencia para las células CD8 + y se detectó una sólida proliferación de células T en las células T, pero sólo si estaban expuestas al TDB HER2 y a las células diana (Figura 95C). Es importante destacar que no se detectó ningún efecto espectador en las células de expresión no dianas en condiciones donde la mayoría de las células HER2+ en la misma cultura

resultaron eliminadas. TDB HER2 indujo la proliferación y la expansión policlonal de células T, lo que puede ser crítico para la amplificación de los linfocitos infiltrantes de tumor.

La actividad TDB HER2 se relaciona con el nivel de expresión HER de la célula diana

Para investigar la relación entre el número de copias de la diana y la actividad TDB, se seleccionó un panel de líneas celulares de cáncer con un número predeterminado de HER2-receptores en la membrana celular (Aguilar et al. *Oncogene*. 18:6050-62, 1999). Se detectaron niveles de expresión de proteínas HER2 en una línea celular negativa HER2 (BJAB LUC), 3 líneas de células bajas 3 HER2 (MDA435, MDA231, MCF7) y 3 líneas celulares amplificadas/de sobreexpresión HER2 (MD453, SKBR3, BT474) mediante Western blot (Figura 96A). Las líneas celulares de HER2 negativos, HER2 bajos y sobreexpresión de HER2 se incubaron con TDB HER2 y con PBMC efectoras en una relación E:T 25:1 durante 26 horas. En este punto de tiempo, la citotoxicidad se detectó a través del ensayo de liberación de LDH. La Figura 96B muestra que las células amplificadas/de sobreexpresión HER2 fueron significativamente más sensibles a la eliminación mediada por TDB (p = 0,015, t-test) y se lisaron eficientemente a femtomolar a bajas concentraciones picomolares (EC50 = 0,8-3 pM). Las líneas celulares que expresan niveles bajos de HER2 fueron significativamente menos sensibles al anticuerpo TDB HER2 (EC50=33-51 pM). Una cantidad de <1000 copias de antígeno diana fue suficiente para apoyar la eliminación de células T.

Para los estudios realizados en las Figuras 96C-96D, la línea celular MCF7 o la línea celular BJAB estaba co-dirigida con células SKBR3 en presencia de TDB HER2 en el mismo ensayo de eliminación. En este ensayo, las células MCF7 o BJAB se marcaron con CFSE y se mezclaron con SKBR3 y PBMC (E:T 20:1), seguido de 19 horas de tratamiento con TDB HER2. Las células se tiñeron con APC y PI anti-HER2. La Figura 96C muestra el porcentaje de las células vivas SKBR3 (HER2 alto, PI-) y MCF7 (CFSE+. PI-) detectado mediante FACS y normalizado a perlas fluorescentes. No se detectó la eliminación de las células MCF7 en el EC50 para la eliminación de SKBR3. Se muestra el porcentaje de células vivas de SKBR3 (HER2 elevado, PI-) y BJAB (CFSE+ PI-) detectadas por FACS y normalizadas por perlas fluorescentes. No se detectó ninguna muerte importante de células de BJAB en cualquier concentración de TDB HER2 (Figura 96D).

La ocupación objetivo baja es suficiente para la actividad de TDB

Luego, se calculó la ocupación de HER2 en EC50 para TDB HER2 mediante la utilización de la fórmula [D]/[D]+K_D (donde D = medicamento y K_D para TDB HER2 era 5,4 nM). Se informó el número de copia de HER2 (Aguilar et ál. Oncogene. 18: 6050-6062, 1999). Los valores de EC50 se calcularon de los datos de respuesta de la dosis en la Figura 97B. La Figura 96E muestra que en todas las líneas celulares probadas inferiores al 1 % de la ocupación diana era suficiente para una eliminación eficiente. En caso del

HER2 elevado que expresa líneas celulares, la ocupación requerida era incluso inferior (0,01-0,05 %). El número absoluto calculado de TBD HER2 ligado a HER2 en el EC50 era tan solo 10-150 en las líneas celulares bajas expresadas. Estos resultados muestran la extrema potencia de TDB HER2 y son coherentes con los estudios del desencadenante de TCR, que sugiere tan solo 1-15 TCR que deben involucrarse para desencadenar las respuestas a las células T (Irvine et ál. *Nature*. 419: 845-849, 2002; Purbhoo et ál. *Nature Immunology*. 5: 524-530, 2004; Sykulev et ál. *Immunity*. 4: 565-571, 1996). La potencia de TDB HER2 era coherente en el rango bajo de picomolar a femtomolar. Además, tan solo 10-500 TDB ligados a HER2 eran suficientes para inducir una citotoxicidad importante *in vitro*. Tan solo ~1000 copias de HER2 en la membrana plasmática eran suficientes para inducir la muerte. Estos estudios también demostraron una correlación entre los niveles de expresión objetivo y la sensibilidad *in vitro* a los TDB HER2.

El TDB HER2 es eficiente en la muerte de las células cancerígenas de HER2+ resistentes a los tratamientos anti-HER2.

Luego, se examinaron las líneas celulares que se han mostrado previamente para expresar niveles elevados de HER2 pero que son insensibles a los efectos celulares directos de trastuzumab y lapatinib *in vitro* (Junttila et ál., *Cancer Cell*, 15:429-40, 2009; Junttila et ál. *Breast Cancer Res Treat*, 2010). Para algunas líneas celulares, la activación de la vía de PI3K debido a las mutaciones de activación adquiridas en la subunidad catalítica de PI3K (KPL4, HCC202) o por la pérdida de PTEN (HCC1596) puede provocar resistencia. Un panel de seis líneas celulares (5 mamas, 1 pulmón) se analizó para la liberación de LDH como medición de citotoxicidad en presencia de PBMC efectores en una proporción de 10:1 y TDB HER2 durante 19 horas. El EC50 para la muerte mediada de TDB HER2 estaba en el rango femtomolar o picomolar bajo (Figura 97A). Los clones BT474-M1 resistentes a T-DMI1 y parentales se trataron con T-DMI1 durante 3 días. En este punto temporal, se midió la viabilidad celular con CELLTITERGLO® (Figura 97B). Se ha informado con anterioridad la sensibilidad de las líneas celulares a T-DM1 (Junttila et ál. *Breast Cancer Res Treat*. 2010; Lewis Phillips et ál. *Cancer Research.* 68: 9280-9290, 2008). En comparación, los clones de BT474-M1 resistentes a T-DM1 y parentales se trataron con TDB HER2 en presencia de las células CD8+ T efectoras en una proporción de 3:1 durante 24 horas. Se detectó citotoxicidad con el ensayo FACS (Figura 97C). Además, TDB HER2 era eficaz en la muerte de las células cancerígenas del pulmón HER2+. Con dos modelos de líneas celulares independientes KPL4 y BT474, (Figura 97B-97C), la resistencia adquirida a T-DM1 no afectó la sensibilidad a TDB HER2.

La identificación de la actividad de eliminación de células T con TDB HER2 depende de la expresión HER2, pero es independiente de la vía de señalización de HER2, que sugiere que TDB HER2 pueda ser eficiente en el tratamiento de tumores que son resistentes a los tratamientos actuales anti-HER2. Además, los datos demostraron actividad igual en el tratamiento de las líneas celulares resistentes a trastuzumab/lapatinib múltiples en comparación con las células sensibles. La resistencia

en estas células se genera mediante diversos mecanismos que afectan la vía de HER2. Los datos presentados aquí sugieren que el cambio al mecanismo alternativo de acción mediante la utilización de TDB HER2 puede permitir ampliamente superar la resistencia a los conjugados del medicamento del anticuerpo (p. ej., T-DM1), inhibidores de moléculas pequeñas objetivo (p. ej., lapatinib) y anticuerpos monoclonales clínicos que bloquean la señalización de la vía (p. ej. trastuzumab).

Farmacocinética de TDB HER2 en la rata

Para evaluar el perfil de la farmacocinética (PK) de TDB HER2, se utilizaron ratas Sprague Dawley. Los animales se separaron en los dos grupos mencionados a continuación: Grupo 1: TDB HER2 (10 mg/kg, IV única, n = 4); Grupo 2: trastuzumab (10 mg/kg, IV única, n = 4). Las muestras se tomaron de 4 ratas por grupo en puntos temporales durante 35 días posteriores a la dosis. Aproximadamente se recolectó 0,2 ml de sangre completa a través de la vena yugular (bajo anestesia de CO_2/O_2). Se dejaron coagular y centrifugar las muestras bajo refrigeración (5 °C durante 10 minutos a 2000 x g) a fin de obtener suero. Las muestras de suero se analizaron para IgG humano mediante ELISA, donde se utilizó un burro anti-huFc recubierto con placa de microtitulación para capturar los anticuerpos anti-HER2 humanizados en circulación y una cabra anti-huFc-HRP (adsorbida por el ratón) para la detección. Los parámetros de PK se determinaron con un método de 2 compartimientos (Modelo 7) con WINNONLIN®, versión 5.2.1 (Pharsight Corp., Mountain View, CA). El TDB HER2 no reacciona con CD3 de ratas o HER2 de ratas y mostró una disposición bifásica típica de un IgG1 con una fase de distribución corta y una fase de eliminación lenta (Figura 98). Tanto la depuración como la vida media de TDB HER2 eran similares para trastuzumab, y dentro del rango esperado de un IgG1 típico en ratas.

TDB HER2 inhibe el crecimiento del tumor *in vivo* en ratones inmunodeprimidos

La eficacia in vivo de TDB HER2 se probó en ratones NOD-SCID, que carecen de células T y B funcionales endógenas y han reducido los niveles de tipos celulares de NK, DC y macrófagos. En este experimento, los ratones NOD/SCID (NOD.CB17-*Prkdcscid*/J, Jackson Labs West) se implantaron con 0,36 mg, gránulos de estrógenos de liberación sostenida por 60 días (Innovative Research of America) 1 a 3 días antes de la inoculación celular, de manera subcutánea sobre el costado opuesto de la inoculación tumoral. En el Día 0, las células MCF7-neo/HER2 5 x 10^6 se inyectaron solas o juntas con PBMC humano no estimulado 10×10^6 de uno de dos donantes sanos (PBMC 1, 2) en HBSS-matrigel en la almohadilla de grasa mamaria derecha de 2/3. Los ratones inoculados se dividieron en los siguientes cinco grupos: Grupo 1: Vehículo (TDB de control, 0,5 mg/kg, qwk x 3, IV, comenzando el día 0, n=5-10); Grupo 2: PBMC(1) (PBMC (1) + TDB de control, 0,5 mg/kg, qwk x 3, IV, comenzando el día 0, n=5-10); Grupo 3: PBMC (1) + TDB HER2 (PBMC (1) + TDB HER2, 0,5 mg/kg, qwk x 3, IV, comenzando el día 0, n=5-10); Grupo 4: PBMC(2) (PBMC (2) + TDB de control, 0,5 mg/kg, qwk x 3, IV, comenzando el día 0, n=5-

10); Grupo 5: PBMC (2) + TDB HER2 (PBMC (2) + TDB HER2, 0,5 mg/kg, qwk x 3, IV, comenzando el día 0, n=5-10). Los primeros tratamientos se administraron 2 horas después de la inoculación. Los volúmenes de los tumores de ratones individuales y los volúmenes de los tumores adaptados de los grupos terapéuticos se presentan en la Figura 99A, donde TDB HER2 evitó el crecimiento de los tumores que expresan HER2.

La dependencia de TDB HR2 en los PBMC humanos además se probó en un modelo de ratones inmunodeprimidos similares. Nuevamente, las células MCF7-neo/HER2 5 x 10^6 se inyectaron solas o juntas con PBMC humano no estimulado 10×10^6 de un donante sano (PBMC 3) en HBSS-matrigel en la almohadilla de grasa mamaria derecha de 2/3, y los primeros tratamientos se administraron 2 horas después de la inoculación. En la Figura 100A, los ratones inoculados se dividieron en los siguientes dos grupos: Grupo 1: Sin tratar (n=7); Grupo 2: TDB HER2 (TDB HER2, 0,5 mg/kg, qwk x 3, IV, comenzando el día 0, n=7). En la Figura 100B, los ratones inoculados se dividieron en los siguientes tres grupos: Grupo 1: Sin tratar (n=7); Grupo 2: PBMC(3) (PBMC (3) + vehículo, 0,5 mg/kg, qwk x 3, IV, comenzando el día 0, n=7); Grupo 3: PBMC(3) + TDB de control (PBMC(3) + TDB-2C11 de control, 0,5 mg/kg, qwk x 3, IV, comenzando el día 0, n=7). Las mediciones del volumen del tumor resultante no revelan ningún efecto en el crecimiento del tumor en animales tratados con TDB de control.

El TDB HER2 provoca regresión de los tumores mamarios grandes en ratones transgénicos huHER2

Para modelar la actividad de TDB HER2 en ratones inmunocompetentes, se utilizaron ratones transgénicos MMTV-huHER2 humanos (Finkle et ál. *Clinical Cancer Research*. 10: 2499-2511; 2004), y un TDB HER2 sustituto que comprende un clon del anticuerpo del reactivo CD3 IgG2A murino 2C11 (Leo et ál. *Proc Natl Acad Sci USA*. 84: 1374-1378, 1987) se generó para evitar una respuesta inmunitaria hacia el TDB. Para la expresión como mulgG2a, las mutaciones equivalentes del botón en ojal (Atwell et ál. *J Mol Biol.* 270: 26-35, 1997) se introdujeron en la región Fc, así como D265A y N297G (numeración UE) para eliminar la función efectora. En TDB HER2 mulG2a el brazo "botón" es hu4D5 anti-HER2 murino y el "ojal" es CD3 2C11 anti-murino quimérico (Leo et ál. *Proc Natl Acad Sci USA*. 84: 1374-1378, 1987) (TDB 2C11/hu4D5) o CD3 SP34 anti-hu del ratón (Pessano et ál. *La Publicación de EMBO.* 4: 337-344, 1985) (TDB SP34/hu4D5). Los anticuerpos biespecíficos DE mulG2a se expresaron en células CHO y se ensamblaron mediante un ensamble *in vitro*. Los anticuerpos biespecíficos se purificaron de contaminantes mediante cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) como se describe en otro lugar (Speiss et ál. *Nat Biotechnology.* 31: 753-758, 2013). El material resultante se analizó para los niveles de endotoxinas con un sistema de prueba portátil ENDOSAFE® (Charles River, EE.UU.) y cuando sea necesario, el contenido de la endotoxina se redujo mediante el lavado de la proteína con 0,1 % de TRITON™ X-114. La actividad *in vitro* de TDB hu4D5/2C11 era similar a TDB HER2 reactivo de CD3 humano (Figura 101).

En la Figura 99B-99D, los animales transgénicos MMTV-99D con tumores mamarios establecidos se dividieron en los siguientes dos grupos: Grupo 1: Vehículo (0,5 mg/kg, qwk x 5, IV, comenzando el día 0, n=7); y el Grupo 2: TDB HER2 (TDB HER2 (2C11/hu4D5), 0,5 mg/kg, qwk x 5, IV, comenzando el día 0, n=7). La figura 99B muestra una regresión detectada en 57 % de los ratones y el 43 % de los ratones no tenían ningún tumor detectable tras el tratamiento. La figura 99C muestra que TDB HER2 (2C11/hu4D5) dio lugar a más de 50 % de regresión tumoral, salvo un tumor. Los participantes incluían tumores que eran >1000 mm^3 al comienzo del tratamiento como se observa en la Figura 99D. En un experimento similar dos TDB de control se utilizaron donde uno es un TDB de control del brazo de CD3 con el brazo de CD3 específico murino cambiado al brazo de CD3 específico humano (TDB HER2 (SP34/hu4D5)), y uno es un TDB de control, uno que comparte el mismo brazo de CD3 que el TDB HER2 (2C11/hu4D5) pero tiene un brazo diana irrelevante (CTRL TDB-2C11). En la Figura 99E, los animales transgénicos MMTV-huHER2 con tumores mamarios establecidos se dividieron en los siguientes dos grupos: Grupo 1: TDB de control del brazo de CD3 (TDB HER2 (SP34/hu4D5), 0,5 mg/kg, qwk x 5, IV, comenzando el día 0, n=5); y el Grupo 2: TDB de control (TDB-2C11 de control, 0,5 mg/kg, qwk x 5, IV, comenzando el día 0, n=5). El crecimiento de los tumores transgénicos MMTV-huHER2 no se vio afectado por los TDB de control.

El TDB HER2 además se probó para la eficacia *in vivo* en ratones transgéncios huCD3. Los ratones transgénicos humanos CD3ε se han descrito anteriormente ((huCD3 transgénico), de la Hera et ál. *J Exp Med.* 173: 7-17, 1991). En este estudio, 0,1 millones de células de CT26-HER2 se inyectaron subcutáneamente en ratones transgénicos huCD3. Una vez que se establezcan los tumores CT26-HER2, los animales se dividieron en los siguientes dos grupos: Grupo 1: Vehículo (0,5 mg/kg, qwk x 3, IV, comenzando el día 0, n=7); Grupo 2: TDB HER2 (TDB HER2 (SP34/hu4D5), 0,5 mg/kg, qwk x 3, IV, comenzando el día 0, n=7). TDB HER2 inhibió el crecimiento de los tumores establecidos, pero el efecto fue transitorio y no se observaron respuestas completas (Figura 99F). El estudio demostró la actividad *in vivo potente* de TDB HER2, incluyendo las respuestas dramáticas en ratones transgénicos MMTV-huHER2.

En un experimento similar, la eficacia *in vivo* del TDB HER2 reactivo del ratón (2C11/hu4D5) se probó en ratones Balb/c. Nuevamente, los tumores singénicos se establecieron en ratones Balb/c inyectando células CT26-HER2 $1x10^5$ subcutáneamente. Los animales que tenían tumores se dividieron en uno de los siguientes cuatro grupos: Grupo 1: Vehículo (0,5 mg/kg, qwk x 3, IV, comenzando el día 0, n=10); Grupo 2: TDB HER2 (TDB HER2 (2C11/hu4D5), 0,5 mg/kg, qwk x 3, IV, comenzando el día 0, n=10); Grupo 3: TDB de control (CTRL TDB (2C11/hu4D5), 0,5 mg/kg, qwk x 3, IV, comenzando el día 0, n=10); y el Grupo 4: TDM-1 (TDM-1, 15 mg/kg, qwk x 3, IV, comenzando el día 0, n=10). La figura 99G muestra que a pesar de las respuestas incompletas, el TDB HER2 prolongó el tiempo de manera significativa a la evolución del tumor (valor p de rango logarítmico <0,0001). Por contraste, el TDB de control con un brazo tumoral irrelevante

no tuvo efecto en el crecimiento tumoral. Además, los tumores no eran sensibles a TDM-1.

TDB HER2 inhibe el crecimiento de tumores establecidos en ratones inmunocompetentes

Los ratones transgénicos humanos CD3ε (de la Hera et ál. *J Exp Med.* 173: 7-17, 1991) se utilizaron para modelar la actividad de TDB HER2 en ratones inmunocompetentes. En este experimento, las células T transgénicas huCD3 fueron extraídas de bazos de ratones transgénicos y BALB/c huCD3 o de la sangre periférica de donantes humanos sanos. Las células se tiñeron con CD8 de ratón o humano y CD3 humano (UCHT1 clon) en la Figura 101A o el CD3 del ratón (2C11 clon) en la Figura 101B. Las células CD8+ se detectaron mediante citometría de flujo. La Figura 101A muestra el CD3 humano expreso de las células T transgénicas huCD3 a aproximadamente 50 % del nivel de las células T humanas, y la Figura 101B muestra CD3 murino expreso de las células T transgénicas huCD3 a aproximadamente 50 % del nivel de ratones BALB/c.

Luego, las células T transgénicas huCD3 se analizaron por su capacidad de matar células objetivo de CT26 que expresan HER2 *in vitro.* En este estudio, las células T fueron extraídas de bazos de ratones transgénicos huCD3, ratones BALB/c huCD3 o de sangre periférica proveniente de donantes humanos sanos. *La actividad de matar* in vitro de las células CT26-HER2 se probó con TDB HER2 específico de CD3 humano (UCHT1v9/hu4D5) en la Figura 102A o TDB HER2 específico del ratón (2C11/hu4D5) en la Figura 102B. Las células T efectoras se agregaron en una proporción de 20:1 a las células objetivo en presencia de TDB HER2 diseñado durante 40 horas. *La citotoxicidad* in vitro se controló mediante citometría de flujo. Si bien la actividad de eliminación de las células T esplénicas del ratón (EC50 = 2,4 ng/ml) fue inferior de manera coherente en comparación con las células T periféricas humanas (EC50 = 0,4 ng/ml), las células T transgénicas huCD3 eliminaron las células diana que expresan HER2 humano *in vitro* como se observa en la Figura 102A. El TDB HER2 específico del ratón (2C11/hu4D5) indujo matar las células objetivos mediante células T provenientes de ratones transgénicos huCD3 (EC50 = 11 ng/ml) y BALB/c (EC50 = 10 ng/ml) como se observa en la Figura 102B.

La dependencia de las células T de la actividad antitumoral de TDB HER2 además se analizó en un modelo tumoral singénico. Como se describe anteriormente, las células CT26-HER2 1x105 se inyectaron en ratones BALB/c. Los ratones con tumores establecidos se dividieron en uno de los siguientes dos grupos: Grupo 1: Vehículo (n=10); Grupo 2: TDB HER2 (SP34/hu4D5) (TDB HER2 (SP34/hu4D5), 0,5 mg/kg, qwx3, IV, n=10). La figura 103 muestra que la actividad de TDB HER2 dependía de las células T, dado que el TDB HER2 no tuvo efecto alguno en ratones transgénicos sin huCD3. El presente estudio demostró ratones transgénicos huCD3 que se pueden utilizar como modelo de eficacia novedosa para las moléculas objetivo de huCD3.

Ejemplo 6. Generación y caracterización de los TDB de CD3/LYPD1 ejemplares.

Además, exploramos la capacidad de anticuerpos de TDB para identificar las actividades citotóxicas de las células T en extirpar las células tumorales mediante el reconocimiento de un antígeno de superficie celular diferente, LYPD1. Para ello, generamos y caracterizamos anticuerpos anti-CD3 que tienen un brazo anti-CD3 y un brazo anti-LYPD1 (TDB de LYPD1). Como se describió anteriormente, los TBD de LYPD1 se produjeron como anticuerpos de longitud completa en el formato de botón en ojal (knob-into-hole) como IgG1 humana, como se describió previamente (Atwell et ál. *J. Mol. Biol.* 270: 26-35, 1997). La mitad de los anticuerpos se expresaron en *E. coli* o en células de ovarios de hámster chino (CHO), purificados por cromatografía de afinidad de proteínas A, y los pares adecuados de anticuerpos medios se hibridaron *in vitro* como se describió anteriormente (Spiess y otros. *Nat. Biotechnol.* 2013). Si la producción de anticuerpos TDB se llevó a cabo en células CHO, el anticuerpo incluyó una mutación de glicosilación, por ejemplo, en el residuo N297 (p. ej., N297G), de manera tal que el anticuerpo TDB era una variante sin efector e incapaz de iniciar citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés). Luego de la hibridación, los TBD LYPD1 se purificaron mediante cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC, por sus siglas en inglés) y se caracterizaron por filtración analítica en gel, espectrometría de masas y electroforesis en gel de poliacrilamida, como se describió anteriormente. Un grupo anti-LYPD1 utilizado en la generación de los TDB LYPD1 fue el del anticuerpo anti-LYPD1 YWO.49.H6, que comprende: (a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos con N.° de ID de SEC.: 272 y (b) un dominio de VL que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 273. Los brazos anti-CD3 probados en la generación de los TDB LYPD1 incluían UCHT1v9, 40G5, SP34, y 38E4v1

Los TDB HER2 específicos se examinaron para la unión de células CD8+ T (unión CD3), así como la actividad, según lo evaluado por ensayos de toxicidad *in vitro* y ensayos de activación de células T.

A. Afinidad de unión

Las afinidades de unión para cada uno de los TDB LYPD1 se examinaron mediante análisis FACS, como se describió anteriormente para los TDB CD20. Brevemente, para ensayos de unión FACS, se incubaron células T CD8+ T con distintas concentraciones de anticuerpos de TDB LYPD1 a 4 °C durante 30 minutos, luego las células se lavaron e incubaron con el segundo anticuerpo (anti-huIgG-PE, BD Bioscience; o anti-huIgG-AlexaFluor647, Southern Biotech) durante otros 15 minutos, antes de que las células se lavaran nuevamente y estuvieran listas para el análisis FACS. La figura 104 muestra los resultados de ensayos de unión FACS *in vitro* de TDB LYPD1. Los estudios de unión mostraron que los TDB LYPD1 que tienen UCHT1v9 o 38E4v1 como su brazo anti-CD3 demostraron una afinidad de unión más elevada para las células efectoras resultantes.

B. Ensayos in vitro sobre la muerte de células OVCAR3.Luc y la activación de células T

Los TDB LYPD1 también se probaron para determinar su capacidad para soportar la eliminación de las células diana OVCAR3 que expresan LYPD1 y la activación del efecto citotóxico de las células T. *La citotoxicidad* in vitro se controló mediante citometría de flujo. Las células dianas se marcaron con CFSE de acuerdo con el protocolo del fabricante (Invitrogen, # C34554). Las células diana marcadas con el éster de succinimidilo de carboxifluoresceína (CFSE) y las células T de CD8+ purificadas de PBMC humanos se mezclaron en una proporción 3:1, con o sin TDB durante 48 horas. Las células se resuspendieron en un volumen igual de PBS + 2% FBS + 1 mM EDTA + yoduro de propidio (PI). El análisis de citometría de flujo se realizó en un FACSCalibur en formato de automatización. El número de células diana vivas se contó mediante la apertura o cierre de las células negativas CFSE+/PI. El porcentaje de citotoxicidad se calculó de la siguiente manera: % de citotoxicidad (número de células diana vivas sin TDB, número de células diana vivas c/TDB) / (número de células diana vivas sin TDB) x 100. Como se representa en la Figura 105, los TDB LYPD1 con UCHT1v9, 38E4v1, o SP34 para su brazo anti-CD3 mostraron una eliminación de células diana OVCAR3.Luc *in vitro* en comparación con el TDB LYPD1 que tiene 40G5 como su brazo anti-CD3.

Cuando se prueba para los ensayos de activación de las células T, la Figura 106 muestra que los TDB LYPD1 con 38E4v1, en menor medida, UCHT1v9 y SP34, para su brazo anti-CD3 eran capaces de inducir fuertemente la actividad de las células T *in vitro*, en comparación con el TDB LYPD1 que tiene 40G5c como su brazo anti-CD3. En estos ensayos, las células diana y las células T CD8+ purificadas se mezclaron en presencia o ausencia de TDB y se analizó la activación de las células T mediante la citometría de flujo. Al final de la incubación, las células se tiñeron con CD8-FITC (BD Bioscience, 555634) CD69-PE (BD Bioscience, 555531) y CD107a-Alexa-Fluor647 (eBioscience, 51-1079). Opcionalmente, después de que la superficie se tiñó con CD8-FITC y CD69-PE, las células se fijaron y se permeabilizaron con una solución de Cytofix/Cytoperm (BD Bioscience, 554722) y se tiñeron de forma intracelular con anti-granzima B-Alexa-Fluor647 (BD Bioscience, 560212). La activación de las células T se evaluó mediante el porcentaje de las células CD8+CD69+ y CD8+CD25+.

Otras modalidades

Si bien la invención antes mencionada se ha descrito con detalle mediante la ilustración y ejemplo a efectos de mayor esclarecimiento, las descripciones y ejemplos no se deben interpretar como limitación del alcance de la invención. Las descripciones de toda la patente y la bibliografía científica citada en la presente descripción se incorporan expresamente en su integridad como referencia.

ANTICUERPOS ANTI-CD3 Y MÉTODOS DE USO

ÁREA DE LA INVENCIÓN

La presente invención se relaciona con los anticuerpos 3 (CD3) de los anti-cúmulos de diferenciación y los métodos para utilizarlos.

ANTECEDENTES

Los trastornos de proliferación celular, como el cáncer, se caracterizan por el crecimiento incontrolado de las subpoblaciones celulares. Son la causa principal de muerte en los países desarrollados y la segunda causa principal de muerte en los países en desarrollo, con más de 12 millones de nuevos casos de cáncer diagnosticados y con 7 millones de muertes por cáncer cada año. El Instituto Nacional del Cáncer estima que más de 500.000 estadounidenses morirán de cáncer en 2013, que representará casi una de cada cuatro muertes en el país. Debido a que la población de la tercera edad ha crecido, la incidencia de cáncer ha aumentado al mismo tiempo, pues la probabilidad de padecer de cáncer es más de dos veces superior luego de los setenta años. Por lo tanto, el cuidado del cáncer representa una carga social significativa y cada vez mayor.

Los enfoques de larga data para tratar el cáncer incluyen la quimioterapia, la radioterapia y la cirugía para extirpar los tumores sólidos. Recientemente, se han desarrollado inmunoterapias basadas en anticuerpos biespecíficos. Esos anticuerpos biespecíficos son capaces de unir simultáneamente los antígenos de la superficie celular con las células citotóxicas y las células cancerosas, con la intención de que la célula citotóxica unida destruya la célula cancerosa unida. Los anticuerpos biespecíficos existentes que se encuentran actualmente bajo ensayo clínico para el tratamiento contra el cáncer se ven limitados por sus vidas medias reducidas o su eficacia variable. Por lo tanto, existe una necesidad insatisfecha en el campo para el desarrollo de anticuerpos biespecíficos efectivos para utilizarlos en el tratamiento contra el cáncer.

RESUMEN

La presente invención se relaciona con los anticuerpos 3 (CD3) de los anti-cúmulos de diferenciación y los métodos para utilizarlos.

En un caso, la invención presenta un anticuerpo anti-CD3, donde el anticuerpo anti-CD3 comprende un dominio de unión que consta de las siguientes seis regiones hipervariables (RHV): (a) una RHV-H1 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 1; (b) una RHV-H2 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 2; (c) una RHV-H3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 3; (d) una RHV-L1 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 4; (e) una RHV-L2 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 5; y (f) una RHV-L3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 6. En algunas representaciones, el dominio de unión comprende (a) un dominio de cadena pesada

variable (VH) que consta de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una identidad de secuencia del 95% con la secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 184; (b) un dominio de cadena liviana variable (VL) que consta de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una identidad de secuencia del 95% con la secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 185; o (c) un dominio de VH como en (a) y un dominio de VL como en (b). En algunas representaciones, el dominio de VH comprende la secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 184. En algunas representaciones, el dominio de VL comprende la secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 185. En algunas representaciones, el dominio de unión comprende (a) un dominio de cadena pesada variable (VH) que consta de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una identidad de secuencia del 95% con la secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 186; (b) un dominio de cadena liviana variable (VL) que consta de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una identidad de secuencia del 95% con la secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 187; o (c) un dominio de VH como en (a) y un dominio de VL como en (b). En algunas representaciones, el dominio de VH comprende la secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 186. En algunas representaciones, el dominio de VL comprende la secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 187.

En otro caso, la invención presenta un anticuerpo anti-CD3, donde el anticuerpo anti-CD3 se une con un epítopo del CD3 que consta de residuos de aminoácidos Glu6 de CD3. En algunos casos, la invención presenta un anticuerpo anti-CD3, donde el epítopo además consta de uno o más residuos de aminoácidos seleccionados del grupo formado por Gln1, Asp2 y Met7 de CD3. En otro caso, la invención presenta un anticuerpo anti-CD3, donde el epítopo consta de residuos de aminoácidos Gln1, Asp2 y Glu6 de CD3. En algunos casos, la invención presenta un anticuerpo anti-CD3, donde el epítopo consta de residuos de aminoácidos Gln1, Asp2, Glu6 y Met7 de CD3. En otro caso, la invención presenta un anticuerpo anti-CD3, donde el epítopo no consta de residuos de aminoácidos Glu5 de CD3. En otro caso más, la invención presenta un anticuerpo anti-CD3, donde el epítopo no consta de residuos de aminoácidos Gly3 y Glu5 de CD3. En algunos casos, la invención presenta un anticuerpo anti-CD3, donde el epítopo consta de residuos de aminoácidos Gln1, Asp2, Glu6 y Met7 de CD3.

En casos relacionados, la invención presenta un anticuerpo anti-CD3 que une dicho epítopo y que es un anticuerpo multiespecífico. En algunas representaciones, el anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo biespecífico. En algunas representaciones, el anticuerpo biespecífico comprende un segundo dominio de unión que se une con una segunda biomolécula, donde la segunda biomolécula es un antígeno de la superficie celular. En algunas representaciones, el antígeno de la superficie celular es un antígeno tumoral. En algunas representaciones, el antígeno tumoral se selecciona de un grupo que consta de CD20; FcRH5 (5 similar al receptor de Fc); HER2; LYPD1; Ly6G6D (antígeno de linfocito 6 complejo, locus G61); Ly6-D, MEGT1); PMEL17 (homólogo de plata; SILV;

D12S53E; PMEL17; (SI); (SIL); ME20; gp100); Ly6E (antígeno de linfocito 6 complejo, locus E; Ly67, RIG-E, SCA-2, TSA-1); CD19; CD33; CD22 (isoforma CD22-B del receptor de la célula B isoform); CD79a (CD79A, CD79a, alfa asociada a la inmunoglobulina; BMPR1B (receptor de proteína morfogenética ósea de tipo IB); CD79b (CD79B, CD79β, 1 Gb (beta asociada a la inmunoglobulina), B29); EDAR (Receptor de la Ectodisplasina A); GFRA1 (GDNF-Ra1); MRP4 (Proteína 4 de Resistencia a Multidrogas); RET; STEAP1 (antígeno epitelial de seis dominios transmembrana de la próstata); TENB2 (proteoglicano transmembranal putativo); E16 (LAT1, SLC7A5); 0772P (CA125, MUC16); MPF (MPF, MSLN, SMR, factor potenciador de megacariocitos, mesotelina); Napi2b (NAPI-2B, NPTIIb, SLC34A2, transportador de soluto familia 34 (fosfato de sodio), miembro 2, transportador 3b de fosfato dependiente del sodio de tipo II); Sema 5b; PSCA hlg (2700050C12Rik, C530008O16Rik, RIKEN cDNA 2700050C12, gen RIKEN cDNA 2700050C12); ETBR (Receptor de la endotelina tipo B); MSG783 (RNF124, proteína hipotética FLJ20315); STEAP2; TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, receptor de potencial transitorio, subfamilia M, miembro 4); CRIPTO (CR, CR1, CRGF, CRIPTO, TDGF1, teratocarcinoma-derivado del factor de crecimiento); CD21 (CR2 (Receptor del complemento 2) o C3DR (C3d/Receptor del virus de Epstein-Barr) o Hs.73792); FcRH2 (IFGP4, IRTA4, SPAP1A (proteína 1a con anclaje de fosfatasa que contiene dominio SH2), SPAP1B, SPAP1C); NCA; MDP; IL20Rα; Brevican; EphB2R; ASLG659; PSCA; GEDA; BAFF-R (receptor del factor activador de la célula B, receptor BLyS 3, BR3); CXCR5 (Receptor 1 del linfoma de Burkitt; HLA-DOB (Subunidad Beta de molécula II de clase MHC); P2X5 (Receptor purinérgico P2X, canal iónico regulado por ligando 5; CD72 (Antígeno de diferenciación de célula B CD72, Lyb-2); LY64 (Antígeno de linfocito 64 (RP105), proteína de membrana de tipo 2 de la familia rica en leucina (LRR)); FcRH1 (Proteína 1 similar al receptor Fc); IRTA2 (Receptor de la superfamilia de inmunoglobulina, translocación asociada 2); TMEFF1; TMEM46 (compuesto homólogo de shisa 2 (Xenopus laevis); SHISA2); LGR5 (rica en leucina-receptor 5 acoplado a proteínas G; GPR49, GPR67); LY6K (antígeno de linfocito 6 complejo, locus K; LY6K; HSJ001348; FLJ35226); GPR19 (receptor acoplado a proteínas G 19; Mm 4787); GPR54 (receptor KISS1; KISS1R; GPR54; HOT7T175; AXOR12); ASPHD1 (dominio aspartato beta-hidroxilasa que contiene 1; LOC253982); Tirosinasa (TYR; OCAIA; OCA1A; tirosinasa; SHEP3); TMEM118 (proteína del dedo anular, transmembrana 2; RNFT2; FLJ14627); GPR172A (receptor acoplado a proteínas G 172A; GPCR41; FLJ11856; D15Ertd747e); GPC3 (Glipicano 3); CLL1 (molécula 1 tipo lectina de Tipo C); B7-H4 (B7x; B7S1); RNF43 (Proteína del dedo anular 43); CD70; CXORF61 (Cromosoma X con marco abierto de lectura 61); HAVCR1; Epirregulina; Amfirregulina; EGFR ; EGFR-L858R; EGFR-L861Q; EGFR-G719A; EGFR-G719S; EGFR-G719C; EGFR-T790M; EGFR-S768I; adipofilina; AIM-2; ALDH1A1; alfa-actinina-4; alfa-fetoproteína; ARTC1; B-RAF; BAGE-1; BCLX (L); proteína de fusión BCR-ABL (b3a2); 8; CD45; Cdc27; CDK4; CDKN2A; CEA; CLPP; COA-1; CPSF; Cw6; ciclina D1; Ciclina-A1; proteína de fusión dek-can; DKK1; DR1; DR13; EFTUD2; Factor de Elongación 2; ENAH (hMena); EpCAM; EphA3; proteína de fusión ETV6-AML1; EZH2; FLT3-ITD;

FN1; G250; MN; CAIX; GAGE-1;2;8; GAGE-3;4;5;6;7; glipicano-3; GnTVf; gp100 / Pmel17; GPNMB; HERV-K-MEL; hsp70-2; IDO1; IGF2B3; IL13Ralf2; Esterasa carboxilo intestinal; K-ras; Calicreína 4; KIF20A; KK-LC-1; KM-HN-1; LAGE-1; LDLR-fucosiltransferasa AS proteína de fusión; Lengsin; M-CSF; MAGE-A1; MAGE-A10; MAGE-A12; MAGE-A2; MAGE-A3; MAGE-A4; MAGE-A6; MAGE-A9; MAGE-C1; MAGE-C2; mamaglobina-A; MART2; MCSP; mdm-2; ME1; Melan-A / MART-1; Meloe; MMP-2; MMP-7; MUC1; MUC5AC; mucina; MUM-1f; MUM-2; MUM-3; Clase de miosina I; N-ras; NA88-A; neo-PAP; NFYC; NY-BR-1; NY-ESO-1/LAGE-2; OA1; OGT; OS-9; p53; PAP; PAX5; PBF; proteína de fusión pml-RARalfa; PRAME; PRDX5; PSMA; PTPRK; RAB38 / NY-MEL-1; RAGE-1; RBAF600; RGS5; RhoC; RNF43; RU2AS; SAGE; secernin 1; SIRT2; SNRPD1; SOX10; Sp17; SSX-2; SSX-4; STEAP1; survivina; proteína de fusión SYT-SSX1 o -SSX2; TAG-1; TAG-2; Telomerasa; TGF-betaRII; TRAG-3; Triosa fosfato isomerasa; TRP-1 / gp75; TRP-2; TRP2-INT2; tirosinasa; VEGF; WT1; XAGE-1b/GAGED2a; y SLC53SLC35D3. En algunas representaciones, el antígeno tumoral se selecciona de un grupo que consta de CD20, FcRH5, HER2, LYPD1, LY6G6D, PMEL17, LY6E, CD19, CD33, CD22, CD79A, CD79B, EDAR, GFRA1, MRP4, RET, Steap1, y TenB2. En las representaciones preferidas, el antígeno tumoral se selecciona de un grupo que consta de CD20, HER2, FcRH5 y LYPD1.

En algunas representaciones, el dominio de unión de cualquiera de los anticuerpos anti CD3 precedentes se une a un polipéptido CD3 humano o a un polipéptido CD3 de macaco cangrejero. En algunas representaciones, el polipéptido CD3 humano o el polipéptido CD3 de macaco cangrejero es un polipéptido CD3ε humano o polipéptido CD3ε de macaco cangrejero, respectivamente. En algunas representaciones, el polipéptido CD3 humano o el polipéptido CD3 de macaco cangrejero es un polipéptido CD3γ humano o polipéptido CD3γ de macaco cangrejero, respectivamente.

En algunas representaciones, cualquiera de los anticuerpos anti CD3 precedentes une el polipéptido CD3ε humano con un Kd de 250 nM o menos. En algunas representaciones, el anticuerpo anti CD3 une el polipéptido CD3ε humano con un Kd de 100 nM o menos. En algunas representaciones, el anticuerpo anti CD3 une el polipéptido CD3ε humano con un Kd de 15 nM o menos. En algunas representaciones, el anticuerpo anti CD3 une el polipéptido CD3ε humano con un Kd de 10 nM o menos. En algunas representaciones, el anticuerpo anti CD3 une el polipéptido CD3ε humano con un Kd de 5 nM o menos.

En algunas presentaciones, cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 anteriores puede comprender una mutación en el lugar de la glicosilación. En algunas representaciones, la mutación en el lugar de la glicosilación es una mutación de sustitución. En algunas representaciones, la mutación de sustitución se produce en el residuo de los aminoácidos N297, L234, L235, y/o D265 (numeración UE). En algunas representaciones, la mutación de sustitución se selecciona del grupo que consta de N297G, N297A, L234A, L235A y D265A. En algunas representaciones, la mutación de sustitución es una mutación de N297G. En algunas representaciones, la mutación en el lugar de la glicosilación reduce la función efectora del anticuerpo anti-CD3. En algunas representaciones, la mutación en el lugar de la glicosilación reduce la función efectora

del anticuerpo anti-CD3. En algunas representaciones, un anticuerpo anti-CD3 consta de una mutación de sustitución en la región Fc que reduce la función efectora.

En algunas representaciones, cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 precedentes pueden ser monoclonales, humanos, humanizados o quiméricos. En algunas representaciones, cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 precedentes puede ser un fragmento de anticuerpos que une el CD3. En algunas representaciones, el fragmento de anticuerpos se selecciona del grupo que consta de los fragmentos Fab, Fab'-SH, Fv, scFv, y $(Fab')_2$. En otras representaciones, el anticuerpo anti-CD3 es un anticuerpo de cuerpo entero. En algunas representaciones, el anticuerpo anti-CD3 es un anticuerpo IgG (por ej., un anticuerpo IgG1, IgG2 o IgG3). En algunas representaciones, el anticuerpo anti-CD3 es un anticuerpo monoespecífico. En algunas representaciones, el anticuerpo anti-CD3 es un anticuerpo captador biespecífico de células T (BITE®).

En algunas representaciones, el anticuerpo anti-CD3 es un anticuerpo multiespecífico. En algunas representaciones, el anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo biespecífico. En algunas representaciones, el anticuerpo biespecífico comprende un segundo dominio de unión que se une con una segunda biomolécula, donde la segunda biomolécula es un antígeno de la superficie celular. En algunas representaciones, el antígeno de la superficie celular es un antígeno tumoral. En algunas representaciones, el antígeno tumoral se selecciona de un grupo que consta de CD20; FcRH5 (5 similar al receptor de Fc); HER2; LYPD1; Ly6G6D (antígeno de linfocito 6 complejo, locus G61); Ly6-D, MEGT1); PMEL17 (homólogo de plata; SILV; D12S53E; PMEL17; (SI); (SIL); ME20; gp100); Ly6E (antígeno de linfocito 6 complejo, locus E; Ly67, RIG-E, SCA-2, TSA-1); CD19; CD33; CD22 (isoforma CD22-B del receptor de la célula B isoform); CD79a (CD79A, CD79a, alfa asociada a la inmunoglobulina; BMPR1B (receptor de proteína morfogenética ósea de tipo IB); CD79b (CD79B, CD79β, 1 Gb (beta asociada a la inmunoglobulina), B29); EDAR (Receptor de la Ectodisplasina A); GFRA1 (GDNF-Ra1); MRP4 (Proteína 4 de Resistencia a Multidrogas); RET; STEAP1 (antígeno epitelial de seis dominios transmembrana de la próstata); TENB2 (proteoglicano transmembranal putativo); E16 (LAT1, SLC7A5); 0772P (CA125, MUC16); MPF (MPF, MSLN, SMR, factor potenciador de megacariocitos, mesotelina); Napi2b (NAPI-2B, NPTIIb, SLC34A2, transportador de soluto familia 34 (fosfato de sodio), miembro 2, transportador 3b de fosfato dependiente del sodio de tipo II); Sema 5b; PSCA hlg (2700050C12Rik, C530008O16Rik, RIKEN cDNA 2700050C12, gen RIKEN cDNA 2700050C12); ETBR (Receptor de la endotelina tipo B); MSG783 (RNF124, proteína hipotética FLJ20315); STEAP2; TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, receptor de potencial transitorio, subfamilia M, miembro 4); CRIPTO (CR, CR1, CRGF, CRIPTO, TDGF1, teratocarcinoma-derivado del factor de crecimiento); CD21 (CR2 (Receptor del complemento 2) o C3DR (C3d/Receptor del virus de Epstein-Barr) o Hs.73792); FcRH2 (IFGP4, IRTA4, SPAP1A (proteína 1a con anclaje de fosfatasa que contiene dominio SH2), SPAP1B, SPAP1C); NCA; MDP; IL20Rα; Brevican; EphB2R; ASLG659; PSCA; GEDA; BAFF-R (receptor del factor activador de la célula B, receptor BLyS 3, BR3); CXCR5 (Receptor 1

del linfoma de Burkitt; HLA-DOB (Subunidad Beta de molécula II de clase MHC); P2X5 (Receptor purinérgico P2X, canal iónico regulado por ligando 5; CD72 (Antígeno de diferenciación de célula B CD72, Lyb-2); LY64 (Antígeno de linfocito 64 (RP105), proteína de membrana de tipo 2 de la familia rica en leucina (LRR)); FcRH1 (Proteína 1 similar al receptor Fc); IRTA2 (Receptor de la superfamilia de inmunoglobulina, translocación asociada 2); TMEFF1; TMEM46 (compuesto homólogo de shisa 2 (Xenopus laevis); SHISA2); LGR5 (rica en leucina-receptor 5 acoplado a proteínas G; GPR49, GPR67); LY6K (antígeno de linfocito 6 complejo, locus K; LY6K; HSJ001348; FLJ35226); GPR19 (receptor acoplado a proteínas G 19; Mm 4787); GPR54 (receptor KISS1; KISS1R; GPR54; HOT7T175; AXOR12); ASPHD1 (dominio aspartato beta-hidroxilasa que contiene 1; LOC253982); Tirosinasa (TYR; OCAIA; OCA1A; tirosinasa; SHEP3); TMEM118 (proteína del dedo anular, transmembrana 2; RNFT2; FLJ14627); GPR172A (receptor acoplado a proteínas G 172A; GPCR41; FLJ11856; D15Ertd747e); GPC3 (Glipicano 3); CLL1 (molécula 1 tipo lectina de Tipo C); B7-H4 (B7x; B7S1); RNF43 (Proteína del dedo anular 43); CD70; CXORF61 (Cromosoma X con marco abierto de lectura 61); HAVCR1; Epirregulina; Amfirregulina; EGFR ; EGFR-L858R; EGFR-L861Q; EGFR-G719A; EGFR-G719S; EGFR-G719C; EGFR-T790M; EGFR-S768I; adipofilina; AIM-2; ALDH1A1; alfa-actinina-4; alfa-fetoproteína; ARTC1; B-RAF; BAGE-1; BCLX (L); proteína de fusión BCR-ABL (b3a2); 8; CD45; Cdc27; CDK4; CDKN2A; CEA; CLPP; COA-1; CPSF; Cw6; ciclina D1; Ciclina-A1; proteína de fusión dek-can; DKK1; DR1; DR13; EFTUD2; Factor de Elongación 2; ENAH (hMena); EpCAM; EphA3; proteína de fusión ETV6-AML1; EZH2; FLT3-ITD; FN1; G250; MN; CAIX; GAGE-1;2;8; GAGE-3;4;5;6;7; glipicano-3; GnTVf; gp100 / Pmel17; GPNMB; HERV-K-MEL; hsp70-2; IDO1; IGF2B3; IL13Ralf2; Esterasa carboxilo intestinal; K-ras; Calicreína 4; KIF20A; KK-LC-1; KM-HN-1; LAGE-1; LDLR-fucosiltransferasa AS proteína de fusión; Lengsin; M-CSF; MAGE-A1; MAGE-A10; MAGE-A12; MAGE-A2; MAGE-A3; MAGE-A4; MAGE-A6; MAGE-A9; MAGE-C1; MAGE-C2; mamaglobina-A; MART2; MCSP; mdm-2; ME1; Melan-A / MART-1; Meloe; MMP-2; MMP-7; MUC1; MUC5AC; mucina; MUM-1f; MUM-2; MUM-3; Clase de miosina I; N-ras; NA88-A; neo-PAP; NFYC; NY-BR-1; NY-ESO-1/LAGE-2; OA1; OGT; OS-9; p53; PAP; PAX5; PBF; proteína de fusión pml-RARalfa; PRAME; PRDX5; PSMA; PTPRK; RAB38 / NY-MEL-1; RAGE-1; RBAF600; RGS5; RhoC; RNF43; RU2AS; SAGE; secernin 1; SIRT2; SNRPD1; SOX10; Sp17; SSX-2; SSX-4; STEAP1; survivina; proteína de fusión SYT-SSX1 o -SSX2; TAG-1; TAG-2; Telomerasa; TGF-betaRII; TRAG-3; Triosa fosfato isomerasa; TRP-1 / gp75; TRP-2; TRP2-INT2; tirosinasa; VEGF; WT1; XAGE-1b/GAGED2a; y SLC35D3. En algunas representaciones, el antígeno tumoral se selecciona de un grupo que consta de CD20, FcRH5, HER2, LYPD1, LY6G6D, PMEL17, LY6E, CD19, CD33, CD22, CD79A, CD79B, EDAR, GFRA1, MRP4, RET, Steap1, y TenB2.

En algunas representaciones, el antígeno tumoral es HER2 y el segundo dominio de unión comprende las siguientes seis RHV: (a) una RHV-H1 que consiste en la secuencia de aminoácidos con N.° de ID de SEC: 169; (b) una RHV-H2 que consiste en una secuencia

de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 170; (c) una RHV-H3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 171; (d) una RHV-L1 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 172; (e) una RHV-L2 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 173; y (f) una RHV-L3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.° de ID de SEC.: 174. En algunas representaciones, el segundo dominio de unión comprende (a) un dominio de VH que consta de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una identidad de secuencia del 95% con la secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 270; (b) un dominio de VL que consta de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una identidad de secuencia del 95% con la secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 271; o (c) un dominio de VH como en (a) y un dominio de VL como en (b). En algunas representaciones, el dominio de VH comprende la secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 270. En algunas representaciones, el dominio de VL comprende la secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 271.

En algunos casos, la invención presenta un anticuerpo anti-CD3, donde el anticuerpo anti-CD3 comprende un segundo dominio de unión que consta de: (a) un dominio de VH que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 270 y (b) un dominio de VL que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 271.

En otro caso, la invención presenta un anticuerpo anti-CD3, donde el anticuerpo anti-CD3 comprende un brazo anti-CD3 que contiene un primer dominio de unión, el cual consta de: (a) un dominio de VH que consiste de una secuencia de aminoácidos con N.° de ID de SEC.: 184 y (b) un dominio de VL que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 185, y un brazo anti-CD20 que comprende un segundo dominio de unión, el cual consta de: (a) un dominio de VH que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 266 y (b) un dominio de VL que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 267.

En otro caso, la invención presenta un anticuerpo anti-CD3, donde el anticuerpo anti-CD3 comprende un brazo anti-CD3 que contiene un primer dominio de unión, el cual consta de: (a) un dominio de VH que consiste de una secuencia de aminoácidos con N.° de ID de SEC.: 184 y (b) un dominio de VL que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 185, y un brazo anti-CD20 que comprende un segundo dominio de unión, el cual consta de: (a) un dominio de VH que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 266 y (b) un dominio de VL que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 267, en el cual el anticuerpo anti-CD3 contiene una mutación por sustitución de N297G.

En otro caso, la invención presenta un anticuerpo anti-CD3, donde el anticuerpo anti-CD3 comprende un brazo anti-CD3 que contiene un primer dominio de unión, el cual consta de: (a) un dominio de VH que consiste de una secuencia de aminoácidos con N.° de ID de SEC.: 184 y (b) un dominio de VL que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 185, y un brazo anti-CD20 que comprende un segundo dominio de unión,

el cual consta de: (a) un dominio de VH que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 266 y (b) un dominio de VL que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 267, donde (a) el brazo anti-CD3 comprende mutaciones por sustitución de T366S, L368A, Y407V y N297G y (b) el brazo anti-CD20 comprende mutaciones por sustitución de T366W y N297G.

En algunas versiones, cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 antes mencionados puede comprender uno o más dominios constantes de cadenas pesadas, donde el o los dominios constantes de cadenas pesadas son seleccionados de un primer dominio CH1 ($CH1_1$), un primer dominio CH2 ($CH2_1$), un primer dominio CH3 ($CH3_1$), un segundo dominio CH1 ($CH1_2$), un segundo dominio CH2 ($_2$) y un segundo dominio CH3 ($CH3_2$). En algunas versiones, al menos uno de los dominios constantes de cadenas pesadas está emparejado con otro dominio constante de cadenas pesadas. En algunas versiones, los dominios $CH3_1$ y $CH3_2$ comprenden una protuberancia o una cavidad, donde la protuberancia o cavidad en el dominio $CH3_1$ puede posicionarse en la cavidad o la protuberancia respectiva del dominio $CH3_2$. En algunas versiones, los dominios $CH3_1$ y $CH3_2$ se encuentran en una interfaz entre las mencionadas protuberancia y cavidad. En algunas versiones, los dominios $CH2_1$ y $CH2_2$ comprenden una protuberancia o una cavidad, donde la protuberancia o cavidad en el dominio $CH2_1$ puede posicionarse en la cavidad o la protuberancia respectiva del dominio $CH2_2$. En algunas versiones, los dominios $CH2_1$ y $CH2_2$ se encuentran en una interfaz entre las mencionadas protuberancia y cavidad.

En algunas versiones, la vida media de cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 antes mencionados puede ser de aproximadamente 7 días.

En algunas versiones, la invención presenta un inmunoconjugado que comprende cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 antes mencionados conjugado a un agente citotóxico. También se proporciona una composición que comprende cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 antes mencionados. En algunas versiones, la composición también comprende un portador, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptado. En algunas versiones, la composición es de carácter farmacéutico. En algunas versiones, la composición también comprende un antagonista de unión al eje PD-1 o un agente clínico adicional. En otro caso, la invención presenta un ácido nucleico aislado que codifica cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 que se revelan en el presente, y que comprende un vector (p. ej. un vector de expresión) para expresar el anticuerpo.

En otro caso, la invención presenta células anfitrionas que comprenden los ácidos nucleicos o vectores antes mencionados. En algunas versiones, la célula anfitriona es una célula mamífera (p. ej. una célula (CHO) del ovario de un hámster chino). En otras versiones, la célula anfitriona es una célula procariota (p. ej. una célula de *E. coli*). También se proporciona un método para producir cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 antes mencionados, cual método implica cultivar las células anfitrionas que producen el anticuerpo anti-CD3 y recuperar el anticuerpo anti-CD3 de la célula anfitriona o el medio de cultivo.

En algunos casos, cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 antes mencionados puede

utilizarse como medicamento. En algunas versiones, cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 puede utilizarse para tratar o dilatar la progresión de un trastorno proliferativo de células o de un trastorno autoinmunológico en un sujeto que requiera tal tratamiento. En algunas versiones, cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 puede utilizarse para mejorar la función inmunitaria de un sujeto que padezca un trastorno proliferativo de células o un trastorno autoinmunológico.

En algunos casos, la invención presenta el uso de cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 antes mencionados para fabricar un medicamento para tratar o dilatar la progresión de un trastorno proliferativo de células o un trastorno autoinmunológico. En algunos casos, la invención presenta el uso de cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 antes mencionados para fabricar un medicamento para mejorar la función inmunitaria de un sujeto que padece un trastorno proliferativo de células o un trastorno autoinmunológico.

Otro aspecto de la invención es un método para tratar o dilatar la progresión de un trastorno proliferativo de células o de un trastorno autoinmunológico en un paciente que requiera tal tratamiento. El método consiste en administrar al sujeto una cantidad efectiva de cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 antes mencionados. En otro caso, la invención presenta un método para mejorar la función inmunológica de un sujeto que padece un trastorno proliferativo de células o un trastorno autoinmunológico. El método consiste en administrar al sujeto cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 antes mencionados. En algunas versiones, el anticuerpo anti-CD3 se une a (a) una molécula CD3 ubicada en una célula efectora inmune Y (b) una segunda molécula biológica ubicada en una célula diana distinta de la célula efectora inmune. En algunas versiones, el anticuerpo anti-CD3 activa la célula efectora inmune luego de unirse a (a) y (b). En algunas versiones, la célula efectora inmune activada puede provocar un efecto citotóxico o un efecto apoptótico en la célula diana. En algunas versiones, el anticuerpo anti-CD3 se administra al sujeto en una dosis de entre 0,01 MG/KG y 10 mg/kg, aproximadamente. En algunas versiones, el anticuerpo anti-CD3 se administra al sujeto en una dosis de entre 0,1 mg/kg y 10 mg/kg, aproximadamente. En algunas versiones, el anticuerpo anti-CD3 se administra al sujeto en una dosis de alrededor de 1 mg/kg. En algunas versiones, el anticuerpo anti-CD3 es administrado por vía subcutánea, intravenosa, intramuscular, tópica, oral, transdérmica o intraperitoneal; por órbita, por implantación, por inhalación o por vía intratecal, intraventricular o intranasal. En algunas versiones, el anticuerpo anti-CD3 se administra por vía subcutánea. En algunas versiones, el anticuerpo anti-CD3 se administra por vía intravenosa.

En algunas versiones, el anticuerpo anti-CD3 comprende un brazo anti-HER2 que contiene una mutación por sustitución de N297G. En algunas versiones, el anticuerpo anti-CD3 comprende un brazo anti-CD3 que contiene una o varias mutaciones por sustitución de T366S, L368A, Y407V o N297G y un brazo anti-HER2 que contiene una o varias mutaciones por sustitución de N297G, N297A, L234A, L235A o D265A. En algunas representaciones, el anticuerpo comprende un brazo anti-CD3 que contiene una

mutación por sustitución de N297G. En algunas representaciones, el anticuerpo anti-CD3 comprende un brazo anti-HER2 que contiene mutacion(es) por sustitución de T366S, L368A, Y407V y/o N297G y un brazo anti-CD3 que contiene mutacion(es) por sustitución de N297G, N297A, L234A, L235A y/o D265A.

En algunas versiones, el método también implica administrar al paciente un glucocorticoide. En algunas versiones, el glucocorticoide es seleccionado de un grupo compuesto por dexametasona, hidrocortisona, cortisona, prednisolona, prednisona, metilprednisolona, triamcinolona, parametasona, betametasona, fludrocortisona y ésteres, sales y complejos de esos compuestos. En algunas versiones, el glucocorticoide es dexametasona. En algunas versiones, el glucocorticoide es un éster, una sal o un complejo de dexametasona farmacéuticamente aceptado.

En algunas versiones, el método también implica administrar rituximab al paciente.

En algunas versiones, el método también implica administrar obinutuzumab al paciente.

En algunas versiones, el método también implica administrar al paciente un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC por sus siglas en inglés).

En cualquiera de los usos o métodos mencionados anteriormente, el trastorno proliferativo de células puede ser cáncer. En algunas versiones, el cáncer es seleccionado del grupo que comprende cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón no microcítico, linfoma no Hodgkin (NHL por sus siglas en inglés), linfoma de células B, leucemia de células B, mieloma múltiple, cáncer renal, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer de cabeza y cuello, melanoma, cáncer de ovario, mesotelioma, gliobastoma, linfoma difuso de células B grandes, linfoma de células semejantes a la célula B activada, linfoma folicular, linfoma de células de manto, leucemia mieloide aguda, leucemia linfoide crónica, linfoma de zona marginal, leucemia linfocítica de célula pequeña, linfoma linfoplasmacítico, macroglobulinemia de Waldenstrom, linfoma del sistema nervioso central, linfoma de Burkitt, linfoma prolinfocítico de células B, linfoma esplénico de zona marginal, leucemia de células vellosas, linfoma o leucemia esplénico, linfoma esplénico difuso de linfocitos pequeños de pulpa roja, variante de leucemia de células vellosas, macroglobulinemia de waldenstrom, enfermedades de cadenas pesadas, enfermedad de cadenas alfa, enfermedad de cadenas gamma, enfermedad de cadenas mu, mieloma de células plasmáticas, plasmocitoma óseo solitario, plasmocitoma extraóseo, linfoma de tejido linfoide asociado a mucosa, linfoma de zona marginal nodal, linfoma de zona marginal nodal pediátrico, linfoma folicular pediátrico, linfoma primario cutáneo de células del centro folicular, linfoma de células grandes B rico en células T/ histiocitos, linfoma primario del sistema nervioso central, linfoma cutáneo primario, linfoma difuso de células B grandes positivo al virus de Epstein-Barr del anciano, linfoma difuso de células grandes asociado con inflamación crónica, granulomatosis linfomatoide, linfoma primario mediastinal de células B grandes, linfoma intravascular de células B grandes, linfoma anaplásico ALK positivo, linfoma plasmablástico, linfoma de células grandes B originado en enfermedad de Castleman asociado a HHV-8, linfoma de efusion primaria: linfoma de células B, inclasificable, con características intermedias entre

linfoma difuso de células B grandes y linfoma de Burkitt, y linfoma de células B, inclasificable, con características intermedias entre linfoma difuso de células B grandes y linfoma clásico de Hodgkin. En algunas versiones, el cáncer preferente es el linfoma de células B semejantes a las del centro germinal (GCB), linfoma de células semejantes a la célula B activada (ABC), linfoma folicular (FL), linfoma de células de manto (MCL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfoide crónica (CLL), linfoma de zona marginal (MZL), leucemia linfocítica de célula pequeña (SLL), linfoma linfoplasmacítico (LL), macroglobulinemia de Waldenstrom (WM), linfoma del sistema nervioso central (CNSL) o linfoma de Burkitt (BL).

En cualquiera de los usos o métodos mencionados anteriormente, el trastorno autoinmunológico puede ser seleccionado de un grupo compuesto por artritis reumatoide, artritis juvenil reumatoide, lupus sistémico eritomatoso (SLE), granulomatosis de Wegener, enfermedad inflamatoria intestinal, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), púrpura trombocitopénica trombótica (TTP), trombocitopenia autoinmune, esclerosis múltiple, psoriasis, nefropatía por IgA, polineuropatía asociada a IgM, miastenia gravis, vasculitis, diabetes mellitus, síndrome de Raynaud, síndrome de Sjögren, glomerulonefritis, neuromielitis óptica (NMO) y neuropatía igG.

En otro caso, la invención presenta un kit que contiene: (a) una composición que consta de cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 antes mencionados y (b) un paquete inserto que contiene instrucciones para administrar la composición a un paciente para tratar o dilatar la progresión de un trastorno proliferativo de células.

En cualquiera de los usos o métodos antes mencionados, el paciente puede ser un humano.

Descripción breve de los dibujos

La FIGURA 1 muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena simple de CD3EG humano con una secuencia enlace 26mero utilizado en experimentos de mapeo de epítopos de CD3 (N.° de ID de Sec.: 282).

La FIGURA 2A es una tabla que resume la caracterización de clones hibridoma selectos. La tabla resume los resultados del método ELISA de unión CD3 utilizando CD3ε^{1-27}-Fc de humano y de macaco; ensayos de unión de FACS utilizando células T jurkat humanas, PBMCs humanas y de macacos; experimentos de activación de células T utilizando análisis FACS, y experimentos de determinación de isotipos.

La FIGURA 2B es una tabla que resume las afinidades de unión (valores Kd) de clones hibridoma seleccionados para antígenos humanos CD3εγ comerciales.

La FIGURA 3A es una tabla que resume la caracterización de hibridomas selectos. La tabla resume los resultados del método ELISA de unión CD3 utilizando CD3ε^{1-27}-Fc de humano y de macaco; ensayos de unión de FACS utilizando células T jurkat humanas, PBMCs humanas y de macacos; experimentos de activación de células T utilizando

análisis FACS, y experimentos de determinación de isoptipos.

Las FIGURAS 3B y 3C son tablas que reducen las afinidades de unión (valores Kd) de clones hibridoma seleccionados.

La FIGURA 4A muestra las secuencias de aminoácidos de dominios variables de cadena ligera de los anticuerpos anti-CD3. Las secuencias HVR están delimitadas para las casillas designadas para cada anticuerpo.

La FIGURA 4B muestra las secuencias de aminoácidos de dominios variables de cadena ligera de los anticuerpos anti-CD3.

La FIGURA 4C muestra las secuencias de aminoácidos de dominios variables de cadena pesada de los anticuerpos anti-CD3.

La FIGURA 5A muestra las secuencias de aminoácidos de dominios variables de cadena ligera de los anticuerpos anti-CD3.

La FIGURA 5B muestra las secuencias de aminoácidos de dominios variables de cadena pesada de los anticuerpos anti-CD3.

La FIGURA 6A muestra las secuencias de aminoácidos de dominios variables de cadena ligera de los anticuerpos anti-CD3 21A9 y Rab17.

La FIGURA 6B muestra las secuencias de aminoácidos de dominios variables de cadena pesada de los anticuerpos anti-CD3 21A9 y Rab17.

La FIGURA 7 es una alineación de secuencias de dominios variables de cadena ligera (parte superior) y dominios variables de cadena pesada (parte inferior) de secuencias de aminoácidos de anticuerpos anti-CD3 que muestran la secuencia de consenso, 40G5c, derivada de los anticuerpos clónicos relacionados.

La FIGURA 8A es una alineación de secuencias de dominios variables de cadena ligera (parte superior) y dominios variables de cadena pesada (parte inferior) de secuencias de aminoácidos de anticuerpos anti-CD3 13A3 y una variante humanizada (hu13A3).

La FIGURA 8B es una alineación de secuencias de dominios variables de cadena ligera (parte superior) y dominios variables de cadena pesada (parte inferior) de secuencias de aminoácidos de anticuerpos anti-CD3 30A1 y una variante humanizada (hu30A1).

La FIGURA 8C es una alineación de secuencias de dominios variables de cadena ligera (parte superior) y dominios variables de cadena pesada (parte inferior) de secuencias de aminoácidos de anticuerpos anti-CD3 41D9a y una variante humanizada (hu41D9a).

La FIGURA 8D es una alineación de secuencias de dominios variables de cadena ligera (parte superior) y dominios variables de cadena pesada (parte inferior) de secuencias de aminoácidos de anticuerpos anti-CD3 SP34 y una variante humanizada (huSP34).

La FIGURA 8E es una alineación de secuencias de dominios variables de cadena ligera (parte superior) y dominios variables de cadena pesada (parte inferior) de secuencias de aminoácidos de anticuerpos anti-CD3 38E4 y una variante humanizada (hu38E4).

La FIGURA 8F es una alineación de secuencias de dominios variables de cadena ligera (parte superior) y dominios variables de cadena pesada (parte inferior) de secuencias de aminoácidos de anticuerpos anti-CD3 40G5 y una variante humanizada (hu40G5).

La FIGURA 9A es una tabla que resume las variantes humanizadas seleccionadas del

anticuerpo anti-CD3 13A3 y sus afinidades de unión, determinadas mediante el uso de CD3ε comercial (Creative Biomart, Shirley, NY; N.° de catálogo CD3E-2194H).

La FIGURA 9B es una tabla que resume las variantes humanizadas seleccionadas del anticuerpo anti-CD3 30A1 y sus afinidades de unión, determinadas mediante el uso de CD3ε comercial (Creative Biomart, Shirley, NY; N.° de catálogo CD3E-2194H).

La FIGURA 9C es una tabla que resume las variantes humanizadas seleccionadas del anticuerpo anti-CD3 41D9a y sus afinidades de unión, determinadas mediante el uso de CD3ε comercial (Creative Biomart, Shirley, NY; N.° de catálogo CD3E-2194H).

La FIGURA 9D es una tabla que resume las variantes humanizadas del anticuerpo anti-CD3 SP34 y sus afinidades de unión, determinadas mediante el uso de CD3ε comercial (Creative Biomart, Shirley, NY; N.° de catálogo CD3E-2194H).

La FIGURA 9E es una tabla que resume las variantes humanizadas seleccionadas del anticuerpo anti-CD3 38E4 y sus afinidades de unión, determinadas mediante el uso de CD3ε comercial (Creative Biomart, Shirley, NY; N.° de catálogo CD3E-2194H).

La FIGURA 9F es una tabla que resume las variantes humanizadas seleccionadas del anticuerpo anti-CD3 40G5c y sus afinidades de unión, determinadas mediante el uso de CD3ε comercial (Creative Biomart, Shirley, NY; N.° de catálogo CD3E-2194H).

La FIGURA 10 es una tabla que resume la afinidad de unión de los anticuerpos anti-CD3 humanizados para varios antígenos CD3ε.

La FIGURA 11 es una tabla que resume la afinidad de los anticuerpos anti-CD3 humanizados 38E4v1 a 38E4v9 y 40G5C, según mediciones Biacore con CD3εγ humano en chip y anticuerpos anti-CD3 en flujo continuo.

La FIGURA 12A es una tabla que resume las afinidades de unión relativas para mutaciones de alanina, serina, treonina o glutamato de los anticuerpos anti-CD3 38E4v1humanizados con una sola mutación en HVR-L3 o en HV3-H3, en comparación con 38E4v1 utilizando análisis kinético Biacore de siglo único o el convencional de ciclo múltiple.

La FIGURA 12B muestra las secuencias de aminoácidos HVR-L3 (parte superior) y HVR-H3 (parte inferior) del anticuerpo anti-CD3 humanizado 38E4v1.

La FIGURA 13A consiste en una serie de gráficos que muestran la unión relativa del anticuerpo anti-CD3 señalado con las variantes de alanina de $CD3\varepsilon^{1-27}$-Fc.

La FIGURA 13B es un gráfico que muestra la fracción relativa de mutantes fagémidos por barrido de alanina unidos a anticuerpos anti-CD3 38E4.v1, 40G5c y SP34.v52, en comparación con la unión de fago CD3εγ de tipo salvaje.

La FIGURA 13C consiste en una serie de gráficos que muestran la relativa afinidad de los anticuerpos anti-CD3 38E4.v1, 40G5c y SP34.v52 con mutantes fagémidos por barrido de alanina CD3εγ seleccionados como función de la concentración de fago.

La FIGURA 13D consiste en una serie de tablas que muestran las afinidades de unión relativas de los anticuerpos anti-CD3 SP34.v52 y 38E4v1 con mutantes CD3εγ por barrido de alanina, según las mediciones Biacore. NB = Unión no detectable.

La FIGURA 14A muestra la secuencia del polipéptido CD3ε 16mero utilizado en pruebas

de cocristalización con 38E4.v1 Fab.

Las FIGURAS 14B A 14F consisten en una serie de representaciones de la estructura cristalina que muestran diferentes panoramas respecto del complejo péptido hu38E4.v1 Fab/CD3ε.

La FIGURA 14G es una alineación de secuencias de dominios variables de cadena ligera (parte superior) y dominios variables de cadena pesada (parte inferior) de secuencias de aminoácidos de anticuerpos anti-CD3 hu40G5c y hu38E4.v1, con residuos de cada anticuerpo que son importantes para unir CD3 (residuos de contacto) en la alineación. Dichos residuos se encuentran dentro de 5 Å del péptido CD3, conforme se determinó por medio de análisis cristalográficos. Δ denota posiciones de vernier (como referencia consultar, p. ej. Foote and Winter. *JMB.* 224: 487, 1992); * denota intracciones FW-HVR (como referencia consultar, p. ej., Padlan et al. *Mol. Immunol*. 31: 169, 1994); * denota intracciones VH-VL (como referencia consultar, p. ej., Padlan et al. *Mol. Immunol*. 31: 169, 1994).

La FIGURA 14H es una representación de la estructura de cristal del polipéptido CD3ε unido por hu38E4.v1 Fab. Todos los residuos de contacto antígenos se muestran en amarillo. Todos los residuos de contacto son iguales entre hu38E4.v1 y hu40G5, excepto que G96 (marcado en naranja) es S96 en hu40G5.

Las FIGURAS 14I y 14J son representaciones de diagramas de Richardson de la estructura de cristal de hu38E4.v1 Fab y SP34v52 Fab, respectivamente, en la misma orientación, superpuestas con la región VL con un RMS = 2,24.

La FIGURA 14K es un modelo de relleno que representa el hu38E4.v1 Fab complejado con el péptido CD3ε N-terminal unido en la grieta entre las cadenas pesadas (cian) y ligeras (violeta).

La FIGURA 14L es un modelo de relleno que representa el SP34v52 con el péptido CD3ε N-terminal, superpuesto en la misma orientación que en el complejo CD3ε/hu38E4.v1 Fab descripto en la Figura 14K. Los residuos R50 Y R52 (en naranja) de HVR-H2 de SP34v52 Fab son importantes para la unión de CD3. Los choques claros del péptido CD3 con SP34v52 Fab se indican mediante flechas.

La FIGURA 14M es una representación de la estructura de cristal de hu38E4.v1 complejado con el péptido N-terminal de CD3εγ e ilustra las principales interacciones intermoleculares que intervienen en el primer residuo piroglutamina y el sexto residuo (E6) en CD3εγ. Las potenciales uniones de hidrógeno se muestran como líneas discontinuas.

La FIGURA 14N es un modelo de relleno que representa el hu38E4.v1 Fab complejado con el péptido CD3εγ N-terminal unido en la grieta entre las cadenas pesadas (cian) y ligeras (violeta). El quinto residuo (E5), como se ilustra, apunta al lado contrario del sitio interactivo que contiene el secto residuo (E6) del complejo péptido CD3εγ N-terminal y Fab.

La FIGURA 15 describe una generalización esquemática de la formación del anticuerpo TDB. El TDB particular que se describe se muestra como un TDB en toda su extensión en

formato botón en ojal, que puede tener una mutación por glicosilación si es producido por una célula eucariota (p. ej. una célula CHO). En un formato alternativo, es posible que el botón esté presente en el brazo anti-CD3, y es posible que el ojal esté presente en el brazo del antígeno anti-tumoral. También es posible que este formato posea una mutación por glicosilación, si se produjera por una célula eucariota (p. ej. una célula CHO).

La FIGURA 16 consta de gráficos que muestran los resultados FACS de ensayos de unión *in vitro* de distintos TDBs CD3/CD20 con diferentes combinaciones de brazos anti-CD3 de series UCHT1 y brazos anti-CD20 de series 2H7. A la izquierda, unión de línea celular Bjab (unión CD20). A la derecha, unión con células Jurkat (unión CD3).

La FIGURA 17 consta de un conjunto de tablas que resumen las afinidades de unión monovalentes (parte superior) y bivalentes como valores Kd para varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones brazos anti-CD3 de series UCHT1 y brazos anti-CD20 de series 2H7.

La FIGURA 18 consta de un gráfico que muestra los resultados de los ensayos de FACS de unión de células Jurkat *in vitro* (unión CD3) de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16.

La FIGURA 19 consta de un gráfico que muestra los resultados de los ensayos de FACS de unión de células Jurkat *in vitro* (unión CD3) de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16.

La FIGURA 20 consta de un gráfico que muestra los resultados de los ensayos de FACS de unión de células Bjab *in vitro* (unión CD20) de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16.

Las FIGURAS 21A y 21B constan de gráficos que muestran los resultados de los ensayos de FACS de unión de células Jurkat *in vitro* (unión CD3) de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16.

La FIGURA 21C es una tabla que resume la CE50 (µg/ml) para cada TDB CD3/CD20 probado en las Figuras 21A y 21B.

Las FIGURAS 22A y 22B constan de gráficos que muestran los resultados de los ensayos de FACS de unión de células Bjab *in vitro* (unión CD20) de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16.

La FIGURA 23 consta de un gráfico que muestra los resultados de los ensayos de FACS de unión de células Jurkat *in vitro* (unión CD3) de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16.

La FIGURA 24 es una tabla que resume las afinidades de unión de varios TDBs y Fabs CD3/CD20, según las mediciones realizadas mediante análisis Biacore con CD3εγ humano en chip y TDB o Fab CD3/CD20 en flujo constante.

La FIGURA 25A es un gráfico que muestra el porcentaje de activación de células T, según las mediciones de expresión de superficie de CD69 y CD25, luego de 24 de incubación de TDBs CD3/CD20 específicos (serie 2H7) con 20.000 células Bjab y células hu CD8+ T purificadas 5 veces.

La FIGURA 25B es un gráfico que muestra el porcentaje de destrucción de Bjab relativo al control sin tratamiento TDB, luego de 24 horas de incubación de TDBs CD3/CD20 específicos (serie 2H7) con 20.000 células Bjab y células hu CD8+ T purificadas 5 veces, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 26A es un gráfico que muestra el porcentaje de activación de células T, según las mediciones de expresión de superficie de CD69 y CD25, luego de 24 horas de incubación de TDBs CD3/CD20 específicos (serie 2H7) con 200.000 células PBMC humanas por pozo.

La FIGURA 26B es un gráfico que muestra el porcentaje de eliminación de células B endógenas relativo al control sin tratamiento TDB, luego de 24 horas de incubación de TDBs CD3/CD20 específicos (serie 2H7) con 200.000 células PBMC humanas por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 27A es un gráfico que muestra el porcentaje de activación de células T, según las mediciones de expresión de superficie de CD69 y CD25, luego de 24 horas de incubación de TDBs CD3/CD20 específicos (serie UCHT1) con 20.000 células Bjab y células hu CD8+ T purificadas 5 veces.

La FIGURA 27B es un gráfico que muestra el porcentaje de destrucción de Bjab relativo al control sin tratamiento TDB, luego de 24 horas de incubación de TDBs CD3/CD20 específicos (serie UCHT1) con 20.000 células Bjab y células hu CD8+ T purificadas 5 veces, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 28A es un gráfico que muestra el porcentaje de activación de células T, según las mediciones de expresión de superficie de CD69 y CD25, luego de 24 horas de incubación de TDBs CD3/CD20 específicos (serie UCHT1) con 200.000 células PBMC humanas por pozo.

La FIGURA 28B es un gráfico que muestra el porcentaje de eliminación de células B endógenas relativo al control sin tratamiento TDB, luego de 24 horas de incubación de TDBs CD3/CD20 específicos (serie UCHT1) con 200.000 células PBMC humanas por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 29A es un gráfico que muestra el porcentaje de eliminación de células B endógenas relativo al control sin tratamiento TDB, luego de 24 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #3) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 29B es un gráfico que muestra el porcentaje de eliminación de células B endógenas, según las mediciones de expresión de superficie de CD69 y CD25, luego de 24 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2h7V16, con 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #3) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 30A es un gráfico que muestra el porcentaje de eliminación de células B endógenas relativo al control sin tratamiento TDB, luego de 24 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo

anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #4) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 30B es un gráfico que muestra el porcentaje de eliminación de células B endógenas, según las mediciones de expresión de superficie de CD69 y CD25, luego de 24 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #4) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 31A es un gráfico que muestra el porcentaje de eliminación de células B endógenas relativo al control sin tratamiento TDB, luego de 24 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #2) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 31B es un gráfico que muestra el porcentaje de activación de células T, según las mediciones de expresión de superficie de CD69 y CD25, luego de 24 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC de macaco (aisladas del Donante #2) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 32A es un gráfico que muestra el porcentaje de eliminación de células B endógenas relativo al control sin tratamiento TDB, luego de 24 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC de macaco (aisladas del Donante #3) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 32B es un gráfico que muestra el porcentaje de activación de células T, según las mediciones de expresión de superficie de CD69 y CD25, luego de 24 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC de macaco (aisladas del Donante #3) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 33A es un gráfico que muestra el porcentaje de destrucción de Bjab relativo al control sin tratamiento TDB, luego de 24 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC de macaco por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 33B es un gráfico que muestra el porcentaje de activación de células T, según las mediciones de expresión de superficie de CD69 y CD25, luego de 24 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC de macaco por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 34A es un gráfico que muestra el porcentaje de eliminación de células B endógenas relativo al control sin tratamiento TDB, luego de 24 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #2) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 34B es un gráfico que muestra el porcentaje de activación de células T, según las mediciones de expresión de superficie de CD69 y CD25, luego de 24 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #2) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 35A es un gráfico que muestra el porcentaje de eliminación de células B endógenas relativo al control sin tratamiento TDB, luego de 24 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #3) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 35B es un gráfico que muestra el porcentaje de activación de células T, según las mediciones de expresión de superficie de CD69 y CD25, luego de 24 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #3) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 36A es un gráfico que muestra el porcentaje de eliminación de células B endógenas relativo al control sin tratamiento TDB, luego de 24 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #4) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 36B es un gráfico que muestra el porcentaje de activación de células T, según las mediciones de expresión de superficie de CD69 y CD25, luego de 24 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #4) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

Las FIGURAS 37A y 37B son gráficos que muestran el porcentaje de activación de células T, según las mediciones de expresión de superficie de CD69 y CD25, luego de 24 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #1) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 37C es una tabla que resume la activación CE50 (ng/ml) de células CD8+ T para cada TDB CD3/CD20 probado en las Figuras 37A y 37B.

Las FIGURAS 38A y 38B son gráficos que muestran el porcentaje de eliminación de células B endógenas relativo al control sin tratamiento TDB, luego de 24 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #1) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 38C es una tabla que resume la eliminación CE50 (ng/ml) de células B endógenas para cada TDB CD3/CD20 probado en las Figuras 38A y 38B.

Las FIGURAS 39A y 39B son gráficos que muestran el porcentaje de activación de células T, según las mediciones de expresión de superficie de CD69 y CD25, luego de 48 horas de

incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #1) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 39C es una tabla que resume la activación CE50 (ng/ml) de células CD8+ T para cada TDB CD3/CD20 probado en las Figuras 39A y 39B.

Las FIGURAS 40A y 40B son gráficos que muestran el porcentaje de eliminación de células B endógenas relativo al control sin tratamiento TDB, luego de 48 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #1) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 40C es una tabla que resume la eliminación CE50 (ng/ml) de células B endógenas para cada TDB CD3/CD20 probado en las Figuras 40A y 40B.

Las FIGURAS 41A y 41B son gráficos que muestran el porcentaje de activación de células T, según las mediciones de expresión de superficie de CD69 y CD25, luego de 24 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #2) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 41C es una tabla que resume la activación CE50 (ng/ml) de células CD8+ T para cada TDB CD3/CD20 probado en las Figuras 41A y 41B.

Las FIGURAS 42A y 42B son gráficos que muestran el porcentaje de eliminación de células B endógenas relativo al control sin tratamiento TDB, luego de 24 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #2) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 42C es una tabla que resume la eliminación CE50 (ng/ml) de células B endógenas para cada TDB CD3/CD20 probado en las Figuras 42A y 42B.

Las FIGURAS 43A y 43B son gráficos que muestran el porcentaje de activación de células T, según las mediciones de expresión de superficie de CD69 y CD25, luego de 48 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #2) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 43C es una tabla que resume la activación CE50 (ng/ml) de células CD8+ T para cada TDB CD3/CD20 probado en las Figuras 43A y 43B.

Las FIGURAS 44A y 44B son gráficos que muestran el porcentaje de eliminación de células B endógenas relativo al control sin tratamiento TDB, luego de 48 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #2) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 44C es una tabla que resume la eliminación CE50 (ng/ml) de células B endógenas para cada TDB CD3/CD20 probado en las Figuras 44A y 44B.

La FIGURA 45A es un gráfico que muestra que ciertos TDB CD3/CD20, como por ejemplo

uno que tiene un brazo anti-CD20 de 2H7v16 y un brazo anti-CD3 de 72H6, no presentan potencia *in vitro*, conforme a los ensayos de destrucción de Bjab.

Las FIGURA 45B y 45C son gráficos que muestran que ciertos TDB CD3/CD20, como por ejemplo uno que tiene un brazo anti-CD20 de 2H7v16 y un brazo anti-CD3 de 72H6, no presentan potencia *in vitro*, conforme a los ensayos de eliminación de células B endógenas (B) y a los ensayos de activación de células T (C).

La FIGURA 46A es un gráfico que muestra que ciertos TDB CD3/CD20, como por ejemplo uno que tiene un brazo anti-CD20 de 2H7v16 y un brazo anti-CD3 de 13A3, no presentan baja potencia *in vitro*, conforme a los ensayos de destrucción de Bjab.

La FIGURA 46B es un gráfico que muestra que ciertos TDB CD3/CD20, como por ejemplo uno que tiene un brazo anti-CD20 de 2H7v16 y un brazo anti-CD3 de 30A1, presentan baja potencia *in vitro*, conforme a los ensayos de destrucción de Bjab.

La FIGURA 46C es un gráfico que muestra que ciertos TDB CD3/CD20, como por ejemplo uno que tiene un brazo anti-CD20 de 2H7v16 y un brazo anti-CD3 de 41D9a, presentan baja potencia *in vitro*, conforme a los ensayos de destrucción de Bjab. Se muestran los valores de destrucción CE50 (ng/ml) de Bjab para cada TDB CD3/CD20 probado.

La FIGURA 46D es un gráfico que muestra que ciertos TDB CD3/CD20, como por ejemplo uno que tiene un brazo anti-CD20 de 2H7v16 y un brazo anti-CD3 de 41D9a, presentan baja potencia *in vitro*, conforme a los ensayos de eliminación de células B endógenas. Se muestran los valores de eliminación CE50 (ng/ml) de células B endógenas para cada TDB CD3/CD20 probado.

La FIGURA 46E es un gráfico que muestra que ciertos TDB CD3/CD20, como por ejemplo uno que tiene un brazo anti-CD20 de 2H7v16 y un brazo anti-CD3 de 41D9a, presentan baja potencia *in vitro*, conforme a los ensayos de activación de células T.

La FIGURA 47A es un gráfico que muestra que ciertos TDB CD3/CD20, como por ejemplo aquellos que tienen un brazo anti-CD20 de 2H7v16 y un brazo anti-CD3 de UCHT1v9, 21A9 y 40G5c, presentan gran potencia *in vitro*, conforme a los ensayos de eliminación de células B endógenas que utilizan 200.000 células PBMC (aisladas del Donante #1) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 47B es un gráfico que muestra que ciertos TDB CD3/CD20, como por ejemplo aquellos que tienen un brazo anti-CD20 de 2H7v16 y un brazo anti-CD3 de UCHT1v9, 21A9 y 40G5c, presentan gran potencia *in vitro*, conforme a los ensayos de activación de células T que utilizan 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #1) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 48A es un gráfico que muestra que ciertos TDB CD3/CD20, como por ejemplo aquellos que tienen un brazo anti-CD20 de 2H7v16 y un brazo anti-CD3 de UCHT1v9, 21A9 y 40G5c, presentan gran potencia *in vitro*, conforme a los ensayos de eliminación de células B endógenas que utilizan 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #2) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 48B es un gráfico que muestra que ciertos TDB CD3/CD20, como por ejemplo aquellos que tienen un brazo anti-CD20 de 2H7v16 y un brazo anti-CD3 de UCHT1v9,

21A9 y 40G5c, presentan gran potencia *in vitro*, conforme a los ensayos de activación de células T que utilizan 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #2) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 49 es una tabla que resume las potencias *in vitro* para distintos TDB CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16.

La FIGURA 50 muestra los dominios variables de cadena ligera (parte superior) y dominios variables de cadena pesada (parte inferior) de secuencias de aminoácidos de anticuerpos anti-CD20 2H7.v16.

La FIGURA 51 muestra los dominios variables de cadena ligera (parte superior) y dominios variables de cadena pesada (parte inferior) de secuencias de aminoácidos de anticuerpos anti-CD3 hu40G5c.

Las IMÁGENES 52A y 52B muestran que los TDB CD3/CD20 (40G5c/2H7v16) purificados no tienen una formación perceptible de agregados según lo determinado por la cromatografía de exclusión de tamaños (SEC) (A) y ninguna formación de homodímeros perceptibles (es decir, formación de anticuerpos CD3/CD3 o CD20/CD20) según lo evaluado por la espectometría de masas.

La FIGURA 53A es un gráfico que muestra la farmacocinética de las concentraciones séricas de los TDB CD3/CD20 en dosis variables en ratas Sprague Dawley (SD) a través del tiempo (en días), según la evaluación de farmacocinética genérica de inmunoglobulina (GRIP) o un ensayo específico.

LA FIGURA 53B es una tabla que resume los valores del margen cuantificado (ml/día/kg) de los anticuerpos TDB CD3/CD20 probados en cada dosis probada en la Figura 53A.

La FIGURA 54A es un gráfico que muestra que la sección F $(ab')_2$ de TDB CD20 retuvo la misma potencia que el TDB CD20 IgG de longitud completa en la destrucción de células B (muerte Bjab) *in vitro*. 20.000 células Bjab y 200.000 PBMC aislados de donantes sanos fueron incubados con varias concentraciones de TDB CD20 de longitud completa o TDB CD20 F (ab')2 durante 24 horas.

La FIGURA 54B es un gráfico que muestra que la actividad de la destrucción celular B de TDB CD20 es dependiente de células T, dado que no se detectó una matanza de células B con PBMC agotados de células T CD3+. 20.000 células Bjab y 200.000 PBMC aislados de donantes sanos o 200.000 PBMC agotados de células T CD3+ fueron incubadas con varias concentraciones de TDB CD20 durante 24 horas.

LA FIGURA 54C es un gráfico que muestra que la destrucción de células B comparable se puede lograr ya sea con células T CD4+ o CD8+ como efectores. 20.000 células Bjab y 100.000 células T CD8+ purificadas o células T CD4+ se incubaron con diversas concentraciones de TDB CD20 durante 24 horas. La destrucción celular y la activación de células marcadas como T CD69+CD25+ se midieron y calcularon como se describe a continuación.

La FIGURA 54D es un gráfico que muestra que TDB CD20 es capaz de activar células T CD4+ y CD8+. 20.000 células Bjab y 100.000 células T CD8+ purificadas o células T CD4+

se incubaron con diversas concentraciones de TDB CD20 durante 24 horas. La destrucción celular y la activación de células marcadas como T CD69+CD25+ se midieron y calcularon como se describe a continuación.

La FIGURA 54E es un gráfico que muestra que la sobrerregulación de granzima es más frecuente dentro de las células T CD8+ tras la adición de TDB CD20. 20.000 células Bjab y 100.000 células T CD8+ purificadas o células T CD4+ se incubaron con diversas concentraciones de TDB CD20 durante 24 horas. La inducción de la granzima B también se detectó por medio de FACS.

La FIGURA 54F es un gráfico que muestra que un mayor nivel de liberación de perforina está asociado con las células T CD8+ tras la adición de TDB CD20. 20.000 células Bjab y 100.000 células T CD8+ purificadas o células T CD4+ se incubaron con diversas concentraciones de TDB CD20 durante 24 horas. La concentración de perforina en los medios se midió con ELISA.

La FIGURA 55 es una serie de gráficos de citometría de flujo que muestran que las células T activadas son capaces de proliferar en la presencia de células TDB CD20 y Bjab.

La FIGURA 56A es una serie de gráficos que muestran las curvas de destrucción de células B con respuesta a dosis de líneas celulares de tumores/linfomas 8 B (izquierda) y los niveles de expresión de CD20 para líneas de células B dadas con un control de isotipo en gris, medido por FACS. Las células B se cultivaron en medios RPMI 1640 suplementados con FBS al 10 %. Para el ensayo de destrucción, 20.000 células B se incubaron con 200.000 PBMC aisladas de donantes saludables con varias concentraciones de TDB CD20 durante 24 horas.

La FIGURA 56B es un gráfico que muestra una amplia gama en la expresión media de CD20 en las líneas celulares 8 B probadas en la Figura 56A. Las células T CD4+ o T CD8+ purificadas a partir de sangre entera de donantes sanos y etiquetadas con CFSE se incubaron solas y únicamente con Bjab, con TDB CD20 solamente o con Bjab y TDB CD20 durante 24 horas primero y, a continuación, se lavaron las células y se pusieron en medios frescos durante otras 48 horas. La intensidad CFSE de las células T se detectó por FACS, al mostrar la proliferación de las células T sólo en presencia de Bjab y TDB CD20.

La FIGURA 56C es un conjunto de gráficos que muestran que TDB CD20 es potente en destruir todas las 8 líneas de una manera que depende de la dosis, con valores de EC50 de la destrucción de células B (ng/ml) (superior) y el porcentaje de destrucción de células B (parte inferior) representada como una función de la expresión de CD20 sobre la célula diana B.

La FIGURA 56D es un gráfico que muestra que TDB dirigidas a 5 antígenos de células B diferentes son comparables en la mediación de la destrucción de células T de las células Bjab. Las células B se cultivaron en medios RPMI 1640 suplementados con FBS al 10 %. Para el ensayo de destrucción, se incubaron 20.000 células con 100.000 células T CD8+ purificadas a partir de un donante sano con TDB CD20 (TDB A: 2H7v16/UCHT1v9) o una TDB orientada a un antígeno diferente de células B (es decir, TDB B-E, cada una dirigida a un antígeno de células B diferente) en una concentración de 1000 ng/ml durante 24

horas.

La FIGURA 56E es un gráfico que muestra la extensión de destrucción de células B para líneas de células tumorales de leucemia/linfomas 10 B. Las células B se cultivaron en medios RPMI 1640 suplementados con FBS al 10 %. Para el ensayo de destrucción, se incubaron 20.000 células B con 100.000 células T CD8+ purificadas de un donante sano con TDB CD20 de 1000 ng/ml (2H7v16/UCHT1v9) durante 24 horas.

La FIGURA 56F es un gráfico que muestra las curvas de destrucción de respuesta a la dosis para 8 donantes aleatorios.

La FIGURA 56G es un gráfico del resumen del trazado para EC50 (izquierda) y el alcance de la destrucción de células B (derecha) con anticuerpos de 1000 ng/ml en un ensayo de 24 horas para 30 donantes.

La FIGURA 56H es un conjunto de gráficos que muestran que el grado de destrucción de células B en 24 horas por TDB CD20 es muy comparable o mayor que la destrucción de células B por scFv CD19. Para la eliminación de células B autólogas, 200.000 PBMC aisladas de donantes sanos fueron incubadas durante 24 horas con TDB CD20 en la concentración indicada. La muerte celular notificada se calculó como se describe a continuación.

La FIGURA 56I es un conjunto de gráficos que muestran que el grado de destrucción de células B en 24 horas por TDB CD20 es muy comparable o mayor que la destrucción de células B por CD19-TDB o CD22-TDB (panel superior) o CD79a o CD79b (panel inferior). Para la destrucción de células B autólogas, 200.000 PBMC aisladas de donantes sanos fueron incubadas con 40.000 células BJAB durante 24 horas con TDB CD20, CD19, CD22, CD79a o CD 79b en la concentración indicada. La muerte celular notificada se calculó como se describe a continuación.

La FIGURA 57A es una serie de gráficos que muestran los valores relativos de expresión para $CD3_{\varepsilon}$ humano detectado en células T CD4+ (panel izquierdo) y células T CD8+ (panel central); y CD20 humano en células B CD19+ (panel derecho) detectado en un ratón (mu) o PBMC humanos (hu) medido por FACS. Los PBMC de ratones se obtuvieron de la sangre de ratones transgénicos dobles huCD3/huCD20; se obtuvieron PBMC humanos a partir de sangre de donantes sanos.

La FIGURA 57B es un gráfico que muestra que TDB CD20 no puede captar células T murinas para disminuir las células B sin expresión de CD3 humano en ratones transgénicos con CD20 humano. Los ratones transgénicos huCD20 o ratones transgénicos dobles huCD20/CD3 se trataron una vez por vía intravenosa con anticuerpos como se indica (10 mg/kg para rituximab, 0,5 mg/kg para TDB CD20 y TDB HER2). Se recogieron bazos de ratón en D7 (7 días después del tratamiento con anticuerpos). El anticuerpo rituximab CD20 antihumano se utilizó como un control positivo. TDB CD3/HER2 se utiliza como un control de isotipo negativo.

La FIGURA 57C es un gráfico que muestra que TDB CD20 no puede captar células T murinas que expresan huCD3 en ratones transgénicos doble con CD3/CD20 humanos para disminuir potencialmente las células B con expresión de huCD20. Los ratones

transgénicos CD20 o ratones transgénicos dobles huCD20/huCD20 se trataron una vez por vía intravenosa con anticuerpos como se indica (10 mg/kg para rituximab, 0,5 mg/kg para TDB CD3 y TDB HER2). Se recogieron bazos de ratón en D7 (7 días después del tratamiento con anticuerpos). TDB CD3/HER2 se utiliza como un control de isotipo negativo.

La FIGURA 58A es una serie de gráficos de un estudio de curso temporal que muestran que el tratamiento con TDB CD20 resultó en la disminución sostenida de células B hasta D15 (15 días después de la dosificación). Se trataron una vez ratones transgénicos dobles huCD20/huCD3 por vía intravenosa con varias dosis de TDB CD20. Se recolectó sangre de ratón (D1, D8 y D15).

La FIGURA 58B es un gráfico que muestra que la disminución de células B en el bazo de ratón casi completa sólo se logró en D7 después de una sola dosis de 0,5 mg/kg, mientras que una dosis más baja de 0,05 mg/kg sólo dio lugar a la disminución parcial de células B del bazo. Los ratones doble transgénicos huCD20/CD3 fueron tratados una vez por vía intravenosa con diversas dosis de TDB CD20. Se recolectaron bazos (D7).

La FIGURA 58C es un gráfico que muestra que la disminución de células B robusta en D7 se observa en la circulación de los ratones transgénicos dobles huCD3/huCD20 tratados con TDB CD20. Los ratones doble transgénicos huCD20/huCD3 se trataron una vez por vía intravenosa con 0,5 mg/kg de TDB CD20. Se recolectó sangre en D0-5 min. (5 minutos después del tratamiento), D0-2h, D0-8h, D1, D2, D3, y D7. Las células B que expresan huCD20 se midieron con FACS.

La FIGURA 58D es una serie de gráficos que muestran la activación de células T en los ratones doble transgénicos huCD3/huCD20 tratados con un TDB CD20. Los ratones doble transgénicos huCD3/huCD20 tratados exhibieron hasta un aumento del 80 % en $CD3_{\varepsilon}$ humano que expresa el recuento de células T CD8+ a las 2 horas de posteriores al tratamiento con TDB CD20, lo que regresó a nivel básico de D2 y D7 (panel superior). Del mismo modo, $CD3_{\varepsilon}$ humano que expresa las células T CD4+ se incrementó en un 80 % 2 horas después del tratamiento con TDB CD20 y posteriormente regresó al nivel base de D2. Los ratones doble transgénicos huCD3/huCD20 se trataron una vez por vía intravenosa con 0,5 mg/kg de TDB CD20. Se recolectó sangre en D0-5 min. (5 minutos después del tratamiento), D0-2h, D0-8h, D1, D2, D3, y D7. Las células T CD4+ y CD8+ que expresan $CD3_{\varepsilon}$ se midieron con FACS.

La FIGURA 59A es una serie de gráficos de citometría de flujo que muestran que TDB CD20 reduce las células B de la zona marginal (MZB) tan eficientemente como las células B foliculares (FOB) después de la administración de TDB a los ratones doble transgénicos huCD3/huCD20. Dos animales doble transgénicos (paneles de la izquierda y derecha, respectivamente) se trataron con vehículos (paneles superiores) o una dosis intravenosa única de TDB de 0,5 mg/kg (paneles inferiores). Se recolectaron vasos de ratones en D7 y se analizaron con FACS.

La FIGURA 59B-59E es una serie de gráficos que muestran que TDB CD20 reduce células B de la zona marginal (MZB) (B) de forma tan eficiente como las células B foliculares

(FOB) (C) después de una dosis intravenosa única de TDB de 0,5 mg/kg, junto con la activación de las células T CD8+ (D) y la proliferación de las células T CD8+ (E) en el bazo en los momentos indicados. Se recolectaron bazos de ratones en D1, D2, D3, D5, D7 y D14.

La FIGURA 60A es un gráfico que muestra que los ratones humanizados NSG tratados con 3 dosis semanales de TDB CD20 en 0,5 m/kg (ajuste de dosis repetidas) exhibieron niveles escasos de células B en la sangre en D7, con células B casi no detectadas en D21. Los ratones humanizados NSG se trataron con 3 dosis semanales de TDB CD20 de 0,5 mg/kg por vía intravenosa. Se recolectó sangre en D-5 (5 días antes del tratamiento), D7, D14 y D21. Los recuentos de células B murinas en sangre se midieron con FACS.

La FIGURA 60B es un gráfico que muestra que la disminución robusta de células B en D21 se observó en el bazo de ratones humanizados NSG tratados con TDB CD20. Los ratones humanizados NSG se trataron con 3 dosis semanales de 0,5 mg/kg de TDB CD20 por vía intravenosa. Se recolectaron bazos en D21. Los recuentos de células B murinas en el bazo se midieron con FACS.

La FIGURA 60C es una serie de gráficos de citometría de flujo que muestran que las células T huCD8 + proliferan y que las células B huCD19+ disminuyen 7 días después del tratamiento (D7) de ratones humanizados NSG con TDB CD20. Los ratones humanizados NSG se trataron con vehículos o TDB CD20 de 0,5mg/kg (2H7v16/UCHT1v9). Los bazos de control y los ratones humanizados NSG tratados con TDB CD20 se recogieron en D7. Las células B que expresan huCD19 y células T que expresan huCD19 y huCD8 se midieron con FACS.

La FIGURA 60D es un gráfico que muestra que los ratones humanizados NSG tratados con 3 dosis semanales de TDB CD20 en 0,5 mg/kg (ajuste de dosis repetida) mostraron un aumento de hasta 10 veces el recuento de células T CD8+ en D7, que regresó al nivel básico o inferior en D14 y D21. Los ratones humanizados NSG se trataron con 3 dosis semanales de 0,5 mg/kg de TDB CD20 por vía intravenosa. Se recolectó sangre en D-5 (5 días antes del tratamiento), D7, D14 y D21. Los recuentos de células T murinas CD8+ en sangre y la activación de células T se midieron con FACS.

La FIGURA 60E es una serie de gráficos de citometría de flujo que muestra los niveles basales de células B huCD20+ (paneles centrales) y células T huCD8+ y huCD4+ (paneles de la derecha) de 2 ratones humanizados NSG, según se mide con FACS.

La FIGURA 60F es una serie de gráficos que muestran los niveles de expresión en la superficie celular de huCD3$_{\varepsilon}$ y la expresión de CD20 en las células B CD19+ (izquierda), las células T CD8+ (centro) y las células T CD4+ (derecha) detectadas por FACS. La FIGURA 61A es un gráfico que muestra que TDB CD20 es potente en la eliminación de las células B de la CLL con células T autólogas. Se incubaron 200.000 PBMC con diversas concentraciones de TDB CD20 durante 48 horas en medios RPMI suplementados con FBS al 10 %.

Figura 61B es un gráfico que muestra que TDB CD20 es potente en la inducción de la activación de células T autólogas en presencia de las células B de CLL. Se incubaron

200.000 PBMC con diversas concentraciones de TDB CD20 durante 48 horas en medios RPMI suplementados con FBS al 10 %.

La FIGURA 61C es un conjunto de gráficos que muestran que el recuento de células T es altamente correlativo con la destrucción de células B de CLL *ex vivo*. Se incubaron 200.000 PBMC con TDB CD20 de 1000 ng/ml durante 48 horas, ya sea solos o con células T CD8+ agregadas purificadas de donantes sanos. El porcentaje de células B CD19+CD5+ y células T CD8+ en los PBMC de LLC son de 90/0,55 para la muestra A1645, 76/3,5 para A1957, 87/0,63 para A1978, 69/1,3 para A1980. La destrucción celular, la inducción de granzima B y la activación de células T se midieron con FACS como se describe a continuación.

La FIGURA 62A es un conjunto de gráficos que muestran que la activación de células T (izquierda) después de posologías de TDB CD20 de 0,1 mg/kg o 0,5 mg/kg a los ratones NSG con células de leucemia de CLL injertadas correlacionadas con la disminución notable de células B de CLL injertadas (derecha).

La FIGURA 62B es un conjunto de imágenes de inmunohistoquímica de secciones del bazo de ratones NSG con células de leucemia de CLL injertadas que muestra que pueden detectarse pocas células B después del tratamiento con TDB CD20. Se injertaron células B y células T en ratones NSG como se describe a continuación. Los ratones se trataron una vez por vía intravenosa con TDB HER2 y rituximab en 0,5 mg/kg, TDB CD20 en 0,1 y 0,5 mg/kg y los bazos se recogieron para el análisis con FACS 14 días después del tratamiento.

La FIGURA 63 es un gráfico que muestra el volumen del tumor adaptado con el paso del tiempo de tumores injertados de Bjab de ratones SCID para el Grupo 1 (vehículo: 20 mM de histidina/acetato a pH 5,5, 240 mM de sacarosa, Tween 20 al 0,02 %); Grupo 2 (TDB CD20: 2H7v114/UCHT1.v9; 0,5 mg/kg); Grupo 3 (vehículo: 20 mM de histidina/acetato a pH 5,5, 240 mM de sacarosa, Tween 20 al 0,02 %, PBMC); y Grupo 4 (TDB CD20: CD20 2H7v114/CD3 UCHT1.v9; 0,5 mg/kg, PBMC). Las células efectoras derivaban del PBMC de un donante humano sano. Los ratones se trataron una vez por semana durante dos semanas.

La FIGURA 64A es un gráfico que muestra el nivel relativo de expresión de CD20 en células BJAB, NALM-6, SC-1 y OCI-LY 19. Se injertaron células B y células T en ratones NSG como se describe a continuación. Los ratones se trataron una vez por vía intravenosa con TDB HER2 y rituximab en 0,5 mg/kg, TDB CD20 en 0,1 y 0,5 mg/kg y los bazos se recogieron para el análisis con IHC 14 días después del tratamiento.

La FIGURA 64B es un gráfico que muestra que rituximab y TDB CD20 son comparables en su eficacia para destruir células BJAB *in vitro*, que expresan un alto nivel de CD20 en su superficie celular. Se agotaron las células B en los PBMC aislados de donantes sanos y se utilizaron como células efectoras en el ensayo de destrucción celular in vitro. 20.000 células B y 200.000 células efectoras se incubaron con diversas concentraciones de TDB CD20 durante 24 horas. La expresión TDB CD20 se detectó con FACS.

La FIGURA 64C es un gráfico que muestra que TDB CD20, pero no rituximab, es capaz de

destruir las células NALM-6, SC-1 y OCI-LY 19 que tienen niveles relativamente bajos de CD20 en su superficie celular. Se agotaron las células B en los PBMC aislados de donantes sanos y se utilizaron como células efectoras en el ensayo de destrucción celular in vitro. 20.000 células B y 200.000 células efectoras se incubaron con diversas concentraciones de TDB CD20 durante 24 horas. La expresión TDB CD20 se detectó con FACS.

La FIGURA 64D es un gráfico que muestra los niveles de expresión de la superficie de las células B del antígeno CD20 desbloqueado como una función de la concentración de Rituximab-DANA, según se mide con FACS. Los ratones CD20/CD3 doble transgénicos se trataron con una dosis única de vehículo o Rituximab-DANA (10mg/kg). Los bazos se cultivaron 5 días después del tratamiento.

Las FIGURAS 65A y 65B son gráficos que muestran que TDB CD20 está activo en la eliminación de células B *in vitro* en presencia de altos niveles de rituximab (A) o dexametasona (B). Los 200.000 PBMC aislados de donantes sanos se incubaron primero con rituximab-DANA en la concentración indicada durante 1 hora y luego se añadió TDB CD20 y se incubó durante 24 horas. Para el ensayo con dexametasona, las células se trataron previamente con 1μM de dexametasona durante la noche antes de añadir TDB CD20. La destrucción celular notificada se calculó como se describe a continuación.

La FIGURA 66 es un conjunto de gráficos que muestran que TDB CD20 está activo en células B en agotamiento en la sangre (izquierda) y el bazo (derecha) en ratones pretratados con rituximab-DANA. Para el tratamiento con un agente único, los ratones doble transgénicos huCD20/CD3 se trataron una vez por vía intravenosa con la dosis indicada; para el tratamiento de combinación, los ratones se trataron primero por vía intravenosa con rituximab-DANA y se inyectó TDB CD20 por vía intravenosa 30 minutos más tarde. Se recolectó sangre en D-7, D0-2h (2 horas después del tratamiento con TDB) y D7; se recogieron los bazos en D7. Los recuentos de células B se midieron con FACS como se describe a continuación.

La FIGURA 67A es un conjunto de gráficos que muestran el recuento de células B (izquierda), células T CD4+ (medio) y células T CD8+ (derecha) en muestras de sangre de 3 monos cynomolgus antes y 7 días después del tratamiento con una sola dosis intravenosa de TDB CD20 de 1 mg/kg. Se trataron tres monos cynomolgus una vez por vía intravenosa con TDB CD20 de 1mg/kg. La sangre se recogió en D-7 (7 días antes de la dosis), D0-4hr (4 horas después de la dosis) y D7.

La FIGURA 67B es un conjunto de gráficos que muestran las células B, células T CD4+ y los niveles de células T CD8+ en el bazo (izquierda), los ganglios linfáticos mandibulares (medio) y los ganglios linfáticos mesentéricos (derecha) de 3 monos cynomolgus 7 días después del tratamiento con una sola dosis intravenosa de TDB CD20 de 1 mg/kg. Se trataron tres monos cynomolgus una vez por vía intravenosa con TDB CD20 de 1mg/kg. La sangre se recogió en D-7 (7 días antes de la dosis), D0-4hr (4 horas después de la dosis) y D7.

La FIGURA 67C es un conjunto de gráficos que muestran las células B, células T CD4+ y los niveles de células T CD8+ en el bazo (izquierda), los ganglios linfáticos mandibulares

(medio) y los ganglios linfáticos mesentéricos (derecha) de 3 monos cynomolgus antes del tratamiento con una sola dosis intravenosa de TDB CD20 de 1 mg/kg. Se trataron tres monos cynomolgus una vez por vía intravenosa con TDB CD20 de 1mg/kg. La sangre se recogió en D-7 (7 días antes de la dosis), D0-4hr (4 horas después de la dosis) y D7.

La FIGURA 67D es un conjunto de gráficos que muestran los niveles basales de las células B y las células T CD4+ y CD8+ como un porcentaje de linfocitos totales detectados en el bazo (izquierda) y los ganglios linfáticos mandibulares (derecha) en animales tratados con control de vehículo.

La FIGURA 68A es un conjunto de gráficos que muestran la concentración sérica de TDB CD20 a partir de muestras de sangre y de suero recogidas de cuatro monos cynomolgus que se trataron 4 veces por semana con TDB CD20 de 1mg/kg por vía intravenosa.

La FIGURA 68B es un conjunto de gráficos que muestran la concentración de TDB CD20 a partir de muestras de suero tomadas de animales descritos en las Figuras 65 y 66A. Se graficó el s.d. ± medio.

La FIGURA 69A es un histograma que muestra la expresión de la expresión de PD-L1 en células A20-huCD20 de ratones singénicos A20-huCD20 Balb/C, según lo evaluado por una citometría de flujo.

La FIGURA 69B es un gráfico que muestra el volumen del tumor en relación con el tiempo para el Grupo 1 (vehículo); Grupo 2 (TDB CD20 a 0,5 mg/kg); Grupo 3 (anticuerpo anti-PD-L1 en 10 mg/kg); y el Grupo 4 (TDB CD20 en 0,5 mg/kg + anticuerpo anti-PD-L1).

La FIGURA 70 es un gráfico que muestra las curvas de unión para cada una de las tres TBD FcRH5 evaluadas para la unión *in vitro* a células T que CD8+ con expresión CD3.

La FIGURA 71A es un gráfico que muestra el porcentaje de la destrucción de células diana MOLP-2 como una función de la concentración de TDB FcRH5 con células T CD8+ purificadas a partir de PBMC humanos desde el Donante N. ° 1.

La FIGURA 71B es un gráfico que muestra el porcentaje de la destrucción de células diana MOLP-2 como una función de la concentración de TDB FcRH5 con células T CD8+ purificadas a partir de PBMC humanos desde el Donante N. ° 2.

La FIGURA 72A es un gráfico que muestra el porcentaje de células CD8+CD69+T como función de concentración TDB de FcRH5, como se evalúa con un análisis FACS. Las células eran MOLP-2, y las células CD8+T se purificaron del Donante N. ° 1.

La FIGURA 72B es un gráfico que muestra el porcentaje de células CD8+CD107a+T como función de concentración TDB de FcRH5, como se evalúa con un análisis FACS. Las células eran MOLP-2, y las células CD8+T se purificaron del Donante N. ° 1.

La FIGURA 72C es un gráfico que muestra el porcentaje de células CD8+CD69+T como función de concentración TDB de FcRH5, como se evalúa con un análisis FACS. Las células eran MOLP-2, y las células CD8+T se purificaron del Donante N. ° 2.

La FIGURA 72D es un gráfico que muestra el porcentaje de células CD8+CD107a+T como una función de concentración TDB de FcRH5, como se evalúa con una análisis FACS. Las

células diana eran MOLP-2, y las células CD8+T se purificaron del Donante n.° 2.

La FIGURA 73 es un grupo de gráficos que muestran las curvas de unión para cada uno de los tres TDB de HER2 que se analizaron para la unión *in vitro* con células SKBR3 que expresan Her2 (superior) y las células T que expresan CD8+ CD3 (inferior).

La FIGURA 74A es un gráfico que indica las curvas de unión para trastuzumab (bivalente), trastuzumab (Fab) y TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5) (biespecífico) para unión *in vitro* con células SKBR3 que expresan HER2.

La FIGURA 74B es un gráfico que indica el porcentaje de células SKBR3 viables como una función para la concentración de trastuzumab (bivalente), trastuzumab (Fab) y TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5) (biespecífico), como se evalúa con el Ensayo de viabilidad celular luminiscente CELLTITERGLO®.

La FIGURA 74C es un gráfico que indica el porcentaje de muertes de células diana SKBR mediado por citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC) en presencia de trastuzumab (T-mab), trastuzumab producido en *E. coli* (T-mab *E. coli*), y TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5), como se evalúa con la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) de las células lisadas.

La FIGURA 75 es un gráfico que indica el porcentaje de muertes de células diana SKBR3 como una función de la concentración de TDB de HER2 (hu4D5-TDB, hu4D5.91A-TDB y hu4D5.Y100A-TDB).

La FIGURA 76A es una serie de paneles. El panel superior es un modelo de la estructura de cristal de la unión de dominio extracelular de HER2 (ECD, por su sigla en inglés) por hu4D5 Fab (Trastuzumab), 2C4 Fab (Pertuzumab) y 7C2. El panel inferior es una estructura de lazo de la unión de $CD3_{\varepsilon}$ por 2C11, 38E4v1 y 40G5c.

La FIGURA 76B es una tabla que indica las afinidades de unión y se representan con la constante de disociación K_D (nM), de TDB de HER2 para tres grupos HER2 diferentes: hu4D5, 2C4 y 7C2. El panel inferior derecho es una tabla que indica las afinidades de unión y se representan con la constante de disociación K_D (nM), de TDB de HER2 para tres grupos $CD3_{\varepsilon}$ diferentes: 38E4v1, 40G5c, y 2C11.

La FIGURA 76C es un gráfico que indica el porcentaje de muertes de células diana MCF7 que expresan HER2 como una función de la concentración TDB de HER2 (hu4D5-TDB, 2C4-TDB y 7C2-TDB). Se midió la citotoxicidad con la liberación del lactato deshidrogenasa (LDH).

La FIGURA 77 es un gráfico que indica que los grupos HER2 hu4D5 y 2C4 son fuertes mediadores de la muerte celular como expone el porcentaje máximo de muerte de células diana SKBR3 logrado con el tratamiento con las siguientes variedades TDB de HER2: hu4D5-38E4v1, hu4D5-40G5c, 2C4-38E4v1, 2C4-40G5c, 7C2-38E4v1, y 7C2-40G5c.

La FIGURA 78 es una serie de gráficos que indican la potencia de las variantes TDB de HER2 para matar líneas celulares SKBR3 que expresan HER2 (izquierda) y MCF7 que expresan HER2 (derecha) de forma dosis dependiente, con valores CE50 de muerte de células diana (pM). La FIGURA 79 es una serie de gráficos que indican el porcentaje de

muerte de células diana SKBR3 que expresan HER2 para varios TDB con grupos HER2 (hu4D5, 2C4 y 7C2) emparejados con grupos CD3 con afinidad alta (38E4v1) o baja (40G5c) como una función de la concentración TDB (ng/ml).

La FIGURA 80 es una serie de paneles. El panel de la izquierda indica la potencia de las variantes TDB de HER2 (hu4D5-38E4v1, 2C4-38E4v1, 7C2-38E4v1; hu4D5-40G5c, 2C4-40G5c, 7C2-40G5c) para matar líneas celulares SKBR3 que expresan HER2 y MCF7 que expresan HER2 de forma dosis dependiente, con valores CE50 de muerte de células diana (pM). El panel de la derecha es una tabla con la proporción de CE50 de las variantes TDB de HER2 dadas en células diana MCF7 en comparación con SKBR3 para tres experimentos.

La FIGURA 81 es una serie de paneles. El panel superior muestra una tabla que enumera las variantes del grupo HER2 hu4D5 (hu4D5v7, hu4D5v5, hu4D5v10, hu4D5v31, hu4D5.Y100A) para TDB de HER2 (grupo CD3 40G5c) y el correspondiente CE50 (ng/ml) para la muerte de células diana SKBR3, afinidad de unión HER2 (K_D, nM) además de la proporción de la afinidad de unión K_D de HER2 y el CE50 de muerte de células diana SKBR3 para las variantes hu4D5 relativas a hu4D5. El panel inferior es un gráfico que indica la correlación entre la proporción CE50 SKBR3 para las variantes TDB de hu4D5 HER2 (hu4D5, hu4D5v7, hu4D5v5, hu4D5v10 y hu4D5v31) y la proporción K_D relativa para las variantes TDB de HER2 hu4D5.

La FIGURA 82 es una serie de gráficos que indican el porcentaje de muerte de células diana SKBR3 y MCF7 como una función de la concentración de las siguientes variantes TDB de HER2: hu4D5-40G5c (superior izquierda), hu4D5v7-40G5c (superior centro), hu4D5v5-40G5c (superior derecha), hu4D5v10-40G5c (inferior izquierda), hu4D5v31-40G5c (inferior centro), hu4D5.Y100A-40G5c (inferior derecha).

La FIGURA 83 es una serie de gráficos. El gráfico a la izquierda indica el porcentaje de muerte de células diana como una función de la concentración (µg/ml) de los anticuerpos monoespecíficos bivalentes bloqueantes de HER2 específicos para el grupo designado HER2 del TDB de HER2. (Anticuerpos bloqueantes de HER2: anticuerpos monoespecíficos bivalentes para hu4D5, 2C4 y 7C2. TDB de HER2: hu4D5-40G5c, 2C4-40G5c y 7C2-38E4v1 con concentraciones fijas: 10 ng/ml). El gráfico de la derecha muestra el porcentaje de células viables como una función de la concentración de anticuerpo HER2 (hu4D5) trastuzumab en presencia y ausencia de TDB de HER2 hu4D5-40G5c.

La FIGURA 84 es una serie de paneles. El panel superior es una tabla que muestra la reactividad de las variantes del grupo HER2 con HER2 como se midió con varios ensayos de unión junto con la reactividad de los clones HER2 con el anticuerpo hu4D5 trastuzumab. El panel inferior es un gráfico que muestra el porcentaje de muerte de células diana como una función de la concentración (pM) de Fab biespecífico HER2 para ciertos clones (hu4D5, 3H4 y 2H11). Se incluyen los valores CE50 para cada clon en pM.

La FIGURA 85 es una tabla que indica la información de afinidad y reactividad para las variantes del grupo CD3 TDB de HER2 (38E4v1, 38E4, SP34, 40G5c y 2C11).

La FIGURA 86 es un gráfico que indica la muerte de células diana CT26 que expresan HER2 como una función de concentración (ng/ml) de variantes TDB de HER2 (hu4D5-2C11, hu4D5-SP34, 7C2-2C11 y 2C4-2C11). Células efectoras: Células T derivadas de TG CD3

La FIGURA 87A es un gráfico que indica el volumen del tumor (mm^3) medido con el paso del tiempo (0 a 5 días) en animales administrados con vehículo o TDB de HER2 (0,5 mg/kg).

La FIGURA 87B es una serie de gráficos. El gráfico superior izquierdo muestra el porcentaje de las células CD45+ periféricas por 5 células detectadas el día 6 después del tratamiento con vehículo o TDB de HER2 (0,5 mg/kg). El gráfico superior derecho muestra el porcentaje de las células CD45+ periféricas que son células CD8+ detectadas el día 6 después del tratamiento con vehículo o TDB de HER2 (0,5 mg/kg). El gráfico inferior izquierdo muestra el porcentaje de las células CD45+ periféricas que son células CD4+ detectadas el día 6 después del tratamiento con vehículo o TDB de HER2 (0,5 mg/kg). El gráfico inferior derecho muestra el porcentaje de las células CD8+ periféricas que son células IFN+ detectadas el día 6 después del tratamiento con vehículo o TDB de HER2 (0,5 mg/kg).

La FIGURA 88A es una serie de gráficos. El gráfico superior muestra un gráfico de cascada del cambio porcentual en el volumen del tumor en animales administrados con variante del vehículo o TDB de HER2 (hu4D5-SP34 o hu4D5-2C11; 0,5 mg/kg; IV, semanal, 5 semanas). El gráfico inferior muestra un gráfico de cascada del cambio porcentual en el volumen del tumor en animales administrados con variante de TDB de HER2 (2C4-38E4; 0,5 mg/kg; IV, semanal, 5 semanas).

La FIGURA 88B es una serie de gráficos. El gráfico superior muestra el volumen del tumor como un porcentaje del volumen basal en función del tiempo (días) para animales administrados con vehículo o TDB de HER2 (hu4D5-SP34). El gráfico inferior muestra el volumen del tumor como un porcentaje del volumen basal en función del tiempo (días) para animales administrados con vehículo o TDB de HER2 (hu4D5-2C11). (TDB de HER2: 0,5 mg/kg; IV, semanal, 5 semanas).

La FIGURA 89 es un gráfico que indica el porcentaje de células CD8+CD107a+ T como una función de la concentración TDB de HER2 (hu4D5-TDB, hu4D5.91A-TDB y hu4D5.Y100A-TDB) hu4D5, como se evalúa en el análisis FACS. Las células diana eran células SKBR3; las células efectoras eran células CD8+ T; proporción de células efectoras: células diana = 3:1.

La FIGURA 90A es un gráfico que indica el porcentaje de muertes de células diana SKBR3 como una función de la concentración TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5 y SP34/hu4D5).

La FIGURA 90B es un gráfico que indica el porcentaje de muertes de células diana SKBR3 como una función de la concentración TDB de HER2 (SP34/hu4D5, 38E4c/hu4D5 y 40G5c/hu4D5).

La FIGURA 90C es un gráfico que indica el porcentaje de muertes de células diana SKBR3 como una función de la concentración TDB de HER2 (SP34/hu4D5, 38E4c/hu4D5 y

40G5c/hu4D5).

La FIGURA 91A es un gráfico que indica la curva de unión para cada una de las tres TDB de HER2 (SP34/hu4D5, 38E4c/hu4D5 y 40G5c/hu4D5) que se analizaron para unión *in vitro* con células T que expresan CD8+ CD3, como se evaluó con el análisis FACS.

La FIGURA 91B es un gráfico que indica el porcentaje de células CD8+CD69+ T como una función de la concentración TDB de HER2 (SP34/hu4D5, 38E4c/hu4D5 y 40G5c/hu4D5).

La FIGURA 92A es un gráfico que indica la curva de unión para las dos TDB de HER2 (38E4c/hu4D5 y 38E4/hu4D5) que se analizaron para unión *in vitro* con células T que expresan CD8+ CD3, como se evaluó con el análisis FACS.

La FIGURA 92B es un gráfico que indica la curva de unión para las dos TDB de HER2 (38E4c/hu4D5 y 38E4/hu4D5) que se analizaron para unión *in vitro* con células SKBR3 que expresan HER2, como se evaluó con el análisis FACS.

La FIGURA 92C es un gráfico que indica el porcentaje de muertes de células diana SKBR3 como una función de la concentración TDB de HER2 (38E4c/hu4D5 y 38E4/hu4D5), como se evaluó con el análisis FACS. Las células efectoras eran células CD8+ T humanas; proporción de células efectoras: células diana = 3:1.

La FIGURA 92D es un gráfico que indica el porcentaje de células CD8+CD69+ T como una función de la concentración TDB de HER2 (38E4c/hu4D5 y 38E4/hu4D5).

La FIGURA 93A es un gráfico que muestra el porcentaje de células CD8+CD69+Granzima B+ T como una función de concentración TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5), como se evalúa con una análisis FACS. Las células diana eran células SKBR3; las células efectoras eran células CD8+ T; proporción de células efectoras: células diana = 3:1.

La FIGURA 93B es una serie de gráficos que indican la exocitosis de los gránulos de células diana mediada por células T TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5) que se detecta con ELISA para perforina y granzimas A y B, y el porcentaje de muerte de células diana como se evalúa por la liberación de LDH. Las células diana eran células SKBR3; las células efectoras eran células PBMC; proporción de células efectoras: células diana = 30:1.

La FIGURA 93C es una serie de gráficos que indican la apoptosis de las células diana medida por células T TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5) como se mide con las actividades caspasa 3 y 7 en el Ensayo CASPASE-GLO® 3/7, apoptosis en un Ensayo de detección de muerte celular con ELISA^{plus} y liberación de LDH. Las células diana eran células SKBR3; las células efectoras eran células PBMC; proporción células efectoras: células diana = 10:1.

La FIGURA 93D es una imagen de Western blot (superior) que indica la expresión de HER2 en células 3T3 transfectadas y un gráfico (inferior) que indica el porcentaje de muerte de células diana por células T activadas como una función de concentración TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5), como se mide por la liberación de LDH. Las células diana eran Vector 3T3 y HER2 3T3; las células efectoras eran células PBMC; proporción de células efectoras: células diana = 10:1.

La FIGURA 93E es una gráfico que indica el porcentaje de muerte de células diana BT474 como una función de concentración TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5) en presencia de

trastuzumab Fab (T-Fab) o dominio extracelular HER2 soluble (ECD), como se evalúa por la liberación de LDH. Las células efectoras eran células CD8+ T; proporción de células efectoras: células diana = 5:1.

La FIGURA 93F es un gráfico que indica el porcentaje de muerte de células diana SKBR3 como una función de concentración TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5) después del agotamiento de las células CD3+ de la población celular efectora PBMC. Proporción de células efectoras: células diana = 20:1.

La FIGURA 94A es una serie de gráficos que indican el porcentaje de células CD8+CD69+ T (izquierda) y células CD8+CD107a+ T (centro) como una función de concentración TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5), como se evalúa con un análisis FACS, y el porcentaje de muerte de células diana SKBR3 como una función de concentración TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5) (derecha). Las células diana eran células SKBR3; las células efectoras eran células CD8+ T; proporción de células efectoras: células diana = 3:1.

La FIGURA 94B es una serie de gráficos que indican el porcentaje de muerte de células diana BT474 como una función de concentración TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5) (izquierda) y el porcentaje de células CD8+CD69+granzimasB+ T como una función de concentración TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5) (derecha), como se evalúa con un análisis FACS. Las células diana eran células BT474; las células efectoras eran células CD8+ T; proporción de células efectoras: células diana como se indica.

La FIGURA 95A es una serie de histogramas que muestra la expresión de CFSE en células CD8+ T en presencia de células diana SKBR3 o TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5).

La FIGURA 95B es un gráfico que muestra el cambio en veces del número de células CD8+ como una función sobre el tiempo posterior a la incubación con células diana SKBR3 y TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5), como se evalúa en un análisis FACS.

La FIGURA 95C es una serie de gráficos que muestra el cambio en veces del número de células CD8+ como una función sobre el tiempo posterior a la incubación con células diana SKBR3, TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5), y 20 ng/ml de IL-2, como se evalúa en un análisis FACS.

La FIGURA 96A es una imagen de Western blot que indica el nivel de expresión de HER2 en un panel de líneas celulares tumorales humanas.

La FIGURA 96B es un gráfico que muestra el porcentaje de muerte de células diana como una función de concentración TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5), como se evalúa por la liberación de LDH. Las células diana eran células BJAB, MDA435, MDA231, MCF7, MDA453, SKBR3 y BT474; las células efectoras eran células PBMC; proporción de células efectoras: células diana = 25:1.

La FIGURA 96C es un gráfico que muestra el porcentaje de muerte de células diana como una función de concentración TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5), como se evalúa con un análisis FACS. Las células diana eran células MCF7 y SKBR3; las células efectoras eran células PBMC; proporción de células efectoras: células diana = 20:1.

La FIGURA 96D es un gráfico que muestra el porcentaje de muerte de células diana como una función de concentración TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5), como se evalúa con un

análisis FACS. Las células diana eran células BJAB y SKBR3; las células efectoras eran células PBMC; proporción de células efectoras: células diana = 20:1.

La FIGURA 96E es un tabla que presenta el número de copia de HER2 para un panel de células diana y para cada una, el CE50 TDB de HER2 y porcentaje de ocupación de HER2 en esa concentración. Las células diana son MDA435, MDA231, MCF7, MDA453, BT474, y SKBR3.

La FIGURA 97A es un gráfico que muestra el porcentaje de muerte de células diana como una función de concentración TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5), como se evalúa por la liberación de LDH. Las células diana eran células SKBR3, HCC1569, KPL4, HCC202, JIMT1 y CALU3; las células efectoras eran células PBMC; proporción de células efectoras: células diana = 10:1.

La FIGURA 97B es un gráfico que indica el porcentaje de células diana viables como una función para la concentración de trastuzumab emtansina (T-DM1), como se evalúa con el Ensayo de viabilidad celular luminiscente CELLTITERGLO®. Las células diana eran BT474-M1 parenterales y BT474-M1 T-DM1 resistentes; las células efectoras eran células CD8+ T; proporción de células efectoras: células diana = 3:1.

La FIGURA 97C es un gráfico que muestra el porcentaje de células diana viables como concentración TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5), como se evalúa con una análisis FACS. Las células diana eran BT474-M1 parenterales y BT474-M1 T-DM1 resistentes; las células efectoras eran células CD8+ T; proporción de células efectoras: células diana = 3:1.

La FIGURA 98 es un gráfico y una tabla que muestran la farmacocinética (PK) TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5) en ratas Sprague-Dawley, como se evalúa con ELISA.

La FIGURA 99A es un gráfico que indica el volumen relativo del tumor con el paso del tiempo para el Grupo 1 (Vehículo a 0,5 mg/kg); Grupo 2 (PBMC(1) + vehículo a 0,5 mg/kg); Grupo 3 (PBMC(1) + TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5) a 0;5 mg/kg); Grupo 4 (PBMC(2) + vehículo a 0,5 mg/kg); y Grupo 5 (PBMC(2) + TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5) a 0,5 mg/kg).

La FIGURA 99B es un gráfico que indica el porcentaje de cambio en el volumen del tumor con el paso del tiempo para el Grupo 1 (Vehículo a 0,5 mg/kg); y Grupo 2 (TDB de HER2 (hu4D5/2C11) a 0,5 mg/kg).

La FIGURA 99C es un gráfico que indica el porcentaje de cambio relativo en el volumen del tumor con el paso del tiempo para el Grupo 1 (Vehículo a 0,5 mg/kg); y Grupo 2 (TDB de HER2 (hu4D5/2C11) a 0,5 mg/kg).

La FIGURA 99D es un gráfico que indica el volumen relativo del tumor con el paso del tiempo para el Grupo 1 (Vehículo a 0,5 mg/kg); y Grupo 2 (TDB de HER2 (hu4D5/2C11) a 0,5 mg/kg). Los participantes incluían tumores que eran >1000 mm^3 al comienzo del tratamiento.

La FIGURA 99E es un gráfico que indica el porcentaje de cambio en el volumen del tumor con el paso del tiempo para el Grupo 1 (TDB de HER2 controlado por el grupo CD3 (hu4D5/SP34) a 0,5 mg/kg); y el Grupo 2 (TDB de control (2C11) a 0,5 mg/kg).

La FIGURA 99F es un gráfico que indica el volumen relativo del tumor con el paso del tiempo para el Grupo 1 (Vehículo a 0,5 mg/kg); y Grupo 2 (TDB de HER2 (hu4D5/SP34) a 0,5 mg/kg).

La FIGURA 99G es un gráfico que indica el volumen relativo del tumor con el paso del tiempo para el Grupo 1 (Vehículo a 0,5 mg/kg); Grupo 2 (TDB de HER2 (hu4D5/2C11) a 0,5 mg/kg); Grupo 3 (TDB de control (2C11) a 0,5 mg/kg); y Grupo 4 (T-DM1 a 15 mg/kg).

La FIGURA 100A es un gráfico que indica el volumen relativo del tumor con el paso del tiempo para el Grupo 1 (Sin tratamiento); Grupo 2 (TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5) a 0,5 mg/kg).

La FIGURA 100B es un gráfico que indica el volumen relativo del tumor con el paso del tiempo para el Grupo 1 (Vehículo a 0,5 mg/kg); Grupo 2 (PBMC(3) + Vehículo a 0,5 mg/kg); y Grupo 3 (PBMC(3) + TDB de control (2C11) a 0,5 mg/kg).

La FIGURA 101A es un gráfico que indica la afinidad de unión para el anticuerpo CD3-UCHT1 evaluado para unión *in vitro* al CD3 humano en células T humanas, células T TG CD3 y células T BALB/c, como se evalúa en el análisis FACS.

La FIGURA 101B es un gráfico que indica la afinidad de unión para el anticuerpo CD3-2C11 evaluado para unión *in vitro* al CD3 de ratones en células T TG CD3 y células T BALB/c, como se evalúa en el análisis FACS.

La FIGURA 102A es un gráfico que muestra el porcentaje de muerte de células diana CT26-HER2 como una función de concentración TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5), como se evalúa con una análisis FACS. Las células efectoras eran células T aisladas de sangre humana periférica, células esplénicas transgénicas huCD3 y células T esplénicas BALB/c.

La FIGURA 102B es un gráfico que muestra el porcentaje de muerte de células diana CT26-HER2 como una función de concentración TDB de HER2 (hu4D5/2C11), como se evalúa con una análisis FACS. Las células efectoras eran células T aisladas de sangre humana periférica, células esplénicas transgénicas huCD3 y células T esplénicas BALB/c.

La FIGURA 103 es un gráfico que indica el volumen relativo del tumor con el paso del tiempo para el Grupo 1 (Vehículo a 0,5 mg/kg); y Grupo 2 (TDB de HER2 (hu4D5/SP34) a 0,5 mg/kg).

La FIGURA 104 es un gráfico que muestra las curvas de unión para cada una de las tres TBD de LYPD1 evaluadas para unión *in vitro* a células T que expresan CD8+ CD3.

La FIGURA 105 es un gráfico que indica el porcentaje de muerte de células diana OVCAR3.Luc como una función de la concentración TDB de LYPD1.

La FIGURA 106 es un gráfico que muestra el porcentaje de células CD8+CD69+ (izquierda) y CD8+CD25+ (derecha) T como una función de concentración TDB de LYPD1, como se evalúa con un análisis FACS. Las células diana eran células OVCAR3.Luc; proporción de células efectoras: células diana = 3:1.

La FIGURA 107 muestra las secuencias de aminoácidos del dominio variable (superior) de la cadena liviana y el dominio variable (inferior) de la cadena pesada del anticuerpo anti RET 41205.v6.

La FIGURA 108A es un gráfico que muestra el volumen del tumor (mm^3) como una función del tiempo (días) para el Grupo 1 (vehículo, qwx3, IV; n=9); el Grupo 2 (CD20 TDB (2H7-mu2C11), 0,5 mg/kg, qwx3, IV; n=9); el Grupo 3 (anti-PD1 (mu8F11 DANA), 10 mg/kg, tiwx3, IP; n=9) y el Grupo 4 (anti-PD1 (mu8F11 DANA), 10 mg/kg, tiwx3, IP; CD20 TDB (2H7-mu2C11), 0,5 mg/kg, qwx3, IV; n=9).

La FIGURA 108B es un gráfico que muestra el volumen del tumor (mm^3) como una función del tiempo (días) para el Grupo 1 (vehículo, qwx3, IV; n=9); el Grupo 2 (CD20 TDB (2H7-mu2C11), 0,5 mg/kg, qwx3, IV; n=9); el Grupo 3 (anti-PD1 (mu8F11 DANA), 10 mg/kg, tiwx3, IP; n=9) y el Grupo 4 (anti-PD1 (mu8F11 DANA), 10 mg/kg, tiwx3, IP+ CD20 TDB (2H7-mu2C11), 0,5 mg/kg, qwx3, IV; n=9). La línea sólida en negrita representa el volumen ajustado del tumor para el grupo especificado.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS VERSIONES DE LA INVENCIÓN

I. DEFINICIONES

El término “alrededor de” a partir del presente se refiere al rango de error normal para el valor respectivo de fácil conocimiento para las personas entrenadas en el campo técnico. La referencia a “alrededor de” para un valor o parámetro a partir del presente incluye (y describe) las versiones que se relacionan directamente a ese valor o parámetro en sí.

Para los propósitos del presente, un “marco humano de selector” es un marco que comprende la secuencia de aminoácidos de un marco de dominio variable (VL) de una cadena ligera o un marco de dominio variable (VH) de una cadena pesada que se deriva del marco de inmunoglobulina humana o un marco de consenso humano, como se define a continuación. Un marco humano de selector “que se deriva” de un marco de inmunoglobuna humana o un marco de consenso humano incluye la misma secuencia de aminoácidos que estos, o puede contener cambios en la secuencia de aminoácidos. En algunas versiones, el número de cambios en los aminoácidos es de 10 o menos, 9 o menos, 8 o menos, 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos, o 2 o menos. En algunas versiones, el marco humano de selector VL tiene una secuencia idéntica al marco de inmunoglubina humana VL o al marco de consenso humano VL.

La afinidad se refiere a la concentración de la suma total de las interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de la molécula (p. ej., un anticuerpo) y su par de unión (p. ej., un antígeno). A menos que se indique lo contrario, a partir del presente, “afinidad de unión” hace referencia a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre los miembros de un par de unión (p. ej. anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su par Y puede representarse generalmente con la constante de disociación (Kd). La afinidad puede medirse mediante métodos comunes conocidos en la materia, incluidos aquellos que se describen en el presente. Las representaciones ilustrativas y ejemplares específicas para medir la afinidad de la unión se describen a continuación.

Un anticuerpo “madurado por afinidad” hace referencia a un anticuerpo con una o más alteraciones en una o más regiones hipervariables (HVR), en comparación con un anticuerpo principal que no posee dichas alteraciones, alteraciones que generan una mejora en la afinidad del anticuerpo para el antígeno.

Los términos “anticuerpo contra CD3” y “un anticuerpo que se une a CD3” hacen referencia a un anticuerpo que es capaz de unirse a CD3 con la afinidad suficiente para que el anticuerpo resulte útil como agente de diagnóstico o terapéutico a la hora de dirigirse a CD3. En una representación, el grado de unión de un anticuerpo contra CD3 a una proteína no relacionada distinta de CD3 es menos de aproximadamente el 10% de la unión del anticuerpo a CD3 según la medición, p. ej.: mediante un ensayo de radioinmunología (RIA). En determinadas representaciones, un anticuerpo que se une a CD3 tiene una constante de disociación (Kd) de ≤1μM, ≤100 nM, ≤10 nM, ≤1 nM, ≤0.1 nM, ≤0.01 nM, o ≤0.001 nM (p. ej.: 10^{-8} M o menos, p. ej.: de 10^{-8} M a 10^{-13} M, p. ej.: de 10^{-9} M a 10^{-13} M). En determinadas representaciones, un anticuerpo contra CD3 se une a un epítopo de CD3 que se conserva entre CD3 de distintas especies.

El término “anticuerpo” se utiliza en el presente en el sentido más amplio y abarca varias estructuras de anticuerpos, incluidos entre otros los anticuerpos monoclonales, los anticuerpos policlonales, los anticuerpos multiespecíficos (p. ej.: anticuerpos biespecíficos) y los fragmentos de anticuerpos siempre y cuando exhiban la actividad deseada de unión al antígeno.

Un “fragmento de anticuerpo” hace referencia a una molécula distinta a un anticuerpo intacto que abarca una porción de un anticuerpo intacto que se une al antígeno al cual se une el anticuerpo intacto. Algunos ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen entre otros a los siguientes: Fv, Fab, Fab’, Fab’-SH, $F(ab')_2$; diacuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpos de cadena única (p. ej.: scFv) y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

Por “dominio de unión” se implica una parte de un compuesto o una molécula que se une de manera específica a un epítopo, antígeno, ligando o receptor objetivo. Los dominios de unión incluyen entre otros a anticuerpos (p. ej.: monoclonales, policlonales, recombinantes, humanizados y quiméricos), fragmentos de anticuerpos o porciones de ellos (p. ej.: fragmentos de Fab, Fab’2, anticuerpos scFv, SMIP, anticuerpos de dominio, diacuerpos, minicuerpos, scFv-Fc, aficuerpos, nanocuerpos y dominios de anticuerpos VH o VL), receptores, ligandos, aptámeros y otras moléculas que tengan un colaborador de unión identificado.

Un “agente quimioterapéutico” es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen a los agentes alquilantes como la tiotepa y la ciclosfosfamida (CYTOXAN®); los sulfonatos de alquilo como el busulfán, el improsulfán y el piposulfán; las aziridinas como la benzodopa, la carboquona, la meturedopa y la uredopa; las etileniminas y metilamelaminas incluida la altretamina, la trietilenomelamina, la trietilenofosforamida, la trietilenotiofosforamida y la trimetilomelamina; las acetogeninas (especialmente la bullatacina y la bullatacinona); el

delta-9-tetrahidrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); la beta-lapachona; el lapachol; las colchicinas; el ácido betulínico; una camptotecina (incluido el análogo sintético topotecán (HYCAMTIN®), la CPT-11 (irinotecán, CAMPTOSAR®), la acetilcamptotecina, escopolectina y 9-aminocamptotecina); la brioestatina; la caliestatina; CC-1065 (incluidos sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); la podofilotoxina; el ácido podofilínico; la teniposida; las criptoficinas (especialmente la criptoficina 1 y la criptoficina 8); la dolastatina; la duocarmicina (incluidos los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); la eleuterobina; la pancratiestatina; una sarcodictina; la espongiestatina; las mostazas de nitrógeno como el clorambucil, la clornafazina, la clorofosfamida, la estramustina, la ifosfamida, la mecloretamina, el clorhidrato de óxido de mecloretamina, el melfalán, la novembicina, la fenesterina, la prednimustina, la trofosfamida, la mostaza de uracilo; las nitroso úreas como la carmustina, la clorozotocina, la fotemustina, la lomustina, la nimustina y la ranimnustina; los antibióticos como los antibióticos de enedina (p. ej.: la calicheamicina, especialmente la calicheamicina gamma 1I y la calicheamicina omega Il (consulte, p. ej.: Nicolaou y otros, *Angew. Chem Intl. Ed. Engl.*, 33: 183-186 (1994)); el CDP323, un inhibidor oral de la integrina alfa-4, la dinemicina, incluida la dinemicina A; una espiramicina, como también el cromóforo de neocarzinoestatina y los cromóforos de antibióticos de la cromoproteína enediína relacionados), las aclacinomisinas, la actinomicina, la autramicina, la azaserina, las bleomicinas, la cactinomicina, la carabacina, la caminomicina, la carzinofilina, las cromomicinas, la dactinomicina, la daunorubicina, la detorubicina, la 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, la doxorubicina (incluidas ADRIAMYCIN®, morfolino-doxorubicina, cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina, inyección de liposoma de clorhidrato de doxorubicina (DOXIL®), doxorubicina liposomal TLC D-99 (MYOCET®), doxorubicina liposomal peglilada (CAELYX®) y deoxidoxorubicina), la epirubicina, la esorubicina, la idarubicina, la marcelomicina, las mitomicinas como la mitomicina C, el ácido micofenólico, la nogalamicina, las olivomicinas, la peplomicina, la porfiromicina, la puromicina, la quelamicina, la rodorubicina, la estreptonigrina, la estreptozocina, la turbecidina, el ubenimex, la zinoestatina, la zorubicina; los antimetabolitos como el metotrexato, la gemcitabina (GEMZAR®), el tegafur (UFTORAL®), la capecitabina (XELODA®), una epotilona y el 5-fluorouracilo (5-FU); la combrestatina; los análogos de ácido fólico como la denopterina, el metotrexato, la pteropterina, el trimetrexato; los análogos de purina como la fludarabina, la 6-mercaptopurina, la tiamiprina, la tioguanina; los análogos de pirimidina como la ancitabina, la azacitidina, la 6-azauridina, el carmofuro, la citarabina, la dideoxiuridina, la doxifluridina, la enocitabina, la fluxoridina; los andrógenos como la calusterona, el propionato de dromostanolona, el epitiostanol, el mepitiostano, la testolactona; los antiadrenales como la aminoglutetimida, el mitotano, el trilostano; el reabastecedor de ácido fólico como el ácido frolínico, la aceglatona; el glicósido de aldofosfamida; el ácido aminolevulínico; el eniluracilo; la amsacrina; el bestrabucilo, el bisantreno; el edatraxato; la defofamina; la demecolcina; la diaziquona; el elformitina; el acetato de eliptinio; una epotilona; el

etoglúcido; el nitrato de galio; la hidroxiúrea; el lentinano; la lonidainina; los maitansinoides como la maitansina y las ansamitocinas; la mitoguazona; la mitoxantrona; el mopidanmol; la nitraerina; la pentoestatina; el fenamet, la pirarubicina; la losoxantrona; la 2-etilhidrazida; la procarbazina; el complejo de polisacáridos PSK® (JHS Natural Products, Eugene, Oreg.); el razoxano; la rizoxina; el sizofurano; el espirogermanio; el ácido tenuazónico; la triaziquona; la 2,2",2"-triclorotrietilamina; los tricotecenos (especialmente la toxina T-2, la verracurina A, la roridina A y la anguidina); el uretano; la vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®); la dacarbazina; la manomustina; el mitobronitol; el mitolactol; el pipobromán; la gacitosina; la arabinosida ("Ara-C"); la tiotepa; el taxoide, p. ej: el paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), la fórmula de nanopartículas de paclitaxel diseñadas a partir de la albúmina (ABRAXANE™) y el docetaxel (TAXOTERE®, Rhome-Poulene Rorer, Antony, Francia); el cloranbucilo; la 6-tioguanina; la mercaptopurina; el metotrexato; los agentes del platino como el cisplatino, el oxaliplatino (p. ej.: ELOXATIN®) y el carboplatino; las vincas, que evitan la polimerización de la tubulina de los microtúbulos en formación, incluida la vinblastina (VELBAN®), la vincristina (ONCOVIN®), la vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®) y la vinorelbina (NAVELBINE®); el etopósido (VP-16); la ifosfamida; la mitoxantrona; la leucovorina; la novantrona; el edatrexato; la daunomicina; la aminopterina; el ibandronato; el inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; la difluorometilornitina (DMFO); los retinoides como el ácido retinóico, incluido el bexaroteno (TARGRETIN®); los bisfosfonatos como el clodronato (por ejemplo, BONEFOS® u OSTAC®), el etidronato (DIDROCAL®), el NE-58095, el ácido zoledrónico/zoledronato (ZOMETA®), el alendronato (FOSAMAX®), el pamidronato (AREDIA®), el tiludronato (SKELID®) o el risedronato (ACTONEL®); la troxacitabina (un análogo de la citosina nucleósida 1,3-dioxolano); los oligonucleótidos antisentido, especialmente aquellos que inhiben la expresión de los genes que se encuentran en las rutas de señalización, implicados en la proliferación de células aberrantes, como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R) (p. ej.: el erlotinib (Tarceva™)); y el VEGF-A que reduce la proliferación celular; las vacunas como la vacuna THERATOPE® y las vacunas de terapias genéticas, por ejemplo, la vacuna ALLOVECTIN®, la vacuna LEUVECTIN® y la vacuna VAXID®; el inhibidor de la topoisomerasa 1 (p. ej.: LURTOTECAN®); el rmRH (p. ej.: ABARELIX®); el BAY439006 (sorafenib; Bayer); el SU-11248 (sunitinib, SUTENT®, Pfizer); la perifosina, el inhibidor de COX-2 (p. ej.: celecoxib o etoricoxib), el inhibidor del proteosoma (p. ej.: PS341); el bortezomib (VELCADE®); el CCI-779; el tipifarnib (R11577); el orafenib, el ABT510; el inhibidor de Bcl-2, como el sodio oblimersen (GENASENSE®); la pixantrona; los inhibidores de EGFR; los inhibidores de la tirosina quinasa; los inhibidores de la serina-treonina quinasa como la rapamicina (sirolimus, RAPAMUNE®); los inhibidores de la farnesiltransferasa como el lonafarnib (SCH 6636, SARASAR™) y las sales, los ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores que sean farmacéuticamente aceptables; como también las combinaciones de dos o más de los anteriores como el CHOP, una

abreviatura para un tratamiento combinado de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisolona; y FOLFOX, una abreviatura para un régimen de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATIN™) combinado con 5-FU y leucovorina, y las sales, los ácidos o los derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores, como también las combinaciones de dos o más de los anteriores.

Los agentes quimioterapéuticos como se definen en el presente incluyen a los "agentes antihormonales" o "terapéuticos endocrinos" que actúan para regular, reducir, bloquear o inhibir los efectos de las hormonas que pueden fomentar el crecimiento del cáncer. Puede tratarse de hormonas en sí mismas, incluidas entre otras: antiestrógenos y moduladores selectivos del receptor del estrógeno (SERM), incluidos, por ejemplo, el tamoxifeno (incluido el tamoxifeno NOLVADEX®), el raloxifeno, el droloxifeno, el 4-hidroxitamoxifeno, el trioxifeno, el keoxifeno, el LY117018, la onapristona y el FARESTON.cndot.toremifeno; los inhibidores de la aromatasa que inhiben la enzima aromatasa, que regula la producción de estrógeno en las glándulas de adrenalina, como, por ejemplo, los 4(5)-imidazoles, la aminoglutetimida, el acetato de megestrol MEGASE®, el exemestano AROMASIN®, el formestanio, el fadrozol, el vorozol RIVISOR®, el letrozol FEMARA® y el anastrozol ARIMIDEX®; y los antiandrógenos como la flutamida, la nilutamida, la bicalutamida, la leuprolida y la goserelina; como también la troxacitabina (un análogo de la citosina 1,3-dioxolano nucleósida); los oligonucleósidos antisentido, especialmente aquellos que inhiben la expresión de genes en las rutas de señalización implicadas en la proliferación de células aberrantes, como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf y H-Ras; las ribozimas como un inhibidor de la expresión de VEGF (p. ej.: ribozima ANGIOZYME®) y un inhibidor de la expresión de HER2; las vacunas como las vacunas de terapia genética, por ejemplo, la vacuna ALLOVECTIN®, la vacuna LEUVECTIN® y la vacuna VAXID®; PROLEUKIN® rIL-2; el inhibidor de la topoisomerasa 1 LURTOTECAN®; ABARELIX® rmRH; la vinorelbina y las espiramicinas (consulte la Pat. de los EE. UU. N.° 4,675,187), y las sales, los ácidos y los derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores; como también las combinaciones de dos o más de los anteriores.

El término anticuerpo "quimérico" hace referencia a un anticuerpo en el cual una porción de la cadena pesada o liviana se deriva de una fuente o especie en particular, mientras que el resto de la cadena pesada o liviana se deriva de una fuente o especie diferente.

El término "grupo de diferenciación 3" o "CD3", como se utiliza en el presente, hace referencia a cualquier CD3 nativo de cualquier fuente vertebrada, incluidos los mamíferos como los primates (p. ej.: humanos) y los roedores (p. ej.: ratones y ratas), a menos que se indique lo contrario, incluidas, por ejemplo, las cadenas CD3ε, CD3γ, CD3α y CD3β. El término abarca CD3 no procesados, de "longitud completa" (p. ej.: CD3ε o CD3γ no procesados o no modificados), como también cualquier forma de CD3 que surge como resultado del procesamiento en la célula. El término también abarca las variantes de CD3 de ocurrencia natural, incluidas, por ejemplo, las variantes de unión o las variantes alélicas. El CD3 incluye, por ejemplo, la proteína CD3ε humana (NCBI RefSeq

No. NP_000724), que tiene 207 aminoácidos de longitud y la proteína CD3γ humana (NCBI RefSeq No. NP_000064), que tiene 182 aminoácidos de longitud.

La "clase" de un anticuerpo hace referencia al tipo de dominio constante o región constante que posee su cadena pesada. Existen cinco clases principales de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), p. ej.: IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4, IgA_1 e IgA_2. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan α, δ, ε, γ y μ, respectivamente.

Se comprende que los aspectos y las representaciones de la invención descritos en el presente incluyen el "abarcamiento", "la consistencia", y la "consistencia esencialmente de" aspectos y representaciones.

El término "agente citotóxico" como se utiliza en el presente hace referencia a una sustancia que inhibe o evita la función celular o bien causa la muerte o destrucción celular. Los agentes citotóxicos incluyen, entre otros, a los isotopos radioactivos (p. ej.: At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32}, Pb^{212} y a los isotopos radioactivos de Lu); agentes o medicamentos quimioterapéuticos (p. ej.: metotrexato, adriamicina, alcaloides de vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorubicina, melfalán, mitomicina C, clorambucilo, daunorubicina u otros agentes interalantes); agentes inhibitorios del crecimiento; enzimas y fragmentos de los anteriores como enzimas nucleolíticas; antibióticos; toxinas como toxinas de moléculas pequeñas o toxinas enzimáticamente activas de origen bacterial, fúngico, vegetal o animal, incluidos fragmentos o variantes de las anteriores; y los varios agentes antitumorales o anticancerígenos divulgados a continuación.

Un "trastorno" es cualquier afección que se beneficiaría con el tratamiento, incluidos, entre otros, los trastornos o las enfermedades crónicas y agudas que incluyen a aquellas afecciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión.

Los términos "trastorno proliferativo celular" y "trastorno proliferativo" hacen referencia a trastornos que están relacionados con algún grado de proliferación celular anormal. En una representación, el trastorno proliferativo celular es cáncer. En una representación, el trastorno proliferativo celular es un tumor.

Los términos "cáncer" y "cancerígeno" hacen referencia a, o describen la afección fisiológica de los mamíferos que suele estar caracterizada por un crecimiento celular incontrolado. Algunos ejemplos de cánceres incluyen entre otros, al carcinoma, al linfoma, al blastoma, al sarcoma y a la leucemia o las malignidades linfáticas. Ejemplos más concretos de dichos cánceres incluyen, entre otros, al cáncer de células escamosas (*p. ej.:* cáncer de células escamosas epiteliales), al cáncer de pulmón, incluido el cáncer de pulmón de células pequeñas, al cáncer de pulmon de células no pequeñas, al adenocarcinoma de pulmón y al carcinoma escamoso de pulmón, al cáncer peritoneal, al cáncer hepatocelular, al cáncer gástrico o de estómago, que incluye al cáncer gastrointestinal y al cáncer estromal gastrointestinal, al cáncer pancreático, al glioblastoma, al cáncer cervical, al cáncer de ovarios, al cáncer de hígado, al cáncer de

vejiga, al cáncer de vías urinarias, al hepatoma, al cáncer de mama, al cáncer de colon, al cáncer rectal, al cáncer colorectal, al cáncer endometrial o carcinoma uterino, al carcinoma de glándulas salivares, al cáncer de riñón o renal, al cáncer de próstata, al cáncer de vulva, al cáncer de tiroides, al carcinoma hepático, al carcinoma anal, al carcinoma peneano, al melanoma, al melanoma de esparcimiento superficial, al melanoma de léntigo maligno, a los melanomas lentiginoso acral, a los melanomas nodulares, al mieloma múltiple y al linfoma de células B (incluido el linfoma de bajo grado/no Hodgkin folicular (NHL); NHL linfocítico pequeño (SL); de grado intermedio/NHL folicular; NHL difuso de grado intermedio; NHL inmunoblástico de alto grado; NHL linfoblástico de alto grado; NHL de células no adheridas pequeñas de alto grado; NHL de enfermedad voluminosa; linfoma de células del manto; linfoma relacionado con el SIDA; y Macroglobulinemia de Waldenstrom); leucemia linfocítico crónico (CLL); leucemia linfoblástica aguda (ALL); leucemia de células capilares; leucemia mieloblástica crónica; y trastorno linfoproliferativo posterior a transplantes (PTLD), como también proliferación vascular anormal asociada con facomatosis, edema (como los que están asociados con tumores cerebrales), síndrome de Meigs, cáncer de cerebro, como también cáncer de cabeza y cuello, como también las metástasis asociadas. En determinadas representaciones, los cánceres que son sensibles al tratamiento con los anticuerpos de la invención incluyen al cáncer de mama, al cáncer colorectal, al cáncer rectal, al cáncer de pulmón de células no pequeñas, al glioblastoma, al linfoma no Hodgkins (NHL), al cáncer de células renales, al cáncer de próstata, al cáncer de hígado, al cáncer pancreático, al carcinoma de tejidos blandos, al sarcoma de Kaposi, al carcinoma carcinoide, al cáncer de cabeza y cuello, al cáncer de ovarios, al mesotelioma y al mieloma múltiple. En algunas representaciones, el cáncer se selecciona entre: cáncer de pulmón de células pequeñas, gliblastoma, neuroblastoma, melanoma, carcinoma de mama, cáncer gástrico, cáncer colorectal (CRC) y carcinoma hepatocelular. De todos modos, en algunas representaciones, el cáncer se selecciona entre: cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer colorectal, glioblastoma y carcinoma de mama, incluidas las formas metastásicas de dichos cánceres. En otras representaciones, el cáncer se seleccionó de una clase de cánceres de células B maduras excluido el Linfoma de Hodgkin pero incluido el linfoma de células B semejantes a las del centro germinal (GCB) DLBCL, linfoma de células semejantes a la célula B activada (ABC) DLBCL, linfoma folicular (FL), linfoma de células de manto (MCL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfoide crónica (CLL), linfoma de zona marginal (MZL), leucemia linfocítica de célula pequeña (SLL), linfoma linfoplasmocítico (LL), macroglobulinemia de Waldenstrom (WM), linfoma del sistema nervioso central (CNSL), linfoma de Burkitt (BL), leucemia prolinfocítica de células B, linfoma esplénico de zona marginal, leucemia de células capilares, linfoma o leucemia esplénico, inclasificable, linfoma esplénico difuso de linfocitos pequeños de pulpa roja, variante de leucemia de células capilares, macroglobulinemia de Waldenström, enfermedades de cadenas pesadas, enfermedad de cadenas alfa, enfermedad de cadenas gamma, enfermedad de cadenas μ, mieloma de

células plasmáticas, plasmocitoma óseo solitario, plasmocitoma extraóseo, linfoma de zona marginal extranodal de tejido linfoide asociado a mucosa (linfoma MALT), linfoma de zona marginal nodal, linfoma de zona marginal nodal pediátrico, linfoma folicular pediátrico, linfoma primario cutáneo de células del centro folicular, linfoma de células grandes B rico en células T/ histiocitos, linfoma DLBCL primario del sistema nervioso central, linfoma DLBCL cutáneo primario, linfoma tipo pierna, linfoma DLCBCL difuso de células B grandes positivo al virus de Epstein-Barr del anciano, DLBCL asociado con la inflamación crónica, granulomatosis linfomatoide, linfoma primario mediastinal de células B grandes (tímico), linfoma de células B grandes intravascular, linfoma de células B grandes positivo al ALK, linfoma plasmoblástico, linfoma de células B grandes tras enfermedad de Castleman multicéntrica asociada a infección por virus HHV8, linfoma primario de efusión: linfoma de células B, inclasificable, con características intermedias entre linfoma difuso de células B grandes y linfoma de Burkitt, y linfoma de células B, inclasificable, con características intermedias entre linfoma difuso de células B grandes y linfoma clásico de Hodgkin.

El término “tumor”, como se utiliza en el presente, hace referencia a todo crecimiento y proliferación de células neoplásicas, ya sea maligno o benigno, y a todas las células y los tejidos precancerosos y cancerosos. Los términos “cáncer”, “cancerígeno”, “trastorno proliferativo celular”, “trastorno proliferativo” y “tumor” no se excluyen el uno al otro según la referencia del presente.

El término “antígeno del tumor”, como se utiliza en el presente, puede comprenderse como aquellos antígenos que se presentan en las células tumorales. Estos antígenos pueden presentarse en la superficie celular con una parte extracelular, que con frecuencia se combina con una parte transmembranosa y citoplasmática de la molécula. Estos antígenos en ocasiones pueden presentarse solo mediante células tumorales y nunca mediante las células normales. Los antígenos del tumor pueden expresarse exclusivamente en las células tumorales o pueden representar una mutación específica del tumor en comparación con las células normales. En este caso, se denominan antígenos específicos del tumor. Son más comunes los antígenos del tumor que se presentan mediante células tumorales y células normales, y estos se denominan antígenos asociados con el tumor. Estos antígenos asociados con el tumor pueden sobreexpresarse en comparación con las células normales o son accesibles para unirse a anticuerpos en células tumorales debido a la estructura menos compacta del tejido del tumor en comparación con el tejido normal. En un aspecto, el antígeno del tumor se selecciona entre aquellos expuestos en la Tabla 1 a continuación.

Las “funciones del efector” hacen referencia a las actividades biológicas atribuíbles a la región Fc de un anticuerpo, que varían según el isotipo del anticuerpo. Algunos ejemplos de funciones del efector del anticuerpo incluyen: Unión a C1q y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC); unión al receptor de Fc; citotoxicidad mediada por célula dependiente del anticuerpo (ADCC); fagocitosis; regulación descendente de los receptores de la superficie celular (p. ej.: receptor de células B); y activación de células B.

Una “cantidad efectiva” de un compuesto, por ejemplo, un anticuerpo contra CD3 de la invención o un compuesto (p. ej.: compuesto farmacéutico) de este, es al menos la cantidad mínima necesaria para lograr el resultado terapéutico o profiláctico deseado, como una mejora o prevención medible de un trastorno en particular (p. ej.: un trastorno proliferativo celular, p. ej.: el cáncer). Una cantidad efectiva en el presente puede variar según factores como la etapa de la enfermedad, la edad, el sexo, el peso del paciente y la capacidad del anticuerpo para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad efectiva también es una cantidad en la cual cualquier efecto tóxico o perjudicial del tratamiento sea superado por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Con fines profilácticos, los resultados beneficiosos o deseados incluyen resultados como la eliminación o reducción del riesgo, la disminución de la gravedad o el retraso en la aparición de la enfermedad, incluidos los síntomas bioquímicos, histológicos o conductuales de la enfermedad, sus complicaciones y los fenotipos patológicos intermedios que se presentan durante el desarrollo de la enfermedad. Con fines terapéuticos, los resultados beneficiosos o deseados incluyen los resultados clínicos como la reducción de uno o más síntomas causados por la enfermedad, el aumento de la calidad de vida de quienes sufren la enfermedad, la disminución en la dosis de otros medicamentos necesarios para tratar la enfermedad, la mejora en el efecto de otro medicamento como en la selección de ruta, el retraso en el progreso de la enfermedad o la prolongación de la supervivencia. En el caso del cáncer o el tumor, una cantidad efectiva del medicamento puede tener efecto a la hora de reducir la cantidad de células cancerígenas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (es decir, lentificar en alguna medida o deseablemente detener) la infiltración de células cancerígenas en los órganos periféricos; inhibir (es decir, lentificar en alguna medida y deseablemente detener) la metástasis tumoral; inhibiendo en alguna medida el crecimiento del tumor; o aliviar en alguna medida uno o más de los síntomas relacionados con el trastorno. Una cantidad efectiva puede administrarse en una o más administraciones. Para los fines de esta invención, una cantidad efectiva del medicamento, compuesto o compuesto farmacéutico es una cantidad suficiente para lograr el tratamiento profiláctico o terapéutico ya sea de manera directa o indirecta. Como se comprende en el contexto clínico, una cantidad efectiva de un medicamento, compuesto o compuesto farmacéutico puede o no lograrse en conjunto con otro medicamento, compuesto o compuesto farmacéutico. De esta manera, una “cantidad efectiva” puede considerarse en el contexto de la administración de un agente terapéutico o más, y un agente solo puede considerarse como administrado en una cantidad efectiva si, en conjunto con uno o más agentes, es posible o se logra obtener un resultado deseable.

El término “región Fc” en el presente se utiliza para definir una región del punto terminal C de una cadena pesada de inmunoglobulina que contiene al menos una porción de la región constante. El término incluye las regiones Fc de secuencia nativa y las regiones Fc variantes. En una representación, una región Fc de una cadena pesada de IgG humana se extiende desde Cys226 o bien desde Pro230, hasta el miembro carboxilo

terminal de la cadena pesada. No obstante, la lisina del punto terminal C (Lys447) de la región Fc puede o no estar presente. A menos que se especifique lo contrario en el presente, la numeración de los residuos de aminoácidos en la región Fc o la región constante se realiza según el sistema de numeración de la UE, también denominado índice de la UE, como se describe en Kabat y otros, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (Secuencias de proteínas de interés inmunológico), 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health (5.ta edición, Servicio de Salud Pública, Institutos Nacionales de Salud), Bethesda, MD, 1991.

El "marco" o "FR" hace referencia a los residuos de dominio variable distintos a los residuos de la región hipervariable (HVR). El FR de un dominio variable por lo general consta de cuatro dominios FR: FR1, FR2, FR3 y FR4. Por consiguiente, las secuencias HVR y FR por lo general aparecen en la siguiente secuencia en VH (o VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

Los términos "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto" y "anticuerpo entero" se utilizan en el presente de manera intercambiable para hacer referencia a un anticuerpo que tiene una estructura sustancialmente similar a la estructura de un anticuerpo nativo o que tiene cadenas pesadas que contienen una región Fc como la definida en el presente.

Cuando se utiliza en el presente, un "agente inhibidor del crecimiento" hace referencia a un compuesto o una composición que inhibe el crecimiento de una célula, ya sea *in vitro* o *in vivo*. En una representación, el agente inhibidor del crecimiento es un anticuerpo inhibidor del crecimiento que evita o reduce la proliferación de una célula que expresa un antígeno al cual se une el anticuerpo. En otra representación, el agente inhibidor del crecimento puede ser uno que reduzca significativamente el porcentaje de células que se encuentran en la etapa S. Los ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen a agentes que bloquean el progreso del ciclo celular (en un lugar distinto a la etapa S), como los agentes que inducen la detención de G1 y la detención de la etapa M. Algunos bloqueadores clásicos de la etapa M incluyen a las vincas (vincristina y vinblastina), los taxanos y los inhibidores de la topoisomerasa II como la doxorubicina, la epirubicina, la daunorubicina, el etopósido y la bleomicina. Aquellos agentes que detienen G1 también se derraman hacia la detención de la etapa S, por ejemplo, los agentes alkilantes del ADN como el tamoxifeno, la prednisona, la dacarbazina, la mecloretamina, el cisplatino, el metotrexato, el 5-fluorouracilo y la ara-C. Puede encontrar más información en Mendelsohn e Israel, eds., The Molecular Basis of Cancer (La base molecular del cáncer), Chapter 1, entitled "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" (Capítulo 1, titulado "Regulación del ciclo celular, oncogenes y medicamentos antineoplásicos) de Murakami y otros. (W.B. Saunders, Filadelfia, 1995), p. ej.: pág. 13. Los taxanos (paclitaxel y docetaxel) son medicamentos contra el cáncer que se derivan del árbol de tejo. El docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), derivado del tejo europeo, es un análogo semisintético del paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). El paclitaxel y el docetaxel fomentan la formación de microtúbulos desde los dímeros de tubulina y

estabilizan los microtúbulos al evitar la depolimerización, que provoca la inhibidición de la mitosis celular.

El término cáncer "positivo para HER2" abarca las células de cáncer que tienen niveles de HER2 superiores a los normales. Los ejemplos de cáncer positivo para HER2 incluyen al cáncer de mama positivo para HER2 y al cáncer gástrico positivo para HER2. Opcionalmente, el cáncer positivo para HER2 tiene un puntaje inmunohistoquímico (IHC) de 2+ o 3+ o una hibridización in situ (ISH) con un cociente de amplificación 2.0.

Los términos "célula huésped", "línea celular huésped" y "cultivo celular huésped" se utilizan de manera intercambiable y hacen referencia a las células en las cuales se ha introducido ácido nucléico exógeno, incluida la progenie de dichas células. Las células huésped incluyen a "transformantes" y "células transformadas", que incluyen a la célula transformada principal y a la progenie derivada de allí sin importar la cantidad de pasajes. Es posible que la progenie no sea completamente idéntica en cuanto al contenido de ácido nucléico con respecto a una célula progenitora, sino que puede contener mutaciones. Una progenie mutante que tiene la misma función o actividad biológica que la cribada o seleccionada en la célula transformada originalmente se incluye en el presente.

Un "anticuerpo humano" es un anticuerpo que posee una secuencia de aminoácidos que se corresponde a aquella de un anticuerpo producido por un humano o una célula humana o derivada de una fuente no humana que utiliza repertorios de anticuerpos humanos u otras secuencias de codificación de anticuerpos humanos. Esta definición de un anticuerpo humano excluye de manera específica a un anticuerpo humanizado que consta de residuos de uniones antigénicas no humanas. Los anticuerpos humanos pueden producirse mediante el uso de varias técnicas conocidas en la materia, incluidas las genotecas de exposición en fagos. Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks *y otros.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991). También disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos se encuentran los métodos descritos en Cole *y otros*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy (Anticuerpos monoclonales y tratamiento del cáncer)*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner *y otros*, *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991). Consulte también van Dijk y van de Winkel, *Curr. Opin. Farmacol.*, 5: 368-74 (2001). Los anticuerpos humanos pueden prepararse mediante la administración de un antígeno a un animal transgénico que ha sido modificado para producir dichos anticuerpos en respuesta a un desafío antigénico, pero cuyos loci endógenos han sido desactivados, p. ej.: xenoratones inmunizados (consulte, p. ej.: las Patentes de los EE. UU. N.° 6.075.181 y 6.150.584 con respecto a la tecnología XENOMOUSE™). Consulte también, por ejemplo, Li *y otros*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006) con respecto a los anticuerpos humanos generados mediante tecnología de hibridoma de células B humanas.

Un "marco de consenso humano" es un marco que representa los residuos de aminoácidos de ocurrencia más común en una selección de secuencias marco VL o VH de inmunoglobulina humana. Por lo general, la selección de secuencias VL o VH de

inmunoglobulina humana proviene de un subgrupo de secuencias de dominio variable. Por lo general, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como en Kabat y otros, *Sequences of Proteins of Immunological Interest (Secuencias de proteínas de interés inmunológico)*, Fifth Edition, NIH Publication (Quinta edición, Publicación del NIH) 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3. En una representación, para el VL, el subgrupo es el subgrupo kappa I como en Kabat y otros, *supra.* En una representación, para el VH, el subgrupo es el subgrupo III como en Kabat y otros, *supra*.

Un anticuerpo "humanizado" hace referencia a un anticuerpo quimérico que abarca residuos de aminoácidos de HVR no humanos y residuos de aminoácidos de FR humanos. En determinadas representaciones, un anticuerpo humanizado abarcará sustancialmente la totalidad de al menos uno y típicamente dos dominios variables, en los cuales todos o sustancialmente todos los HVR (p. ej. CDR) corresponden a aquellos de un anticuerpo no humano, y todos o sustancialmente todos los FR corresponden a aquellos de un anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado opcionalmente puede abarcar al menos una porcion de una región constante de anticuerpo derivada de un anticuerpo humano. Una "forma humanizada" de un anticuerpo, p. ej.: un anticuerpo no humano, hace referencia a un anticuerpo que fue sometido a la humanización.

El término "región hipervariable" o "HVR" como se utiliza en el presente hace referencia a cada una de las regiones de un dominio variable de anticuerpo que resulta hipervariable en secuencia ("regiones determinantes de complementaridad" o "CDR") o contiene los residuos que establecen contacto con el antígeno ("contactos de antígeno"). Por lo general, los anticuerpos abarcan seis HVR: tres en VH (H1, H2, H3) y tres en VL (L1, L2, L3). Los HVR ejemplares en el presente incluyen:

(a) bucles hipervariables que ocurren en los residuos de aminoácidos 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) (Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987));

(b) CDR que ocurren en los residuos de aminoácidos 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35b (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) (Kabat y otros*., Sequences of Proteins of Immunological Interest (Secuencias de proteínas de interés inmunológico)*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health (5.ta edición, Servicio de Salud Pública, Institutos Nacionales de Salud), Bethesda, MD (1991));

(c) contactos con antígenos que ocurren en los residuos de aminoácidos 27c-36 (L1), 46-55 (L2), 89-96 (L3), 30-35b (H1), 47-58 (H2) y 93-101 (H3) (MacCallum y otros. *J. Mol. Biol.* 262: 732-745 (1996)) y

(d) combinaciones de (a), (b), o (c), que incluyen los residuos de aminoácidos HVR 46-56 (L2), 47-56 (L2), 48-56 (L2), 49-56 (L2), 26-35 (H1), 26-35b (H1), 49-65 (H2), 93-102 (H3) y 94-102 (H3).

A menos que se indique lo contrario, los residuos de HVR y otros residuos del dominio variable (p. ej.: residuos FR) están numerados en el presente según Kabat y otros, *supra*.

Un "inmunoconjugado" es un anticuerpo conjugado en una o más moléculas heterólogas,

incluido entre otros, un agente citotóxico.

Un "sujeto" o un "individuo" es un mamífero. Los mamíferos incluyen, entre otros, a los animales domésticos (p. ej.: vacas, ovejas, gatos, perros y caballos), primates (p. ej.: primates humanos y no humanos, como los monos), conejos y roedores (p. ej.: ratones y ratas). En determinadas representaciones, el sujeto o individuo es un humano.

Un anticuerpo "aislado" es uno que ha sido separado de un componente de su entorno natural. En algunas representaciones, un anticuerpo es purificado a más del 95% o del 99% de pureza según lo determinado por, por ejemplo, métodos electroforéticos (p. ej.: SDS-PAGE, concentración isoeléctrica (IEF), electroforesis capilar) o cromatográficos (p. ej.: intercambio de iones o HPLC de fase inversa). Para revisar los métodos de evaluación de la pureza de los anticuerpos, consulte, p. ej.: Flatman y otros, *J. Chromatogr. B* 848:79-87 (2007).

Un ácido nucléico "aislado" hace referencia a una molécula de ácido nucléico que fue separada de un componente de su entorno natural. Un ácido nucléico aislado incluye a una molécula de ácido nucléico contenida en células que comúnmente contienen a la molécula de ácido nucléico, pero la molécula de ácido nucléico se encuentra presente de manera extracromosómica o en una ubicación cromosómica que es diferente a su ubicación cromosómica natural.

La "codificación del ácido nucléico aislado de un anticuerpo contra CD3" hace referencia a una o más moléculas de ácido nucléico que codifican cadenas pesadas y livianas de anticuerpos (o fragmentos de ellas), incluidas dichas moléculas de ácido nucléico de un solo vector o de vectores separados, y dichas moléculas de ácido nucléico presentes en una o más ubicaciones en una célula huésped.

El término "anticuerpo monoclonal" como se utiliza en el presente, hace referencia a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que abarcan la población son idénticos o se unen al mismo epítopo, excepto en el caso de los anticuerpos con posibles variantes, p. ej.: que contienen mutaciones de ocurrencia natural o surgen durante la producción de una preparación de anticuerpos monoclonales, dichas variantes por lo general están presentes en cantidades menores. En contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales, que típicamente incluyen anticuerpos diferentes dirigidos contra determinantes diferentes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales se dirige contra un solo determinante en un antígeno. De esta manera, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea y no debe interpretarse como que es necesaria la producción del anticuerpo mediante ningún método en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se utilizarán en conformidad con la presente inversión pueden fabricarse mediante una variedad de técnicas, incluidas entre otras, el método de hibridoma, los métodos de ADN recombinante, los métodos de exposición de fagos y los métodos que y los métodos que utilizan animales transgénicos que contienen todos o parte de los loci de la inmunoglobulina humana, dichos métodos y

otros métodos ejemplares para fabricar anticuerpos monoclonales se describen en el presente.

Un “anticuerpo desnudo” hace referencia a un anticuerpo que no está conjugado en una fracción heteróloga (p. ej.: una fracción citotóxica) o radioetiqueta. El anticuerpo desnudo puede estar presente en una formulación farmacéutica.

Los “anticuerpos nativos” hacen referencia a moléculas de inmunoglobulina de ocurrencia natural con estructuras variantes. Por ejemplo, los anticuerpos nativos de IgG son glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150,000 dáltones, compuestas de dos cadenas livianas idénticas y dos cadenas pesadas idénticas que están unidas por un bisulfuro. Desde N- hasta C-terminal, cada cadena pesada tiene una región variable (VH), también denominada dominio pesado variable o un dominio variable de cadena pesada, seguido por tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3). Similarmente, desde N- hasta C-terminal, cada cadena liviana tiene una región variable (VL), también denominada dominio liviano variable o un dominio variable de cadena liviana, seguido por un dominio liviano constante (CL). La cadena liviana de un anticuerpo puede estar asignada a uno de dos tipos, denominados kappa (κ) y lambda (λ), según la secuencia de aminoácidos de su dominio constante.

El término “prospecto” se utiliza para hacer referencia a las instrucciones que habitualmente se incluyen en los paquetes comerciales de los productos terapéuticos, que contienen información sobre las indicaciones, el uso, la dosis, la administración, los tratamientos combinados, las contraindicaciones o las advertencias con respecto al uso de dichos productos terapéuticos.

El término “antagonista de unión del eje de PD-1” hace referencia a una molécula que inhibe la interacción de un colaboración de unión al eje de PD-1 con uno o más de sus colaboradores de unión, para eliminar la disfunción de la célula T que surge como resultado de señalizar el eje de señalización de PD-1; con el resultado que es la restauración o mejora de la función de la célula T (p. ej.: proliferación, producción de citocinas, muerte de células objetivo). Como se lo utiliza en el presente, el antagonista de unión al eje PD-1 incluye un antagonista de unión a PD-1, un antagonista de unión a PD-L1 y un antagonista de unión a PD-L2.

El término “antagonista de unión a PD-1” se refiere a una molécula que disminuye, bloquea, inhibe, anula o interfiere en la transducción de señal resultante de la interacción de PD-1 con una o varias de sus moléculas de enlace, tales como PD-L1, PD-L2. En algunas representaciones, un antagonista de unión a PD-1 es una molécula que inhibe la unión de PD-1 a una o varias de sus moléculas de enlace. En un aspecto específico, el antagonista de unión a PD-1 inhibe la unión de PD-1 a PD-L1 o PD-L2. Por ejemplo, los antagonistas de PD-1 incluyen anticuerpos contra PD-1, fragmentos de unión a antígenos del mismo, inmunoadhesinas, proteínas de fusión, oligopéptidos y otras moléculas que disminuyen, bloquean, inhiben, anulan o interfieren con la transducción de señal resultante de la interacción de PD-1 con PD-L1 o PD-L2. En una representación, un antagonista de unión de PD-1 reduce la señal coestimulante negativa mediada por o a

través de proteínas de la superficie celular expresadas en linfocitos T, mediando la señal a través del PD-1 para representar una célula T disfuncional como menos disfuncional (p. ej.: realzando las respuestas del efector ante el reconocimiento del antígeno). En algunas representaciones, un antagonista de unión a PD-1 es un anticuerpo contra PD-1. En un aspecto específico, un antagonista de unión a PD-1 es MDX-1106 (nivolumab) descrito en el presente. En otro aspecto específico, un antagonista de unión a PD-1 es MK-3475 (lambrolizumab) descrito en el presente. En otro aspecto específico, un antagonista de unión a PD-1 es CT-011 (pidilizumab) descrito en el presente. En otro aspecto específico, un antagonista de unión a PD-1 es AMP-224 descrito en el presente.

El término "antagonista de unión a PD-L1" se refiere a una molécula que disminuye, bloquea, inhibe, anula o interfiere en la transducción de señal resultante de la interacción de PD-L1 con una o más de sus moléculas de enlace, tales como PD-1, B7-1. En algunas representaciones, un antagonista de unión a PD-L1 es una molécula que inhibe la unión de PD-L1 a sus colaboradores de enlace. En un aspecto específico, el antagonista de unión a PD-L1 inhibe la unión de PD-L1 a PD-1 o B7-1. En algunas representaciones, los antagonistas de unión a PD-L1 incluyen anticuerpos contra PD-L1, fragmentos de unión a antígenos del mismo, inmunoadhesinas, proteínas de fusión, oligopéptidos y otras moléculas que disminuyen, bloquean, inhiben, anulan o interfieren con la transducción de señal resultante de la interacción de PD-L1 con una o más de sus moléculas de enlace, tales como PD-1, B7-1. En una representación, un antagonista de unión a PD-L1 reduce la señal coestimulante negativa mediada por o a través de proteínas de la superficie celular expresadas en linfocitos T, mediando la señal a través del PD-L1 para representar una célula T disfuncional como menos disfuncional (p.ej.: realzando las respuestas del efector ante el reconocimiento del antígeno). En algunas representaciones, un antagonista de unión de la PD-L1 es un anticuerpo anti-PD-L1. En un aspecto específico, un anticuerpo anti-PD-L1 es el YW243.55.S70 descrito en el presente. En otro aspecto específico, un anticuerpo anti-PD-L1 es el MDX-1105 descrito en el presente. Otro aspecto específico especifica que un anticuerpo anti-PD-L1 es el MPDL3280A descrito en el presente. Otro aspecto específico especifica que un anticuerpo anti-PD-L1 es el MEDI4736 descrito en el presente.

El término "antagonista de unión de PD-L2" se refiere a una molécula que disminuye, bloquea, inhibe, anula o interfiere en la transducción de señal resultante de la interacción de PD-L2 con una o varias de sus moléculas de enlace, tal como la PD-1. En algunas representaciones, un antagonista de unión de PD-L2 es una molécula que inhibe la unión de PD-L2 y una o varias de sus moléculas de enlace. En un aspecto específico, el antagonista de unión de PD-L2 inhibe la unión del PD-L2 al PD-1. En algunas representaciones, los antagonistas de PD-L2 incluyen anticuerpos anti-PD-L2, fragmentos unificadores de antígenos del mismo, inmunoadhesinas, proteínas de fusión, oligopéptidos y otras moléculas que disminuyen, bloquean, inhiben, anulan o interfieren con la transducción de señal resultante de la interacción de PD-L2 con una o más de sus moléculas de enlace, tal como la PD-1. En una representación, un antagonista de unión de

PD-L2 reduce la señal coestimulante negativa mediada por o a través de proteínas de la superficie celular expresadas en linfocitos T, mediando la señal a través del PD-L2 para representar una célula T disfuncional como menos disfuncional (p.ej: realzando las respuestas de efector a un reconocimiento antígeno). En algunas representaciones, un antagonista de unión de PD-L2 es una inmunoadhesina.

A menos que se indique lo contrario, el término "proteína" aquí utilizado se refiere a cualquier proteína nativa de cualquier fuente vertebrada, incluyendo mamíferos tales como primates (p.ej humanos) y roedores (p.ej ratones y ratas). El término abarca proteínas "completas" sin procesar, así como también cualquier forma de proteína que resulte del procesamiento en la célula. El término también incluye variables naturales de la proteína, como por ejemplo variantes de empalme o alélicas. Las proteínas respectivas a la invención incluyen, por ejemplo, cualquier proteína enumerada en la Tabla 1.

"El porcentaje (%) de identidad de secuencias de aminoácidos" con respecto a una secuencia de polipéptido de referencia se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidato que es idéntica a los residuos de aminoácidos en la secuencia de polipéptidos de referencia, luego de alinear las secuencias e introducir espacios, si fuera necesario, para conseguir el porcentaje máximo de la identidad de secuencia, sin considerar cualquier sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. El proceso de alineación con el fin de determinar el porcentaje de la identidad de secuencia de aminoácidos puede lograrse de distintas maneras por expertos en la materia, por ejemplo, utilizando software informático de acceso público, tal como BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Aquellas personas expertas en la materia pueden determinar los parámetros adecuados para alinear secuencias, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir una alineación máxima sobre el largo completo de las secuencias en comparación. Sin embargo, los valores (%) de identidad de secuencia de aminoácidos se generan utilizando el programa informático de comparación de secuencias, ALIGN-2, para los fines aquí establecidos. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 fue creado por Genentech, Inc, mientras que el código fuente ha sido presentado con documentación del usuario en la Oficina de Derechos de Autor de E.E.U.U., Washington D.C., 20559, donde se inscribió bajo el N° de Registro de Derechos de Autor de E.E.U.U. TXU510087. El programa ALIGN-2 es de dominio público en Genentech, Inc., Sur de San Francisco, California, o puede recopilarse a partir del código fuente. El programa ALIGN-2 debe recopilarse para usar en un sistema operativo UNIX, incluyendo UNIX V4.OD digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias son establecidos por el programa ALIGN-2 y no varían.

En situaciones en las que se utiliza ALIGN-2 para comparar secuencias de aminoácidos, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos A dada con o contra una secuencia de aminoácidos B dada (que de manera alternativa puede plantearse como una secuencia de aminoácidos A dada que tiene o incluye un % de identidad de secuencia particular de aminoácidos con o contra una secuencia de aminoácidos B dada) se calcula de la siguiente manera:

100 veces la fracción X/Y

donde X es la cantidad de residuos de aminoácidos calificados como idénticamente compatibles por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en la alineación del programa de A y B, y donde Y es la cantidad total de residuos de aminoácidos en B. Ha de reconocerse que donde la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A a B no será igual al % de identidad de secuencia de aminoácidos de B a A. A menos que se establezca lo contrario, todos los valores de porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos utilizados en el presente se obtienen mediante el proceso descripto en el párrafo inmediatamente anterior utilizando el programa informático ALIGN-2.

El término "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación hecha de una manera que permita la actividad biológica de un ingrediente activo que ahí se contiene para ser eficaz, la cual no contiene componentes adicionales considerados inaceptablemente tóxicos para el sujeto para el cual se administraría dicha formulación.

Un "portador aceptable farmacéuticamente" es un ingrediente en una formulación farmacéutica, distinto de un ingrediente activo, que no se considera tóxico para un sujeto. Un portador aceptable farmacéuticamente incluye, aunque no exclusivamente, un tampón, excipiente, estabilizador o conservante.

Como se utiliza en el presente, la palabra "tratamiento" (y sus variaciones gramaticales tales como "tratar") alude a la intervención clínica en un intento de alterar el curso natural del individuo que se encuentra bajo tratamiento, lo cual puede realizarse por profilaxis o durante el curso de la patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen, pero no se limitan a, prevenir la ocurrencia o recurrencia de una enfermedad, aliviar los síntomas, disminuir cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, prevenir la metástasis, disminuir la tasa de evolución de la enfermedad, mejorar o paliar el estado de la enfermedad, y una remisión o un mejor pronóstico. En algunas representaciones, los anticuerpos de la invención son utilizados para retrasar el desarrollo de una enfermedad o disminuir su progreso.

El término "progresión retrasada" de un trastorno o enfermedad aquí utilizado implica postergar, dificultar, retrasar, estabilizar y/o posponer el desarrollo de la enfermedad o trastorno (p.ej: un trastorno proliferativo de células, p.ej: cáncer). Este retraso puede durar por variados lapsos de tiempo, dependiendo de la historia de la enfermedad y/o del individuo bajo tratamiento. Como es obvio para los expertos en la materia, un retraso suficiente o importante de hecho puede abarcar la prevención, ya que el individuo no desarrolla la enfermedad. Por ejemplo, se puede retrasar un cáncer en estado avanzado, como en el desarrollo de la metástasis.

"Disminuir" o "inhibir" implica la capacidad de causar un descenso global, por ejemplo, de un 20% o mayor, de un 50% o mayor, de un 75%, 85%, 90%, 95% o mayor. En ciertas representaciones, disminuir o inhibir puede referirse a la función efectora de un anticuerpo que se media por un anticuerpo de la región de fragmento cristalizable. Dicho

efector funciona específicamente, incluyendo citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA), y fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP).

El término "región variable" o "dominio variable" se refiere al dominio de un anticuerpo de cadena liviana o pesada que está involucrado en la unión del anticuerpo y el antígeno. Por lo general, los dominios variables de cadena pesada y cadena liviana (VH y VL, respectivamente) de un anticuerpo nativo tienen estructuras similares. Cada dominio comprende cuatro regiones altamente conservadas (FRs) y tres regiones hipervariables (RHVs). (Ver, p.ek, Kindt et ál. *Kuby Immunology*, 6ta Ed., W.H. Freeman and Co., página 91 (2007).) Un dominio VH o VL único puede ser suficiente para otorgar especificidad de unión al antígeno. Además, los anticuerpos que unen un antígeno particular pueden aislarse utilizando un dominio VH o VL de un anticuerpo que une el antígeno para tamizar una genoteca de dominios VH o VL complementarios, respectivamente. Ver, p.ej. Portolano et ál, *J. Immunol* 150:880-887 (1993); Clarkson et ál., *Nature* 352:624-628 (1991).

El término "vector" utilizado en el presente documento se refiere a la molécula nucleica ácida capaz de propagar otro ácido nucleico al cual está unida. El término incluye el vector como una estructura ácido nucleica autorreproductora, así como también el vector incorporado al genoma de una célula hospedadora en el cual ha sido introducido. Ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de los ácidos nucleicos a los que están unidos operativamente. En el presente documento nos referimos a dichos vectores como "vectores de expresión".

Como se usa en el presente, "administrar" implica un método de dar una dosis de un compuesto (p. ej. un anticuerpo de anti-CD3 de la invención o un ácido nucleico codificando un anticuerpo anti-CD3 de la invención) o una composición (p.ej, una composición farmacéutica. p.ej. una composición farmacéutica incluyendo un anticuerpo anti-CD3 de la invención) a un sujeto. Las composiciones utilizadas en los métodos descritos en el presente pueden administrarse, por ejemplo por vía intramuscular, intravenosa, intradermal, por vía percutánea, intraarterial, intraperitonal, intralesional, intracraneal, intraarticular, intraprostática, intrapleural, intratraqueal, intranasal, intravítrea, intravaginal, intrarectal, de forma tópica, por vía intratumoral, peritoneal, subcutánea, subconjuntival, intravesicular, mucosa, intrapericárdica, intraumbilical, intraocular, oral, tópica, local, por inhalación, por inyección, por infusión, por infusión contínua, por perfusión localizada lavando células diana directamente, por catéter, por lavado, en cremas o en composiciones lipídicas. El método de administración puede variar según diversos factores (p. ej. el compuesto o composición a administrar y la gravedad de la condición, enfermedad o trastorno bajo tratamiento).

II. COMPOSICIONES Y MÉTODOS

En parte, la invención se basa en anticuerpos anti-CD3. En ciertas representaciones, los anticuerpos anti-CD3 son multiespecíficos (es decir, biespecíficos) y, además de un CD3 o

un fragmento del mismo, unen una segunda molécula biológica (es decir, un antígeno de la superficie celular, p.ej: un antígeno tumoral). Los anticuerpos de la invención son útiles, por ejemplo, para tratar o retrasar el avance de un trastorno proliferativo de células (p.ej: cáncer) o un trastorno autoinmune, o para aumentar la función inmunológica en un sujeto que sufre dicho trastorno.

A. Anticuerpos anti-CD-3 modelo

En un aspecto, la invención produce anticuerpos aislados que se unen a CD3 (p.ej: CD3ε y/o CD3γ).

Por ejemplo, en algunas situaciones, un anticuerpo anti CD3 que tiene un primer dominio de unión puede comprender al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis regiones hipervariables (RHV) que se seleccionan de (a) una RHV-H1 que consta en una secuencia de aminoácidos con N°. de ID de SEC.: 1; (b) una RHV-H2 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.° de ID de SEC.: 2; (c) una RHV-H3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 3; (d) una RHV-L1 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 4; (e) una RHV-L2 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 5; y (f) una RHV-L3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 6. En algunos casos, el anticuerpo anti-CD3 contiene al menos una (por ejemplo, 1, 2, 3, o 4) de las regiones del marco de las cadenas pesadas FR-H1, FR-H2, FR-H3, y FR-H4 que consiste en las secuencias de N.º de ID de SEC.: 301-304, respectivamente, y/o al menos una (por ejemplo, 1, 2, 3, o 4) de las regiones del marco de la cadena liviana FR-L1, FR-L2, FR-L3, y FR-L4 que consiste en las secuencias de N.º de ID de SEC.: 305-308, respectivamente. En algunos casos, el anticuerpo anti-CD3 puede constar de un dominio de VH incluyendo una secuencia de aminoácidos con al menos una identidad de secuencia del 90% (p. ej., con una identidad de secuencia de al menos el 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%) con, o la secuencia de, N.° de ID de SEC.: 184 y/o un dominio de VL que consta de una secuencia de aminoácidos con al menos una identidad de secuencia del 90% (p. ej., con una identidad de secuencia de al menos el 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%) con, o la secuencia de, N.° de ID de SEC.: 185. En otros casos, el anticuerpo de anti-CD3 contiene al menos una (por ejemplo, 1, 2, 3, o 4) de las regiones del marco de las cadenas pesadas FR-H1, FR-H2, FR-H3, y FR-H4 que consiste en las secuencias de N.º de ID de SEC.: 293-296, respectivamente, y/o al menos una (por ejemplo, 1, 2, 3, o 4) de las regiones del marco de la cadena liviana FR-L1, FR-L2, FR-L3, y FR-L4 que consiste en las secuencias de N.º de ID de SEC.: 297-300, respectivamente. En algunos casos, el anticuerpo anti-CD3 puede constar de un dominio de VH incluyendo una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una identidad de secuencia del 90% (p. ej., con una identidad de secuencia de al menos el 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%) con, o la secuencia de, N.° de ID de SEC.: 186 y/o un dominio de VL que consta de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una identidad de secuencia del 90% (p. ej., con una identidad de secuencia de al menos el 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%,

98% o 99%) con, o la secuencia de, N.° de ID de SEC.: 187. En una situación particular, el anticuerpo anti-CD3 puede ser 40G5c, o un derivado o anticuerpo clonal del mismo.

En otro aspecto, un anticuerpo de la invención comprende (a) un dominio VH que incluye al menos uno, al menos dos o las tres secuencias RHV VH seleccionadas a partir de (i) una RHV-H1 que consta de una secuencia de aminoácidos con N.° de ID de SEC.: 1, (ii) una RHV-H2 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 2, y (iii) RHV-H3 que consta de una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del N.° de ID SEC.: 3; y (b) un dominio VH que incluye al menos uno, al menos dos o las tres secuencias RHV VH seleccionadas a partir de (i) una RHV-L1 que consta de una secuencia de aminoácidos con N.° de ID de SEC.: 4; (ii) una RHV-L2 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 5, y (iii) una RHV-L3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 6. En algunos casos, el anticuerpo anti-CD3 puede tener un dominio de VH que consta de una secuencia de aminoácidos con N.° de ID de SEC.: 184 y un dominio de VL que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 185. En algunos casos, el anticuerpo anti-CD3 puede tener un dominio de VH que consta de una secuencia de aminoácidos con N.° de ID de SEC.: 186 y un dominio de VL que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 187. En una situación particular, el anticuerpo anti-CD3 puede ser 40G5c, o un derivado o anticuerpo clonal del mismo.

En cualquiera de las versiones mencionadas anteriormente, se humaniza un anticuerpo anti-CD3. En una versión, un anticuerpo anti-CD3 incluye unas RHV como en cualquiera de las versiones anteriores. Además, abarca un marco receptor, p.ej. un marco de inmunoglubina humana o un marco de consenso humano.

En otro aspecto, se producen anticuerpos anti-CD3, en donde el anticuerpo abarca un VH como en todas las versiones provistas anteriormente, y un VL como en todas las versiones previas, en las que una o ambas secuencias de dominio variable incluyen modificaciones pos-traduccionales.

Otro rasgo indica que la invención produce un anticuerpo que se une al mismo epítope como un anticuerpo anti-CD3 provisto anteriormente. Por ejemplo, en ciertas versiones, se produce un anticuerpo que se une al mismo epítope que un anticuerpo anti-CD3 incluyendo un N.° de secuencia VH de ID de SEC.: 184 y un N.° de secuencia VL de ID de SEC.: 185. En ciertas versiones, se provee un anticuerpo que se une a un epítope dentro de un fragmento de CD3 (p.ej. CD3ε de humano), que consiste en aminoácidos 1-26 (N.° de ID de SEC.: 283) o 1-27 (N.º de ID de SEC.: 278) de la cadena CD3ε de humano.

En otro aspecto, la invención produce un anticuerpo que se une con un epítope CD3 único. En ciertas representaciones, el anticuerpo anti-CD3 de la invención hace un contacto único con aminoácidos de CD3ε de humano a una distancia de 3,5 ángstroms; 3,25 ángstroms; 3,00 ángstroms; 2,75 ángstroms, o menos. En algunas representaciones, se proporciona un anticuerpo que se une a un epítope que consta de uno, dos, tres, cuatro o cinco aminoácidos de CD3ε de humano a una distancia de 3,5 ángstroms; 3,25 ángstroms; 3,00 ángstroms; 2,75 ángstroms, o menos. En una versión, el anticuerpo anti-

CD3 de la invención entra en contacto únicamente con aminoácidos de CD3ε a una distancia de 3,5 ángstroms o menos. En ciertas versiones, se provee un anticuerpo que se une a un epítope comprendiendo uno, dos, tres, cuatro o cinco aminoácidos de la cadena CD3ε de humano a una distancia de 3,5 ángstroms o menos. Por ejemplo, en ciertas versiones, se provee un anticuerpo que se une a un epítope que consiste en aminoácidos de la cadena CD3ε de humano seleccionado de GIn1, Asp2, Asn4, Glu6 y Met7. En una versión en particular, en anticuerpo anti-CD3 se une a un epítope que incluye Glu6 específicamente. En otras versiones particulares, se provee un anticuerpo que no se une a un epítope que incluye aminoácido Glu5 de la cadena CD3ε de humano. En otras versiones particulares, se provee un anticuerpo que no se une a un epítope que incluye aminoácidos Gly3 y Glu5 de la cadena CD3ε de humano.

Se puede determinar un epítope anti-CD3 por un anticuerpo anti-CD3 unido a fragmentos péptídicos del epítope. Alternativamente, un epítope anti-CD3 mediante puede determinarse mediante mutagénesis por escaneo de alanina. En una representación, una reducción en la unión de un anticuerpo anti-CD3 a un CD3 mutado por un porcentaje de 20%, 30%, 50%, 80% o más indica que el residuo del aminoácido del CD3 mutado en un ensayo de mutagénesis por escaneo de alanina es un residuo de epítipe para ese anticuerpo anti-CD3. Alternativamente, un epítope anti-CD3 puede determinarse mediante espectrometría de masas. En algunas versiones, el epítope se determina por cristalografía (por ejemplo, métodos cristalográficos descriptos en los Ejemplos).

En algunas versiones, el epítope, tal como se establece por cristalografía, se determina utilizando aminoácidos Q1-M7 de CD3. En algunas versiones, el epítope, tal como se establece por cristalografía, se determina utilizando aminoácidos QDGNEEMGGITQTPYK (N.° de ID de SEC.: 284) de CD3.

En algunas versiones, el epítope, tal como se estableció por cristalografía, puede llevarse a cabo combinando el anticuerpo anti-CD3 Fab, disuelto en 0,15 m de NaCl, 25 mM tris, pH de 7,5 en 10 mg/mL, con un exceso molar del doble (1 mg) del péptido del complejo CD3ε y detectando inicialmente una matriz dispersa de precipitantes en un formato de difusión de vapor. Los cristales optimizados pueden desarrollarse en una mezcla 1:1 con una solución de depósito con 70% de v/v de metilpentano, y 0,1 m de tampón HEPES a un pH de 7,5. El depósito puede utilizarse como crioprotector. Los cristales pueden transferirse a temperatura criogénica por inmersión súbita en nitrógeno líquido.

Los datos de difracción de cristales pueden recopilarse en línea de haz del Advanced Photon Source 22ID, utilizando un detector CCD MAR300. Las defracciones registradas pueden integrarse y ampliarse utilizando el programa HKL2000.

La estructura puede escalonarse por el método de reemplazo molecular (MR) utilizando el programa Phaser. Por ejemplo, el modelo de búsqueda de MR es una sub-unidad Fab derivada de una estructura cristalina del complejo HGFA/Fab (código PDB: 2R0L). El péptido de complejo CD3ε se desarrolla en la estructura basada en un mapa Fo-Fc. Como consecuencia, la estructura puede refinarse utilizando los programas REFMAC5 y

PHENIX, implementando las funciones objetivo de probabilidad, el método de refinamiento de factor-B individual anisotrópico y el método de refinamiento TLS, para lograr la convergencia.

En otras versiones particulares, se produce un anticuerpo que incluye un paratopo que se une al mismo epítope que un anticuerpo anti-CD3 incluido en el presente. Por ejemplo, en ciertas versiones, se desarrolla un anticuerpo que se une al mismo epítope que un parotopo de anticuerpos anti-CD3 incluyendo aminoácidos que toman contacto a una distancia de 3,5 ángstroms o menos. En ciertas versiones, se provee un anticuerpo que se une al mismo epítope que un paratopo de anticuerpo anti-CD3 que consiste en aminoácidos de la región VH del anticuerpo anti-CD3 seleccionado del grupo, incluyendo 33Tyr, 35His, 50Trp, 97Tyr y 98Ser. En ciertas versiones, se provee un anticuerpo que se une al mismo epítope que un paratopo de anticuerpo anti-CD3, que consiste en uno, dos, tres, cuatro o cinco aminoácidos de la región VH de un anticuerpo anti-CD3 seleccionado del grupo que incluye 33Tyr, 35His, 50Trp, 97Tyr y 98Ser. En ciertas versiones, se provee un anticuerpo que se une al mismo epítope que un paratopo de anticuerpo anti-CD3, que consiste en aminoácidos de la región VL de un anticuerpo anti-CD3 seleccionado del grupo, incluyendo 27Arg, 27Asn, 30Lys, 32Tyr y 92Phe, 94Leu y 96Arg. En ciertas versiones, se provee un anticuerpo que se une al mismo epítope que un paratopo de anticuerpo anti-CD3, que consiste en uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete aminoácidos de la región VL de un anticuerpo anti-CD3 seleccionado del grupo, incluyendo 27Arg, 27Asn, 30Lys, 32Tyr, 92Phe, 94Leu y 96Arg. En una versión opcional, se proporciona un anticuerpo que no se une al mismo epítope que un paratopo de anticuerpo anti-CD3, el cual consta de aminoácidos de la región VL, incluyendo 91Ser. Un aspecto adicional de la invención indica que, de acuerdo a cualquiera de las versiones mencionadas anteriormente, un anticuerpo anti-CD3 es un anticuerpo monoclonal que consiste en un anticuerpo humano, humanizado o quimérico. En una versión, un anticuerpo anti-CD3 es un fragmento de anticuerpo, por ejemplo: un Fv, Fab, Fab', scFv, diacuerpo, o un fragmento de $F(ab')_2$. En otra versión, el anticuerpo es de largo completo, es decir, un anticuerpo IgG intacto (por ej: un anticuerpo IgG1 intacto) u otra clase anticuerpo o isotopo según lo aquí contemplado.

Como aspecto adicional, de acuerdo a cualquiera de las versiones mencionadas anteriormente, un anticuerpo anti-CD3 puede incorporar cualquiera de estas características, individualmente o en combinación, tal como se describe en las Secciones 1-7 debajo.

1. Afinidad del Anticuerpo

En determinadas representaciones, un anticuerpo provisto aquí tiene una constante de disociación (Kd) de ≤1μM, ≤ 100 nm, ≤10 nm, ≤1 nm, ≤0,1 nm, ≤0,01 nm, o ≤ 0,001 nm (p. ej.: 10^{-8} M o menos, p. ej.: de 10^{-8}M a 10^{-13} M, p. ej.: de 10^{-9}M a 10^{-13} M).

En una representación, Kd se mide con un ensayo de unión de antígenos radiomarcados (RIA). En una representación, se lleva a cabo un RIA junto con la versión Fab de un

anticuerpo de interés y su antígeno. Por ejemplo, la afinidad de unión de la solución de Fabs para antígenos se mide equilibrando Fab con una concentración mínima de un antígeno marcado (^{125}I) en presencia de una titulación en serie de antígenos sin marcar y capturando antígenos unidos con una placa recubierta de anticuerpos anti-Fab (ver, p.ej., Chen et ál., *J. Mol. Biol.* 293:865-881(1999)). Con el fin de establecer las condiciones para el ensayo, las placas de pozo múltiple MICROTITER® (termo-científicas) son cubiertas durante la noche con 5 ug/mL de anticuerpos anti-Fab de captura (Laboratorios Cappel) en 50 mM de carbonato de sodio (pH de 9,6), y consecutivamente bloqueadas con 2% de Albúmina del Suero Bovino (p/p) en PBS entre dos y cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23°C). En el caso de una placa no absorbente (Nunc #269620), los antígenos [^{125}I] de 100 pM o 26 pM se mezclan con diluciones en serie de un Fab de interés (p. ej. consistentes con la evaluación del anticuerpo anti-VEGF, Fab-12, en Presta et ál., *Cancer Res.* 57:4593-4599 (1997)). Luego, el Fab de interés se incuba toda la noche; sin embargo, el proceso de incubación puede continuar por un período más largo (p.ej de aproximadamente 65 horas) para garantizar que se alcance el equilibrio. Posteriormente, las mezclas se transfieren a la placa capturadora para ser incubadas a temperatura ambiente (p.ej. durante una hora). Luego, se quita la solución y se enjuaga la placa ocho veces con 0,1% de polisorbato 20 (TWEEN-20®) en PBS. Cuando las placas están secas, se agregan 150 µl/pozo de centelleo (MICROSCINT-20 ™; Packard), y las placas se recuentan con un contador gama TOPCOUNT ™ (Packard) durante diez minutos. Las concentraciones de cada Fab que proporcionan 20% de unión máxima o menos son seleccionadas para implementarlos en ensayos de unión competitivos.

De acuerdo a otra representación, se mide la Kd utilizando un ensayo de resonancia plasmónica de superficie BIACORE® Por ejemplo, un ensayo que utiliza BIACORE®-2000 o un BIACORE ®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) se realiza a 25°C con chips CM5 de antígenos inmovilizados a ~10 unidades de respuesta (RU). En una representación, los chips de biosensores de dextrano carboximetilado (CM5, BIACORE, Inc.), se activan con *N*-etil-*N'*- (3-dimetilaminopropilamina)-hidrocloruro de carbodiimida (EDC) y *N-hidroxisuccinimida* (NHS) conforme a las instrucciones del proveedor. El antígeno se diluye con 10 mM de acetato de sodio, pH de 4,8, a 5 µg/ml (~0,2 µM) antes de inyectar a una velocidad de flujo de 5 µl/minuto para conseguir aproximadamente 10 unidades de respuesta (RU) de proteínas unidas. Luego de la inyección en el antígeno, se inyecta 1 M de etanolamina a los grupos no reaccionados de bloqueo. En el caso de mediciones cinéticas, se inyectan diluciones en serie de Fab duplicadas (0,78 nM a 500 nM9 en PBS con 0,05% de polisorbato 20 (TWEEN-20™) surfactante (PBST) a 25°C en una velocidad de flujo de aproximadamente 25 µl/min. Las tasas de asociación (k_{on}) y disociación (k_{off}) se calculan utilizando un modelo de unión Langmuir simple individual (BIACORE ® Evaluation Software- versión 3.2), adaptando simultáneamente los sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación de equilibrio (Kd) se calcula como la proporción k_{on}/k_{off}. Ver, por ejemplo, Chen et ál., *J. Mol. Biol.* 293:865-881 (1999). Si la constante de asociación excede$10^6 M^{-1} s^{-1}$ del ensayo de

resonancia plasmónica de superficie mencionado anteriormente, la constante de asociación puede determinarse utilizando una técnica de enfriamiento fluorescente que mide el aumento o disminución en la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, paso de banda de 16 nm) a 25°C de un anticuerpo anti-antígeno de 20 nM (forma Fáb) en PBS, pH de 7,2 en presencia de crecientes concentraciones de antígeno medidas en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro equipado por el método de parada de flujo (instrumentos Aviv) o un espectrofotómetro SLM-AMINCO TM (TermoEspectrónico) de serie 8000 con una cubeta revuelta.

2. Fragmentos de anticuerpos

En determinadas representaciones, un anticuerpo provisto en el presente es el fragmento de un anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpos incluyen pero no se limitan a fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')2, Fv y scFv, y otros fragmentos que se describen a continuación. Para una revisión de ciertos fragmentos de anticuerpos, vea Hudson et al. *Nat. Med.* 9:129-134 (2003). Para una revisión de los fragmentos scFv, vea, p. ej., Pluckthün, en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., (Springer-Verlag, Nueva York), págs. 269-315 (1994); vea también WO 93/16185; y las patentes de EE.UU. N.° 5.571.894 y 5.587.458. Para una discusión de los fragmentos Fab y F(ab')2 que comprenden los residuos epítopos de unión con el receptor de recuperación y que aumentaron la vida media in vivo, vea la patente de EE.UU. N.° 5.869.046).

Los diacuerpos son fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión de antígenos que pueden ser bivalentes o biespecíficos. Vea, por ejemplo, EP 404,097; WO 1993/01161; Hudson et al. *Nat. Med.* 9:129-134 (2003); y Hollinger et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993). Los tricuerpos y tetracuerpos también se describen en Hudson et al. *Nat. Med.* 9:129-134 (2003).

Los anticuerpos de un solo dominio son fragmentos de anticuerpos que comprenden todo el dominio variable de una cadena pesada o una parte de él o todo el dominio de una cadena liviana de un anticuerpo o una parte de él. En ciertas representaciones, un anticuerpo de un solo dominio es un anticuerpo humano de un solo dominio (Domantis, Inc., Waltham, MA; vea, p. ej., la patente de EE.UU. N.° 6.248.516 B1).

Los fragmentos de anticuerpos se pueden hacer mediante diversas técnicas, que incluyen pero no se limitan a la digestión proteolítica de anticuerpos intactos, así como la producción de células anfitrionas recombinantes (p. ej. E. coli o fago), tal como se describe en este documento.

3. Anticuerpos quiméricos y humanizados

En determinadas representaciones, un anticuerpo provisto en el presente es un anticuerpo quimérico. Se describen ciertos anticuerpos quiméricos, p. ej., en la patente de EE.UU. N.° 4.816.567; y Morrison et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855

(1984)). En un ejemplo, un anticuerpo quimérico consta de una región variable no humana (p. ej., una región variable derivada de un ratón, una rata, un hámster, un conejo, o un primate no humano, como un mono) y una región constante humana. En otro ejemplo, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo con conmutación de clase en el que la clase o subclase se ha modificado respecto de la del anticuerpo primario. Los anticuerpos quiméricos incluyen fragmentos de unión de antígenos de los mismos.

En determinadas representaciones, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo humanizado. Generalmente, un anticuerpo no humano es humanizado para reducir la inmunogenicidad a los seres humanos, al tiempo que mantiene la especificidad y afinidad del anticuerpo parental no humano. Por lo general, un anticuerpo humanizado consta de uno o más dominios variables en los que las HVR, p. ej., las CDR (o partes de las mismas) derivan de un anticuerpo no humano, y las FR (o partes de las mismas) derivan de secuencias de anticuerpos humanos. Un anticuerpo humanizado opcionalmente puede abarcar al menos una porción de una región constante humana. En algunas representaciones, algunos residuos de la FR en un anticuerpo humanizado se sustituyen con los correspondientes residuos de un anticuerpo no humano (p. ej., el anticuerpo del que derivan los residuos de la HVR), p. ej., para restaurar o mejorar la especificidad o afinidad de los anticuerpos.

Los anticuerpos humanizados y los métodos para hacerlos se revisan p. ej., en Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008), y se describen, p. ej., en Riechmann et al*., Nature* 332:323-329 (1988); Queen et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86:10029-10033 (1989); las patentes de EE.UU. N.° 5.821.337, 7.527.791, 6.982.321, y 7.087.409; Kashmiri *et al*., *Methods* 36:25-34 (2005) (describen la región que determina la especificidad [SDR]); Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489-498 (1991) (describe "recubrimiento"); Dall'Acqua et al., *Methods* 36:43-60 (2005) (describe "intercambio de FR"); y Osbourn et al., *Methods* 36:61-68 (2005) y Klimka et al., *Br. J. Cancer*, 83:252-260 (2000) (describe el enfoque de "selección guiada" al intercambio de FR).

Las regiones de estructura humana que pueden ser utilizadas para humanización incluyen, pero no se limitan a: regiones del marco seleccionadas utilizando el método "más adecuado" (vea, p. ej., Sims et al. *J. Immunol.* 151:2296 (1993)); regiones del marco derivadas de la secuencia de consenso de anticuerpos humanos de un subgrupo particular de regiones variables de cadena pesada o liviana (vea p. ej., Carter et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); y Presta et al. *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)); regiones del marco humanas maduras (mutadas somáticamente) o regiones del marco germinal humano (vea p. ej., Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)); y regiones del marco derivadas de genotecas de FR de detección (vea p. ej., Baca et al., *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684 (1997) y Rosok et al., *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618 (1996)).

4. Anticuerpos humanos

En determinadas representaciones, un anticuerpo provisto en el presente es un

anticuerpo humano. Los anticuerpos humanos pueden producirse mediante el uso de varias técnicas conocidas en la materia. Los anticuerpos humanos se describen a grandes rasgos en van Dijk y van de Winkel, *Curr. Opin. Farmacol.* 5: 368-74 (2001) y Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20:450-459 (2008).

Los anticuerpos humanos pueden ser preparados mediante la administración de un inmunógeno a un animal transgénico que haya sido modificado para producir anticuerpos humanos intactos o anticuerpos intactos con regiones variables humanas en respuesta a un desafío antigénico. Estos animales suelen contener la inmunoglobulina humana loci, o una parte de ella, que sustituye a la inmunoglobulina loci endógena, o que se presenta extracromosomalmente o se integra de forma aleatoria en los cromosomas del animal. En estos ratones transgénicos, la inmunoglobulina endógena loci generalmente ha sido inactivada. Para la revisión de los métodos para la obtención de anticuerpos humanos de animales transgénicos, vea Lonberg, Nat. *Biotech.* 23:1117-1125 (2005). Vea también, p. ej., las patentes de EE.UU. N.° 6.075.181 y 6.150.584 que describen la tecnología XENOMOUSETM; la patente de EE.UU. N.° 5.770.429 que describe la tecnología HuMab®; la patente de EE.UU. N.° 7.041.870 que describe la tecnología K-M MOUSE® y la publicación de presentación de patente de EE.UU. N.° 2007/0061900, que describe la tecnología VelociMouse®). Las regiones variables humanas de anticuerpos intactos generados por estos animales pueden sufrir más modificaciones, p. ej., combinándolas con una región constante humana diferente.

Los anticuerpos humanos también pueden hacerse por métodos basados en hibridomas. También se han descrito las líneas celulares de mieloma humano y heteromielona humano-ratón para la producción de anticuerpos monoclonales humanos. (Vea, p. ej., Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pág. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987); y Boerner et al., *J. Immunol*., 147: 86 (1991).) Los anticuerpos humanos generados mediante la tecnología de hibridomas de células B humanas también se describen en Li et al*., Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006). Otros métodos incluyen los descritos, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N.° 7.189.826 (que describe la producción de anticuerpos IgM monoclonales humanos de líneas celulares hibridomas) y Ni, *Xiandai Mianyixue*, 26(4):265-268 (2006) (que describe los hibridomas humanos-humanos). La tecnología de hibridomas humanos (tecnología Trioma) también se describe en Vollmers and Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005) y Vollmers and Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3):185-91 (2005).

Los anticuerpos humanos también pueden generarse aislando secuencias de dominio variable de clones Fv seleccionados de genotecas de exhibición de fagos derivados de humanos. Tales secuencias de dominio variable pueden combinarse con un dominio constante humano deseado. A continuación se describen las técnicas para la selección de anticuerpos humanos de genotecas de anticuerpos.

5. Anticuerpos derivados de genotecas

Los anticuerpos de la invención pueden ser aislados seleccionando genotecas combinatorias de anticuerpos con la actividad o las actividades deseadas. Por ejemplo, una variedad de métodos son conocidos en la materia por generar genotecas de exhibición de fagos y seleccionar esas genotecas para los anticuerpos que reúnan las características de unión deseadas. Se revisan tales métodos, p. ej., en Hoogenboom et al. en *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) y se describen p. ej., en the McCafferty et al., *Nature* 348:552-554; Clackson et al., *Nature* 352: 624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Marks and Bradbury, en *Methods in Molecular Biology* 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004); and Lee et al., *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132(2004).

En ciertos métodos de exhibición de fagos, repertorios de genes de VH y VL son clonados por separado mediante reacción en cadena de polimerasa (PCR) y recombinados aleatoriamente en las genotecas de fagos, que luego pueden ser examinadas para fagos de unión de antígenos tal como se describe en Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Generalmente, los fagos presentan fragmentos de anticuerpos, ya sea fragmentos de cadena simple Fv (scFv) o fragmentos Fab. Las genotecas de fuentes inmunizadas proporcionan anticuerpos de alta afinidad al inmunógeno sin el requisito de desarrollo de hibridomas. Por otra parte, el repertorio no tratado previamente puede clonarse (p. ej., del ser humano) para proporcionar una fuente única de anticuerpos a una amplia variedad de antígenos propios y no propios sin ningún tipo de inmunización, tal como se describe en Griffiths et al., EMBO J, 12: 725-734 (1993). Finalmente, las genotecas no tratadas previamente pueden también hacerse sintéticamente por clonación de los segmentos no reordenados del gen V de las células madre y usando los iniciadores de PCR que contienen una secuencia aleatoria para codificar las regiones CDR3 altamente variables y lograr un reordenamiento in vitro, tal como se describe en Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992). Las publicaciones de patentes que describen las genotecas de fagos de anticuerpos humanos incluyen, por ejemplo: patente de EE.UU N.° 5.750.373, y las patentes de publicación de EE.UU N.° 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936, y 2009/0002360.

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos aislados de las genotecas de anticuerpos humanos se consideran anticuerpos humanos o fragmentos de anticuerpos humanos en este documento.

6. Anticuerpos multiespecíficos

En cualquiera de los aspectos anteriores, el anticuerpo anti-CD3 que se proporciona en este documento, por ejemplo, es un anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos

multiespecíficos son anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión para al menos dos sitios diferentes. En ciertas representaciones, los anticuerpos biespecíficos pueden unirse a dos epítopes diferentes de CD3 (p. ej., CD3ε o CD3γ). En ciertas representaciones, una de las especificidades de unión es para CD3 (p. ej., CD3ε o CD3γ) y la otra es para cualquier otro antígeno (p. ej., una segunda molécula biológica, p. ej., un antígeno celular de superficie, p. ej., un antígeno tumoral). Por consiguiente, un anticuerpo biespecífico anti-CD3 puede tener especificidades de unión para CD3 y una segunda molécula biológica, como una segunda molécula biológica (p. ej., un antígeno tumoral) incluido en la tabla 1 y descrito en la publicación de EE.UU. N.° 2010/0111856.

TABLA 1. Receptores de los antígenos tumorales de los anticuerpos biespecíficos anti-CD3 de la invención

CD20	CD79a	ETBR	IL13Ralpha 2	M-CSF	P2X5	SSX-2
0772P	CD79b	proteína de fusión ETV6-AML1	IL20Rα	MCSP	p53	SSX-4
adipofilina	Cdc27	EZH2	carboxilesterasa intestinal	mdm-2	PAP	STEAP1
AIM-2	CDK4	FcRH1	IRTA2	MDP	PAX5	STEAP1
ALDH1A1	CDKN2A	FcRH2	Calicreína 4	ME1	PBF	STEAP2
alfa actinina 4	CEA	FcRH5	KIF20A	Melan-A / MART-1	PMEL17	survivina
alfafetoproteína	CLL1	FLT3-ITD	KK-LC-1	Meloe	proteína de fusión pml-RARalpha	proteína de fusión SYT-SSX1 o -SSX2
B7-H4	Cw6	GDNF-Ra1	Lengsin	MSG783	PSMA	TGF-betaRII
BAFF-R	CXCR5	GEDA	LGR5	MUC1	PTPRK	TMEFF1
BAGE-1	CXORF61	GFRA1	LY64	MUC5AC	RAB38 / NY-MEL-1	TMEM118
BCLX (L)	ciclina D1	glipicano-3	Ly6E	mucina	RAGE-1	TMEM46
Proteína	Ciclina	GnTVf	Ly6G6D	MUM-1f	RBAF600	TRAG-3

CD22	EpCAM	HERV-K-MEL	MAGE-A9	NY-BR-1	SIRT2	XAGE-1b/GAGED2a
CD33	EphA3	HLA-DOB	MAGE-C1	NY-ESO-1/LAGE-2	SLC35D3	EGFR-T790M;
CD45	EphB2R	hsp70-2	MAGE-C2	OA1	SNRPD1	BMPR1B
CD70	Epiregulin	IDO1	mamaglobin a-A	OGT	SOX10	
CD72	EGFR	IGF2B3	MART2	OS-9	Sp17	
EGFR-G719A	EGFR-G719C;	EGFR-G719S;	EGFR-L858R	EGFR-S768I	EGFR-L861Q	

para CD3 y una segunda molécula biológica que comprende un complejo HLA-péptido seleccionado del grupo constituido por 0772P (CA125, MUC16; GenBank n.° de adhesión AF36148); adipofilina (Perilipina-2, proteína relacionada con la diferenciación adiposa, ADRP, ADFP, MGC10598; secuencia de referencia NCBI: NP_001113.2); AIM-2 (ausente en melanoma 2, PYHIN4, proteína inducible por interferón AIM2; secuencia de referencia NCBI: NP_004824.1); ALDH1A1 (aldehido deshidrogenasa familia 1, miembro A1,

ALDH1, PUMB1, retinaldehido deshidrogenasa 1, ALDC, ALDH-E1, ALHDII, RALDH 1, CE 1.2.1.36, ALDH11, HEL-9 HEL-S-53e, HEL12, RALDH1, acetaldehido deshidrogenasa 1, aldehido deshidrogenasa 1, soluble, aldehido deshidrogenasa, hígado citosólico, ALDH clase 1, proteína luminal epidídimo 12, proteína luminal epidídimo 9, proteína de unión del esperma secretora del epidídimo Li 53e, retinal deshidrogenasa 1, RalDH1, aldehido deshidrogenasa familia 1 miembro A1, aldehido deshidrogenasa, citosólica, CE 1.2.1; secuencia de referencia NCBI: NP_000680.2); alfa-actinina-4 (ACTN4 actinina, Alfa 4, FSGS1, 1 de glomeruloesclerosis segmentaria focal, alfa-actinina 4 no muscular, proteína de unión cruzada F-actina, FSGS, actinina-4, actinina Alpha4 isoforma, alfa-actinina-4; secuencia de referencia NCBI: NP_004915.2); alfa-fetoproteína (AFP, HPAFP, FETA, alfa-1-fetoproteína, alfa-fetoglobulina, alfa-1-fetoproteína, alfa-fetoglobulina, HP; GenBank: AAB58754.1); Anfiregulina (AREG, SDGF, Factor de crecimiento derivado de schwanoma, factor de crecimiento derivado de las células del colorecto, AR, CRDGF; GenBank: AAA51781.1); ARTC1 (ART1, ADP-Ribosiltransferasa 1, Mono (ADP-ribosil) transferasa 1, ADP-Ribosiltransferasa C2 y C3 tipo toxina 1, ART2, CD296, RT6, ADP-Ribosiltransferasa 2, NAD ligado a GPI (+)--arginina ADP-Ribosiltransferasa 1, EC 2.4.2.31, antígeno de CD296; NP); ASLG659; ASPHD1 (aspartato beta-hidroxilasa que contiene 1 dominio, aspartato beta-hidroxilasa que contiene dominio de proteína 1, EC 1.14.11.-, EC 1.14.11; GenBank: AAI44153.1); B7-H4 (VTCN1, inhibidor de activación de células T 1 que contiene dominio V-Set, B7H4, miembro de la superfamilia B7 1, proteína inmunitaria coestimuladora B7-H4, B7h.5, molécula coestimuladora de células T B7x, B7S1, B7X, VCTN1, H4, B7 miembro de la familia, PRO1291, B7 miembro de la familia, H4, molécula coestimuladora de células T B7x, inhibidor de activación de células T 1 que contiene dominio V-Set, proteína B7S1; GenBank: AAZ17406.1); BAFF-R (TNFRSF13C, superfamilia de receptores de factor de necrosis tumoral, miembro 13C, BAFFR, receptor del factor de activación de células B, receptor BAFF, receptor 3 BLyS, CVID4, BROMIX, CD268, receptor del factor de activación de células B, prolixin, miembro de la superfamilia receptora del factor de necrosis tumoral 13C, BR3, antígeno de CD268; secuencia de referencia NCBI: NP_443177.1); BAGE-1; BCLX (L); proteína de fusión BCR-ABL (b3a2); beta-catenina (CTNNB1 catenina (proteína asociada a la caderina), Beta 1, 88kDa, CTNNB, MRD19, catenina (proteína asociada a la caderina), Beta 1 (88kD), armadillo, beta catenina-1; GenBank: CAA61107.1); BING-4 (WDR46, WD repetir dominio 46, C6orf11, BING4, proteína BING4 con repetición de WD, cromosoma 6 marco abierto de lectura 11, FP221, UTP7, proteína 46 con repetición de WD; NP); BMPR1B (receptor tipo IB de proteínas morfogenéticas de hueso, acceso de Genbank n.º NM_00120; NP); B-RAF (Brevican (BCAN, BEHAB, acceso de Genbank n.º AF22905); Brevican (BCAN proteoglicano Condroitín sulfato 7, proteína de unión Hyaluronan enriquecida cerebro, BEHAB, CSPG7, Brevican de proteoglicanos, proteína base Brevican, sulfato de condroitina Proteoglycan BEHAB; GenBank: AAH27971.1); CALCA (polipéptido alfa relacionado a polipéptido, CALC1, calcitonina 1, calcitonina, alfa-tipo CGRP, péptido Calcitonin relacionado al gen I, CGRP-I, CGRP, CGRP1, CT, KC, polipéptido

relacionados con calcitonina y calcitonina, alfa, katacalcin; NP); CASP-5 (CASP5, caspasa 5, cisteína peptidasa relacionada a apoptosis, caspasa 5, cisteína-proteasa relacionada a apoptosis, proteasa ICH-3, proteasa TY, ICE (rel)-III, III ICE (rel), ICEREL-III, ICH-3, caspasa-5, TY proteasa, CE 3.4.22.58, ICH3, EC 3.4.22; NP); CASP-8; CD19 (CD19 - antígeno del linfocito b CD19 isoforma 2 precursor, B4, CVID3 [Homo sapiens], secuencia de referencia NCBI: NP_001761.3); CD20 (CD20 - antígeno de linfocitos b CD20, 4-dominios que atraviesan la membrana, subfamilia A, miembro 1, B1, Bp35, CD20, CVID5, LEU-16, MS4A2, S7; Secuencia de Referencia NCBI: NP_690605.1); CD21 (CD21 (CR2 (receptor de complemento o C3DR (receptor de C3d/Epstein Barr virus) o acceso de Genbank Hs.73792 n.º M2600); (CD22 (B-célula receptor CD22-B isoforma, BL-CAM Lyb-8, Lyb8, SIGLEC-2, FLJ22814, acceso de Genbank n.º AK02646); CD22; CD33 (molécula CD33, antígeno CD33 (Gp67), ácido siálico vinculante Ig-símil lectina 3, ácido siálico vinculante Ig-símil lectina 3, SIGLEC3, gp67, SIGLEC-3, células mieloides superficie antígeno CD33, p67, Siglec-3, antígeno CD33; GenBank: AAH28152.1); CD45; CD70 (CD70 - superfamilia de factores de necrosis tumoral (ligando) miembro 7; antígeno de superficie CD70; Antígeno Ki-24; CD27 Ligando; CD27-L; miembro de la superfamilia de tumor necrosis factor ligand 7; NCBI secuencia de referencia para la especie homo sapiens: NP_001243.1); CD72 (CD72 (antígeno de diferenciación celular B CD72, Lyb-; 359 aa, pI: 8.66, MW: 40225 TM: 1 [P] Cromosoma del gen: 9p13.3, acceso de Genbank n.º NP_001773.); CD79a (CD79a (CD79A, CD79a, asociada a la inmunoglobulina alfa, una proteína específica de células B que covalentemente interactúa con beta Ig (CD79B) y forma un complejo en la superficie con las moléculas de Ig M, transmite una señal implicados en la diferenciación de células B), pI: 4.84, MW: 25028 TM: 2 [P] Cromosoma del gen: 19q13.2, acceso a Genbank n.º NP_001774.1); CD79b (CD79b (CD79B, CD79b, IGb (asociada a la inmunoglobulina beta), B29, acceso a Genbank n.º NM_000626 o 1103867); Cdc27 (ciclo de división celular 27, D0S1430E, D17S978E, subunidad 3 de complejo de promoción de anafase, subunidad 3 de complejo de promoción de anafase, ANAPC3, APC3, CDC27Hs, H-NUC, homólogo del CDC27, homólogo del ciclo 27 de división celular (S. Cerevisiae), HNUC, NUC2, complejo de promoción de anafase, proteína 3, homólogo del ciclo 27 de división celular, homólogo de proteína 27 del ciclo de división celular, homólogo del Nuc2; GenBank: AAH11656.1); Cdk4 (quinasa dependiente de ciclina 4, quinasa de proteína de división de células 4, PSK-J3, CE 2.7.11.22, CMM3, EC 2.7.11; Secuencia de Referencia NCBI: NP_000066.1); CDKN2A (Inhibidor 2A de quinasa dependiente de ciclina, MLM, CDKN2, MTS1, Inhibidor 2A de quinasa dependiente de ciclina (Melanoma, P16, Inhibe CDK4), Inhibidor A de quinasa 4 dependiente de ciclina, Supresor 1 de tumores múltiples, CDK4I, MTS-1, CMM2, P16, ARF, INK4, INK4A, P14, P14ARF, P16-INK4A, P16INK4, P16INK4A, P19, P19ARF, TP16, Inhibidor CDK4 P16-INK4, Reguladores beta negativos de ciclo celular, p14ARF, p16-INK4, p16-INK4a, p16INK4A, p19ARF; NP); CEA; CLL1 (CLL-1 (CLEC12A, MICL, y DCAL, codifica un miembro de la superfamilia de dominio lectina tipo C/similar a lectina tipo C (CTL/CTLD). Los miembros de esta familia comparten un pliegue proteico y tienen

distintas funciones, tales como adhesión de las células, señalización célula-célula, recambio de glucoproteína y funciones en la respuesta inflamatoria e inmune. La proteína codificada por este gen es una reguladora negativa de la función granulocito y monocito. Se han descrito variantes del transcrito de este gen con empalme alternativo, pero no se ha determinado la naturaleza en toda su extensión de algunas de estas variantes. El gen está relacionado de cerca con otros miembros de la superfamilia CTL/CTLD en la región del complejo de genes asesinos naturales en el cromosoma 12p13 (Drickamer K Curr. Opin. Struct. Biol. 9):585–90; van Rhenen A, et ál, Blood 110):2659–66; Chen CH, et ál. Blood 107):1459–67; Marshall AS, et ál. Eur. J. Immunol. 36):2159–69; Bakker AB, et ál Cancer Res. 64 :8443–50; Marshall AS, et ál J. Biol. Chem. 279 :14792–80. Se ha demostrado que CLL-1 es un receptor transmembrana de tipo 2 que comprende un único dominio similar a lectina tipo C (no se prevé que el mismo se una al calcio o al azúcar), la región del tallo, un dominio transmembrana y una cola citoplásmica corta que contiene un motivo ITIM); CLPP (Subunidad proteolítica de peptidasa de matriz mitocondrial caseinolítica, Endopeptidasa Clp, EC 3.4.21.92, PRLTS3, Proteasa ClpAP dependiente de ATP (E. Coli), Homólogo ClpP (Proteasa caseinolítica, Dependiente de ATP, Subunidad proteolítica, E. Coli), Peptidasa caseinolítica ClpP, Dependiente de ATP, Subunidad proteolítica homóloga (E. Coli), Proteasa caseinolítica ClpP, Dependiente de ATP, Subunidad proteolítica homóloga (E. Coli), humana, Subunidad proteolítica, Proteasa ClpAP dependiente de ATP, Subunidad proteolítica, Humana, Peptidasa caseinolítica ClpP dependiente de ATP, Subunidad proteolítica, Peptidasa caseionolítica ClpP, Dependiente de ATP, Subunidad proteolítica homóloga, Subunidad proteolítica de proteasa Clp dependiente de ATP putativo, Mitocondrial; NP); COA-1; CPSF; CRIPTO (CRIPTO (CR, CR1, CRGF, CRIPTO, TDGF1, factor de crecimiento derivado de teratocarcinoma, acceso de Genbank n.° NP_003203 o NM_00321); Cw6; CXCR5 CXCR5 (receptor 1 de linfoma de Burkitt, un receptor acoplado con proteína G que es activado por la quimioquina CXCL13, cumple funciones en la migración de linfocitos y defensa humoral, tiene un rol en la infección HIV-2 y quizás en desarrollo de SIDA, linfoma, mieloma y leucemia); 372 aa, pI: 8.54 MW: 41959 TM: 7 [P] Cromosoma del gen: 11q23.3, acceso Genbank n.° NP_001707.); CXORF61 CXORF61 - cromosoma X marco abierto de lectura 61[Homo sapiens], Referencia de secuencia NCBI: NP_001017978.1); ciclina D1 (CCND1, BCL1, PRAD1, D11S287E, CLL de células B/Linfoma 1, Proteína de linfoma 1 de células B, Oncogene BCL-1, Oncogene PRAD1, Ciclina D1 (PRAD1: Adenomatosis paratiroidea 1), Ciclina D1 específica de G1/S, Adenomatosis paratiroidea 1, U21B31, Ciclina D1 específica de G1/S, BCL-1; Referencia de secuencia NCBI : NP_444284.1); Ciclina-A1 (CCNA1, CT146, Ciclina A1; GenBank: AAH36346.1); proteína de fusión dek-can; DKK1 (Inhibidor 1 de vía de señalización Dickkopf WNT, SK, hDkk-1, Homólogo 1 Dickkopf (Xenopus Laevis), Homólogo Dickkopf 1 (Xenopus Laevis), DKK-1, Homólogo Dickkopf 1, Proteína 1 relacionada con Dickkopf, Símil Dickkopf-1, Proteína 1 símil Dickkopf, Proteína 1 relacionada con Dickkopf, Dickkopf-1, Dkk-1; GenBank: AAQ89364.1); DR1 (Regulador descendiente de transcrito 1, enlace TBP (Cofactor

negativo 2), Cofactor negativo 2-Beta, Fosfoproteína asociada con proteína con enlace TATA, NC2, NC2-BETA, Proteína Dr1, NC2-beta, Regulador descendiente de transcrito 1; Referencia de secuencia NCBI: NP_001929.1); DR13 (Complejo mayor de histocompatibilidad, Clase II, DR Beta 1, HLA-DR1B, DRw10, DW2.2/DR2.2, SS1, DRB1, HLA-DRB, Antígeno de histocompatibilidad HLA Clase II, Cadena DR-1 Beta, Antígeno de leucocito humano DRB1, Antígeno linfocito DRB1, Antígeno MHC Clase II, Cadena MHC Clase II HLA-DR Beta 1, Glucoproteína de superficie celular MHC Clase II HLA-DR, MHC Clase II HLA-DRw10-Beta, DR-1, DR-12, DR-13, DR-14, DR-16, DR-4, DR-5, DR-7, DR-8, DR-9, DR1, DR12, DR13, DR14, DR16, DR4, DR5, DR7, DR8, DR9, DRw11, DRw8, HLA-DRB2, Clon P2-Beta-3, Antígeno DRB1*1 MHC Clase II, Antígeno DRB1*10 MHC Clase II, Antígeno DRB1*11 MHC Clase II, Antígeno DRB1*12 MHC Clase II, Antígeno DRB1*13 MHC Clase II, Antígeno DRB1*14 MHC Clase II, Antígeno DRB1*15 MHC Clase II, Antígeno DRB1*16 MHC Clase II, Antígeno DRB1*3 MHC Clase II, Antígeno DRB1*4 MHC Clase II, Antígeno DRB1*7 MHC Clase II, Antígeno DRB1*8 MHC Clase II, Antígeno DRB1*9 MHC Clase II; NP); E16 (E16 (LAT1, SLC7A5, acceso Genbank n.° NM_00348); EDAR (EDAR - precursor EDAR miembro de la superfamilia de receptores de factor de necrosis de tumor, receptor EDA-A1; homólogo downless; receptor de ectodisplasina A; receptor de displasia ectodérmica; receptor 1 de ectodisplasina anhidrótica, DL; ECTD10A; ECTD10B; ED1R; ED3; ED5; EDA-A1R; EDA1R; EDA3; HRM1 [Homo sapiens]; Referencia de secuencia NCBI: NP_071731.1); EFTUD2 (Factor de elongación Tu GTP de enlace del dominio contenedor 2, Factor de elongación Tu GTP de enlace del dominio contenedor de proteína 2, hSNU114, Homólogo SNU114, Proteína específica de U5 SnRNP, 116 KDa, MFDGA, KIAA0031, 116 KD, Proteína específica de U5 SnRNP, Componente ribonucleico nuclear pequeño 116 KDa U5, MFDM, SNRNP116, Snrp116, Snu114, U5-116KD, SNRP116, U5-116 KDa; GenBank: AAH02360.1); EGFR (Receptor de factor de crecimiento epidérmico, ERBB, Proto-Oncogene C-ErbB-1, Receptor de tirosina-proteína quinasa ErbB-1, ERBB1, HER1, EC 2.7.10.1, Receptor de factor de crecimiento epidérmico (Leucemia eritroblástica aviar viral (V-Erb-B) Oncogene Homólogo), Leucemia eritroblástica viral (V-Erb-B) Oncogene Homólogo (Aviar), PIG61, Leucemia eritroblástica aviar viral (V-Erb-B) Oncogene Homólogo, Proteína 40 inhibidora de crecimiento celular, Proteína 61 de inducción de proliferación celular, mENA, EC 2.7.10; GenBank: AAH94761.1); EGFR-G719A ; EGFR-G719C; EGFR-G719S; EGFR-L858R; EGFR-L861Q; EGFR-S768I; EGFR-T790M; Factor de elongación 2 (EEF2, Factor de elongación 2 de traducción eucariota, EF2, Translocasa polipeptidilo-TRNA, EF-2, SCA26, EEF-2; Referencia de secuencia NCBI: NP_001952.1); ENAH (hMena) (Homólogo habilitado (Drosophila), MENA, Habilitado mamíferos, ENA, NDPP1, Homólogo habilitado de proteína; GenBank: AAH95481.1) – resultados sólo para “ENAH” y no “ENAH (hMena)”; EpCAM (Molécula de adhesión de células epiteliales, M4S1, MIC18, Transductor 1 de la señal de calcio asociado a tumores, TACSTD1, TROP1, Antígeno asociado a adenocarcinoma, Glucoproteína Trop-1 de superficie celular, Gruproteína epitelial 314, Proteína GA733-2 asociada a tumor gastrointestinal severo, EGP314, KSA, DIAR5,

HNPCC8, Antígeno identificado por anticuerpo monoclonal AUA1, EGP-2, EGP40, ESA, KS1/4, MK-1, Glucoproteína 2 epitelial humana, Componente de membrana, Cromosoma 4, Marcador superficial (35kD Glycoprotein), EGP, Ep-CAM, GA733-2, M1S2, CD326 Antígeno, Antígeno de superficie de células epiteliales, hEGP314, Antígeno KS 1/4, ACSTD1; GenBank: AAH14785.1); EphA3 (EPH Receptor A3, ETK1, ETK, TYRO4, HEK, Tirosina quinasa 1 símil Eph, Receptor ETK1 de tirosina-proteína quinasa, EK4, Quinasa 4 símil EPH, EC 2.7.10.1, EPHA3, HEK4, Receptor 3 efrina tipo A, Quinasa 1 de embrión humano, Proteína tirosina quinasa TYRO4, hEK4, Quinasa de embrión humano, Tirosina-proteína quinasa TYRO4, EC 2.7.10; GenBank: AAH63282.1); EphB2R ; Epirregulina (EREG, ER, proepirregulina; GenBank: AAI36405.1); ETBR (EDNRB, Receptor de endotelina tipo B, HSCR2, HSCR, Receptor de endotelina tipo no selectivo, ET-B, ET-BR, ETRB, ABCDS, WS4A, ETB, Receptor de endotelina B; NP); proteína de fusión ETV6-AML1; EZH2 (Potenciadora de zeste homólogo 2 (Drosophila), Lisina N-metiltransferasa 6, ENX-1, KMT6 EC 2.1.1.43, EZH1, WVS, Potenciadora de zeste homólogo 2 (Drosophila), ENX1, EZH2b, KMT6A, WVS2, Histona-lisina N-metiltransferasa EZH2, Potenciadora de zeste homólogo 2, EC 2.1.1; GenBank: AAH10858.1); FcRH1 (FCRL1, Símil receptor Fc 1, FCRH1, Receptor Fc homólogo 1, Proteína 1 símil FcR, Proteína 5 asociada a la translocación del receptor inmune, IFGP1, IRTA5, hIFGP1, Proteína 1 de familia IFGP, CD307a, Proteína 1 símil receptor Fc, Receptor Fc de superfamilia de inmunoglobulina, Gp42, FcRL1, Antígeno CD307a; GenBank: AAH33690.1); FcRH2 (FCRL2, Símil receptor Fc 2, SPAP1, Dominio SH2 con proteína 1 de anclaje de fosfatasa, Receptor Fc homólogo 2, Proteína 2 símil FcR, Proteína 4 asociada a translocación del receptor de inmunoglobulina, FCRH2, IFGP4, IRTA4, Proteína 4 de familia IFGP, SPAP1A, SPAP1B, SPAP1C, CD307b, Proteína 2 símil receptor Fc, Proteína 4 asociada a translocación del receptor inmune, Receptor Fc de superfamilia de inmunoglobulina, Gp42, Dominio SH2 con proteína 1 de anclaje de fosfatasa, FcRL2, Antígeno CD307b; GenBank: AAQ88497.1); FcRH5 (FCRL5, Símil 5 receptor Fc, IRTA2, Receptor Fc homólogo 5, Proteína 5 símil FcR, Proteína 2 asociada a translocación del receptor inmune, BXMAS1, FCRH5, CD307, CD307e, PRO820, Proteína 5 símil receptor Fc, Translocación asociada 2 de receptor de superfamilia de inmunoglobulina (IRTA2), FcRL5, CD307e Antígeno; GenBank: AAI01070.1); FLT3-ITD; FN1(Fibronectina 1, Globulina insoluble en frío, FN, Factor de estimulación de migración, CIG, FNZ, GFND2, LETS, ED-B, FINC, GFND, MSF, fibronectina; GenBank: AAI43764.1); G250 (MN, CAIX, Anhidrasa carbónica IX, Deshidratasa carbónica, Proteína G250 asociada a RCC, Carbonato deshidratasa IX, Membrana antígena MN, Antígeno G250 asociado a carcinoma celular renal, CA-IX, P54/58N, pMW1, Antígeno G250 asociado a RCC, Anhidrasa carbónica 9; NP); - resultados para “G250” y no “G250 / MN / CAIX”; GAGE-1,2,8; GAGE-3,4,5,6,7; GDNF-Ra1 (receptor alfa 1 de la familia GDNF; GFRA1; GDNFR; GDNFRA; RETL1; TRNR1; RET1L; GDNFR-alpha1; GFR-ALPHA-; U95847; BC014962; NM_145793 NM_005264); GEDA (acceso Genbank n.° AY26076); GFRA1 - receptor alfa 1 de la familia GDNF; receptor alfa 1 GDNF; GDNFR-alpha-1; GFR-alpha-1; ligando 1 RET; Factor neurotrópico receptor 1 relacionado con

TGF-beta [Homo sapiens]; ProtKB/Swiss-Prot: P56159.2; glipicano-3 (GPC3, Glipicano 3, SDYS, Glipicano proteoglicano 3, Proteína intestinal OCI-5, GTR2-2, MXR7, SGBS1, DGSX, OCI-5. SGB, SGBS, Proteoglicano de sulfato de heparán, Glipicano 3 secretado, OCI5; GenBank: AAH35972.1); GnTVf ; gp100 (PMEL, Proteína premelanosoma, SILV, D12S53E, PMEL17, SIL, Proteína melanocita Pmel 17, Antígeno GP100 específico para línea de melanocitos, Antígeno ME20 asociado a melanomas, Proteína homóloga locus plata, ME20-M, ME20M, P1, P100, Símil plata (Homólogo ratón), Homólogo plata (ratón), ME20, SI, Proteína melanocita Mel 17, Proteína melanocita PMEL, Martiz melanosomal Proteína17, Plata, Ratón, Homólogo de; GenBank: AAC60634.1); GPC; GPNMB (Glucoproteína (Transmembrana) Nmb, Glucoproteína NMB, Proteína símil glucoproteína Nmb, osteoactivina, Glucoproteína transmembrana HGFIN, HGFIN, NMB, Glucoproteína transmembrana, Glucoproteína transmembrana NMB; GenBank: AAH32783.1); GPR172A (receptor 172A acoplado con proteína G; GPCR41; FLJ11856; D15Ertd747e); NP_078807.1; NM_024531.3); GPR19 (receptor 19 acoplado con proteína G; Mm.478; NP_006134.1; NM_006143.2); GPR54 (receptor KISS1; KISS1R; GPR54; HOT7T175; AXOR1; NP_115940.2; NM_032551.4); HAVCR1 (Receptor celular 1 de virus de hepatitis A, Inmunoglobulina de células T miembro 1 de la familia mucina, Molécula 1 de lesión renal, KIM-1, KIM1, TIM, TIM-1, TIM1, TIMD-1, TIMD1, Receptor 1 de inmunoglobulina mucina de células T, Proteína 1 de membranas de células T, HAVCR, HAVCR-1, Dominio de inmunoglobulina de células T y Proteína 1 de dominio de mucina, HAVcr-1, Inmunoglobulina de células T y Dominio de mucina con proteína 1; GenBank: AAH13325.1); HER2 (ERBB2, V-Erb-B2 Leucemia eritroblástica aviar viral oncogene homólogo 2, NGL, NEU, Oncogene homólogo derivado de neuro/glioblastoma, Proteína de gen 19 de nodo linfático metastásico, Proto-Oncogene C-ErbB-2, Proto-Oncogene Neu, Receptor HER2 de superficie celular tipo tirosina quinasa, MLN 19, p185erbB2, EC 2.7.10.1, V-Erb-B2 Leucemia eritroblástica aviar viral oncogene homólogo 2 (Oncogene homólogo derivado de neuro/glioblastoma), CD340, HER-2, HER-2/neu, TKR1, Proteína C-Erb B2/Neu, herstatina, Oncogene homólogo derivado de neuroblastoma/glioblastoma, Receptor tirosina-proteína quinasa ErbB-2, V-Erb-B2 Leucemia eritroblástica viral oncogene homólogo 2, Oncogene homólogo derivado de neuro/glioblastoma, MLN19, Antígeno CD340, EC 2.7.10; NP); HER-2 / neu – sobrenombre del anterior; HERV-K-MEL ; HLA-DOB (Subunidad beta de la molécula MHC clase II (Antígeno Ia) que liga los péptidos y los une con CD4+ linfocitos T); 273 aa, pI: 6.56, MW: 30820.TM: 1 [P] Cromosoma del gen: 6p21.3, acceso Genbank n.° NP_002111); hsp70-2 (HSPA2, Proteína 2 de golpe de calor 70kDa, Proteína 2 de golpe de calor 70kD, HSP70-3, Proteína 2 asociada con golpe de calor 70 KDa, Proteína 2 de golpe de calor 70 KDa; GenBank: AAD21815.1); IDO1 (Indolamina 2,3-Dioxigenasa 1, IDO, INDO, Indolamina-Pirrol 2,3-Dioxigenasa, IDO-1, Indolamina-Pirrol 2,3 Dioxigenasa, Indolamina 2,3 Dioxigenasa, Indole 2,3 Dioxigenasa, EC 1.13.11.52; Referencia de secuencia NCBI: NP_002155.1); IGF2B3 ; IL13Ralpha2 (IL13RA2, Receptor de interleucina 13, Alfa 2, Antígeno 19 cancer/testículos, Proteína de enlace de interleucina

13, IL-13R-alfa-2, IL-13RA2, IL-13 Subunidad receptora alfa-2, IL-13R Subunidad alfa-2, CD213A2, CT19, IL-13R, IL13BP, Proteína de enlace de interleucina 13, Cadena alfa 2 receptora de interleucina 13, Subunidad alfa 2 receptora de interleucina, IL13R, Antígeno CD213a2; NP); IL20Rα; Carboxilesterasa intestinal; IRTA2 (sobrenombre de FcRH5); Kallikrein 4 (KLK4, Peptidasa 4 relacionada con Kallikrein, PRSS17, EMSP1, Serina proteinasa 1 de la matriz de esmalte, Proteína 1 símil Kallikrein, Serina proteasa 17, KLK-L1, PSTS, AI2A1, Kallikrein 4 (Prostasa, Matriz de esmalte, Próstata), ARM1, EMSP, Mensaje 1 regulado por andrógenos, Serina proteasa 1 de la matriz de esmalte, kallikrein, kallikrein-4, prostasa, EC 3.4.21.-, Prostasa, EC 3.4.21; GenBank: AAX30051.1); KIF20A (Miembro 20A de la familia de quinesina, RAB6KIFL, Interactuación de RAB6, Símil quinesina (Rabkinesin6), Mitotic a; LAGE-1; Proteína LDLR-fusión de fucosiltransferasas; Lengsin (LGSN, Lengsin, Proteína de cristalino con dominio de glutamina sintetasa, GLULD1, Dominio de glutamato-amoníaco ligasa con Proteína 1, LGS, Dominio contenedor 1 de glutamato-amoníaco ligasa (Glutamina sintetasa), Dominio contenedor 1 de glutamato-amoníaco ligasa, Símil glutamina sintetasa de cristalino; GenBank: AAF61255.1); LGR5 (repetición rica en leucina con receptor 5 acoplado con proteína G; GPR49, GPR6; NP_003658.1; NM_003667.2; LY64 (Antígeno linfocitos 64 (RP10, proteína de membrana de tipo I de la familia de repetición rica en leucina (LRR), regula la activación de las células B y la apoptosis, la pérdida de funciones está asociada con un incremento de enfermedades en pacientes con lupus eritematoso sistémico); 661 aa, pI: 6.20, MW: 74147 TM: 1 [P] Cromosoma del gen: 5q12, acceso Genbank n.° NP_005573.; Ly6E (complejo linfocito antígeno 6, locus E; Ly67,RIG-E,SCA-2,TSA-; NP_002337.1; NM_002346.2); Ly6G6D (complejo linfocito antígeno 6, locus G6D; Ly6-D, MEGT; NP_067079.2; NM_021246.2); LY6K (complejo linfocito antígeno 6, locus K; LY6K; HSJ001348; FLJ3522; NP_059997.3; NM_017527.3); dominio LyPD1 - LY6/PLAUR conteniendo 1, PHTS [Homo sapiens], GenBank: AAH17318.1); MAGE-A1 (Familia A de antígenos de melanoma, 1 (Controla la expresión del antígeno MZ2-E, MAGE1, Familia A 1 de antígenos de melanoma, MAGEA1, Antígeno de melanoma MAGE-1, Antígeno 1 asociado a melanoma, Antígeno MZ2-E asociado a melanoma, Antígeno MZ2-E, Antígeno 1.1 cancer/testículos, CT1.1, Antígeno MAGE-1, Familia 1 de antígenos cancer/testículos, Miembro 1, Familia 1 de antígenos cancer/testículos, Miembro 1, MAGE1A; Referencia de secuencia NCBI: NP_004979.3); MAGE-A10 (MAGEA10, Familia A de antígenos de melanoma, 10, MAGE10, Antígeno MAGE-10, Antígeno 10 asociado a melanoma, Antígeno 1.10 cancer/testículos, CT1.10, Familia 1 de antígenos cancer/testículos, Miembro 10, Familia 1 de antígenos cancer/testículos, Miembro 10; Referencia de secuencia NCBI: NP_001238757.1); MAGE-A12 (MAGEA12, Familia A de antígenos de melanoma, 12, MAGE12, Antígeno 1.12 cancer/testículos, CT1.12, Antígeno MAGE12F, Familia 1 de antígenos cancer/testículos, Miembro 12, Familia 1 de antígenos cancer/testículos, Miembro 12, Antígeno 12 asociado a melanoma, Antígeno MAGE-12; Referencia de secuencia NCBI: NP_001159859.1); MAGE-A2 (MAGEA2, Familia A de antígenos de melanoma, 2, MAGE2, Antígeno 1.2 cancer/testículos, CT1.2, MAGEA2A,

Antígeno MAGE-2, Familia 1 de antígenos cancer/testículos, Miembro 2, Familia 1 de antígenos cancer/testículos, Miembro 2, Antígeno 2 de melanoma, Antígeno 2 asociado a melanoma; Referencia de secuencia NCBI: NP_001269434.1); MAGE-A3 (MAGEA3, Familia A de antígenos de melanoma, 3, MAGE3, Antígeno MAGE-3, Antígeno MZ2-D, Antígeno 3 asociado a melanoma, Antígeno 1.3 cancer/testículos, CT1.3, Familia 1 de antígenos cancer/testículos, Miembro 3, HIP8, HYPD, MAGEA6, Familia 1 de antígenos cancer/testículos, Miembro 3; Referencia de secuencia NCBI: NP_005353.1); MAGE-A4 (MAGEA4, Familia A de antígenos de melanoma, 4, MAGE4, Antígeno 4 asociado a melanoma, Antígeno 1.4 cancer/testículos, CT1.4, Antígeno MAGE-4, Antígeno MAGE-41, Antígeno MAGE-X2, MAGE4A, MAGE4B, Familia 1 de antígenos cancer/testículos, Miembro 4, MAGE-41, MAGE-X2, Familia 1 de antígenos cancer/testículos, Miembro 4; Referencia de secuencia NCBI: NP_001011550.1); MAGE-A6 (MAGEA6, Familia A de antígenos de melanoma, 6, MAGE6, Antígeno MAGE-6, Antígeno 6 asociado a melanoma, Antígeno 1.6 cancer/testículos, CT1.6, Antígeno MAGE3B, Familia 1 de antígenos cancer/testículos, Familia A 6 de antígenos de melanoma, Miembro 6, MAGE-3b, MAGE3B, Familia 1 de antígenos cancer/testículos, Miembro 6; Referencia de secuencia NCBI: NP_787064.1); MAGE-A9 (MAGEA9, Familia A de antígenos de melanoma, 9, MAGE9, Antígeno MAGE-9, Antígeno 9 asociado a melanoma, Antígeno 1.9 cancer/testículos, CT1.9, Familia 1 de antígenos cancer/testículos, Miembro 9, Familia 1 de antígenos cancer/testículos, Miembro 9, MAGEA9A; Referencia de secuencia NCBI: NP_005356.1); MAGE-C1 (MAGEC1, Familia C de antígenos de melanoma, 1, Antígeno 7.1 cancer/testículos, CT7.1, Antígeno MAGE-C1, Familia 7 de antígenos cancer/testículos, Miembro 1, CT7, Familia 7 de antígenos cancer/testículos, Miembro 1, Antígeno C1 asociado a melanoma; Referencia de secuencia NCBI: NP_005453.2); MAGE-C2 (MAGEC2, Familia C de antígenos de melanoma, 2, MAGEE1, Antígeno 10 cancer/testículos, CT10, HCA587, Familia E de antígenos de melanoma, 1, Específico de cancer/testículos, Antígeno 587 asociado a carcinoma hepatocelular, Antígeno MAGE-C2, Antígeno MAGE-E1, Hepatocellular Cancer Antígeno 587 de cancer hepatocelular, Antígeno C2 asociado a melanoma; Referencia de secuencia NCBI: NP_057333.1); mamaglobina-A (SCGB2A2, Secretoglobina, Familia 2A, Miembro 2, MGB1, Mamaglobina 1, UGB2, Mamaglobina A, mamaglobina-A, mamaglobina-1, Familia Secretoglobina 2A Miembro 2; NP); MART2 (HHAT, Aciltransferasa de puercoespín, SKI1, Antígeno de melanoma reconocido por células T 2, Proteína 1 de puercoespín flaco, Skn, Antígeno de melanoma reconocido por células T 2, Proteína-cisteína N-palmitoiltransferasa HHAT, EC 2.3.1.-; GenBank: AAH39071.1); M-CSF (CSF1, Estimulante de colonia factor 1 (Macrófago), MCSF, CSF-1, lanimostim, Factor 1 de estímulo de colonia de macrófago humano, Lanimostim; GenBank: AAH21117.1); MCSP (SMCP, Proteína rica en cisteína asociada a la mitocondria del espermatozoide, MCS, Selenoproteína de cápsula mitocondrial, HSMCSGEN1, Proteína rica en cisteína asociada a la mitocondria del espermatozoide; Referencia de secuencia NCBI: NP_109588.2); XAGE-1b/GAGED2a; WT1 (Tumor 1 de Wilms, WAGR, GUD, WIT-2, WT33, Dominio amino-terminal de EWS, NPHS4, Últimos tres dedos de zinc

del dominio de enlace de ADN de WT1, AWT1, Proteína de tumor de Wilms, EWS-WT1; GenBank: AAB33443.1); VEGF; Tirosinasa (TYR; OCAIA; OCA1A; tirosinasa; SHEP; NP_000363.1; NM_000372.4; GenBank: AAB60319.1); TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, posible canal de catión del receptor transitorio, subfamilia M, miembro 4, acceso de Genbank n.º NM_01763); TRP2-INT2; TRP-2 ; TRP-1 / gp75 (Proteína 1 relacionada a la tirosinasa, 5,6-dihidroxindol-2-Oxidasa ácido carboxílico, CAS2, CATB, TYRP, OCA3, Catalasa B, PROTEÍNA b, glucoproteína 75, CE 1.14.18., Antígeno Melanoma Gp75, TYRP1, TRP, TYRRP, TRP1, SHEP11, Oxidasa DHICA, CE 1.14.18, GP75, CE 1.14.18.1; Triosa fosfato isomerasa (Triosa fosfato isomerasa 1, TPID, Triosa fosfato isomerasa, HEL-S-49, TIM, Proteína secreción epidídimo Li 49, TPI, Triosa fosfato isomerasa, CE 5.3.1.1; TRAG-3 (Miembro de la familia CSAG 2, Familia de antígeno Cáncer/Testículos 24, CSAG3B, Miembro 2, Miembro de la familia CSAG 3B, Familia de antígeno Cáncer/Testículos 24 Miembro 2, Antígeno Cáncer/Testículos 24.2, Gen asociado a la condrosarcoma 2/3 Proteína, Proteína asociada resistente a Taxol Gen 3, Gen asociado a la condrosarcoma 2/3 proteína-símil, CT24.2, Gen 3 asociado resistente a Taxol, TRAG-3, CSAG3A, TRAG3;); TMEM46 (homólogo 2 shisa (Xenopus laevis); SHISA; NP_001007539.1; NM_001007538.1; TMEM118 (proteína dedo angular, transmembrana2; RNFT2; FLJ1462; NP_001103373.1; NM_001109903.1; TMEFF1 (proteína transmembrana con EGF-símil y dos dominios folistatina-símil 1; Tomoregulin- ; H7365; C9orf2; C9ORF2; U19878; X83961; NM_080655; NM_003692; TGF-betaRII (TGFBR2, factor de crecimiento transformador, Receptor Beta II (70/80kDa), TGFbeta-RII, MFS2, tbetaR-II, TGFR-2, Receptor TGF-Beta Tipo IIB, Receptor TGF-Beta Tipo II, Receptor TGF-Beta Tipo 2, EC 2.7.11.30, Receptor beta de factor de crecimiento transformador tipo IIC, AAT3, TbetaR-II, factor de crecimiento transformador, Receptor beta II (70-80kD), Receptor TGF-Beta tipo II, FAA3, Receptor beta de factor de crecimiento transformador tipo III, LDS1B, HNPCC6, LDS2B, LDS2, RIIC, CE 2.7.11, TAAD2; TENB2 (TMEFF2, tomoregulin, TPEF, HPP1, TR, proteoglican transmembranosos putativo, relacionado a la familia EGF/heregulina de factores de crecimiento y folistatina); 374 aa, Accesión NCBI: AAD55776, AAF91397, AAG49451, NCBI RefSeq: NP_057276; Gen NCBI: 23671; OMIM: 605734; SwissProt Q9UIK5; Acceso de Genbank N.º AF179274; AY358907, CAF85723, CQ782436; TAG-2; TAG-1 (Contactin 2 (Axonal), TAG-1, AXT, Molécula de adhesión celular Axonin-1, TAX, Contactin 2 (expresada transitoriamente), TAX1, Contactin-2, Glucoproteína axonal TAG-1, Glucoproteína axona expresada transitoriamente, Glucoproteína axonal transitoria, Axonin-1, TAX-1, TAG1, FAME5; PRF: 444868); SYT-SSX1 o -SSX2 proteína de fusión; survivin; STEAP2 (HGNC_8639, IPCA-1, PCANAP1, STAMP1, STEAP2, STMP, gen 1 asociado al cáncer de próstata, proteína 1 asociada al cáncer de próstata, seis antígenos epiteliales de próstata 2, seis proteínas de próstata transmembrana, Genbank accession no. AF45513; STEAP1 (seis antígenos epiteliales de próstata, Acceso de Genbank n.º NM_01244; SSX-4; SSX-2 (SSX2, Sarcoma sinovial, X Breakpoint2, X Breakpoint 2, SSX, X Breakpoint 2B, Antigeno Cáncer/Testículos 5.2, X-Cromosoma-Relacionado 2, Antígeno tumoral HOM-MEL-40,

CT5.2, HD21, Antígeno Cáncer/Testículos Familia 5, HOM-MEL-40, Isoforma B, Antígeno Cáncer/Testículos Familia 5 miembro 2a, miembro 2a, Proteína SSX2, Sarcoma, Sarcoma, Sinovial, X-Cromosoma-Relacionada 2, sinovial, Sarcoma sinovial, X Breakpoint 2B, Sarcoma sinovial, SSX2A; Sp17; SOX10 (SRY (Región determinadora de sexo Y)-Box 10, ratón, PCWH, DOM, WS4, WS2E, WS4C, Megacolon dominante, ratón, Homologo humano de, Megacolon dominate, SRY-relacionado HMG-Box Gen 10, Homologo humano de,Factor de transcripción SOX-10; GenBank: CAG30470.1); SNRPD1 (pequeña ribonucleoproteina nuclear D1, pequeña ribonucleoproteina nuclear D1, polipéptido 16kDa, polipéptido (16kD), SNRPD, HsT2456, Sm-D1, SMD1, Sm-D autoantígeno, pequeña ribonucleoproteina nuclear D1 polipéptido 16kDa Pseudogene, SnRNP Proteína principal D1, pequeña ribonucleoproteina nuclear Sm D1; SLC35D3 (soluto compañía familia 35, miembro D3, FRCL1, Proteína de conexión limítrofe-símil 1, bA55K22.3, Frc, Límite-símil 1, soluto compañía familia 35 miembro D3; NCBI GenBank: NC_000006.11 NC_018917.2 NT_025741.16); SIRT2 (Sirtuina 2, NAD-dependiente deacetilasa sirtuin-2, SIRL2, silencio información regulatorio 2, Proteína reguladora SIR2 Homólogo 2, Proteína Sir2-Relacionada yipo 2, Proteína 2 SIR2-símil, Sirtuina tipo 2, Sirtuina (Regulación de información de tipo de apareamiento silencioso 2 homóloga) 2 (S.Cerevisiae), Sirtuina-2, Sirtuina (Regulación de información de tipo de apareamiento silencioso 2, S.Cerevisiae, Homóloga) 2, CE 3.5.1., SIR2; GenBank: AAK51133.1); Sema 5b (FLJ10372, KIAA1445, Mm.42015, SEMA5B, SEMAG, Semaforina 5b Hlog, dominio sema, siete repeticiones de trombospondina (tipo 1 y tipo 1-símil), dominio transmembrana (TM) y dominio citoplásmico corto, (semaforina) 5B, acceso de Genbank n.º AB04087; secernina 1 (SCRN1, SES1, KIAA0193, secerina-1; GenBank: EAL24458.1); SAGE (SAGE1, Antígeno sarcoma 1, Antígeno Cáncer/Testículos 14, CT14, Antígeno de tumor putativo; Secuencia de referencia NCBI: NP_061136.2); RU2AS (KAAG1, Antígeno asociado al riñón 1, RU2AS, RU2 Proteína del gen antisentido, Antígeno asociado al riñón 1; GenBank: AAF23613.1); RNF43 - E3 ligasa ubiquitina-proteína RNF43 precursor [Homo sapiens], RNF124; URCC; Secuencia de referencia: NP_060233.3; RhoC (;RGS5 (Regulador de señalización de proteína-G 5, MSTP032, Regulador de señalización de proteína-G 5, MSTP092, MST092, MSTP106, MST106, MSTP129, MST129; GenBank: AAB84001.1); RET (proto-oncogen RET; MEN2A; HSCR1; MEN2B; MTC1; PTC; CDHF12; Hs.168114; RET51; RET-ELE; NP_066124.1; NM_020975.4); RBAF600 (UBR4, ligasa proteína ubiquitina E3 componente N-Recognin 4, dedo de zinc, UBR1 Type 1, ZUBR1, E3 ligasa ubiquitina-proteína UBR4, RBAF600, Factor 600 KDa retinoblastoma asociada a la proteína, Proteína 1 dedo de zinc tipo UBR1, EC 6.3.2., N-recognin-4, KIAA0462, p600, CE 6.3.2, KIAA1307; GenBank: AAL83880.1); RAGE-1 (MOK, proteína quinasa MOK, Antígeno del tumor renal, RAGE, MAPK/MAK/MRK quinasa superpuesta, Antígeno del tumor renal 1, Antígeno del carcinoma de células renales, RAGE-1, CE 2.7.11.22, RAGE1; UniProtKB/Swiss-Prot: Q9UQ07.1); RAB38 / NY-MEL-1 (RAB38, NY-MEL-1, RAB38, Miembro RAS familia oncógena, Antígeno del melanoma NY-MEL-1, Proteína de unión de GTP relacionada aRab, Proteína relacionada a Ras Rab-38, rrGTPbp; GenBank:

AAH15808.1); PTPRK (DJ480J14.2.1 (Fosfatasa tirosina de proteína, Tipo receptor, K R-PTP-KAPPA, Kappa Fosfatasa tirosina de proteína, Kappa Fosfatasa tirosina de proteína), Fosfatasa tirosina de proteína, Tipo receptor, K, Kappa Fosfatasa tirosina de proteína, Fosfatasa tirosina de proteína, Tipo receptor, Kappa, R-PTP-kappa, Kappa Fosfatasa tirosina de proteína tipo receptor, CE 3.1.3.48, PTPK; GenBank: AAI44514.1); PSMA; PSCA hlg(2700050C12Rik, C530008O16Rik, RIKEN cDNA 2700050C12, RIKEN cDNA 2700050C12 gen, acceso de Genbank n.º AY358628); PSCA (Procursor del antígeno de células madre de la próstata, acceso de Genbank n.º AJ29743; ; PRDX5 (Peroxiredoxina 5, CE 1.11.1.15, TPx Tipo VI, B166, Enzima antioxidante B166, HEL-S-55, Tejido del hígado página 2D punto 71B, PMP20, Enzima antioxidante peroxisoma, PRDX6, Tioredoxina peroxidasa PMP20, PRXV, AOEB166, Proteína secretora de epidermis Li 55, Alu co-represor 1, Peroxiredoxina-5, Mitocondrial, Peroxiredoxina V, prx-V, Tioredoxina Reductasa, Prx-V, ACR1, Alu Corepressor, PLP; GenBank: CAG33484.1); PRAME (Antígeno expresado preferencialmente en melanoma, Antígeno expresado preferencialmente del melanoma, MAPE, OIP-4, OIPA, CT130, Antígeno Cáncer/Testículos 130, Antígeno melanoma expresado preferiblemente en tumores, Proteína de interacción con Opa 4, Proteína de interacción con Opa 4; GenBank: CAG30435.1); proteína de fusión pml-RARalpha; PMEL17 (homólogo plata; SILV; D12S53E; PMEL17; SI; SIL); ME20; gp10 BC001414; BT007202; M32295; M77348; NM_006928; PBF (ZNF395, proteína de dedo de zinc 395, PRF-1, Regulatorio de la enfermedad de Huntington, Proteína de unión de región regulatoria del gen HD, Proteína 2 de union de región, Proteínna 2, Factor 1 regulatorio del virus del papiloma, factor 2 regulatorio de HD, Factor regulatorio del virus del papiloma, PRF1, HDBP-2, Si-1-8-14, HDBP2, Proteína 2 de unión de región regulatoria del gen de la enfermedad de Huntington 2, HDRF-2, Factor PRF-1 regulatorio del virus del papiloma, PBF; GenBank: AAH01237.1); PAX5 (Paired Box 5, Gen 5 homeótico Paire5, BSAP, caja pareada de proteína Pax-5, Activador específico del linaje celular, Gen 5 de dominio pareado, caja pareada de gen 5 (Proteína activadora específica del linaje de células B), factor de transcripción específico de células B, caja pareada de gen 5 (activador específico del linaje de células B); PAP (REG3A, Alfa 3 derivado de islote regenerador, INGAP, PAP-H, Proteína pancreática Hepatointestinal, PBBCGF, Péptida de islote pro humana, REG-III, Proteína 1 asociada a la pancreatitis, Reg3, Reg III-Alfa, páncreas-intestinal-hepatocarcinoma, Proteína regeneradora derivada de islote III-Alfa, Factor de crecimiento celular Beta pancreático, HIP, Proteína PAP homóloga, HIP/PAP, Proteína inductora de proliferación 34, PAP1, Proteína inductora de proliferación 42, REG-3-alfa, Proteína regeneradora derivada de islote 3-Alfa, Proteína asociada a la Pancreatitis; GenBank: AAH36776.1); p53 (TP53, Proteína de tumores P53, TPR53, P53, Antígeno de tumor celular P53, Antígeno NY-CO-13, Proteína de tumor mutante 53, Fosfoproteína P53, P53 Supresor de tumores, BCC7, Proteína relacionada a la transformación 53, LFS1, Proteína de tumor 53, Síndrome Li-Fraumeni, Supresor de tumores P53; P2X5 (Receptor purinérgico P2X canal 5 con ventanas ligando, un canal de ion con ventana por ATP

extracelular, puede estar involucrado en la transmisión sináptica y la neurogénesis, la insuficiencia puede contribuir a la patofisiología de la inestabilidad del detrusor idiopático); 422 aa), pI: 7.63, MW: 47206 TM: 1 [P] Cromosoma del gen: 17p13.3, Acceso de GenBank N.º NP_002552.; OGT (Vinculado-O N-acetilglucosamina (GlcNAc) transferasa, O- GlcNAc transferasa P110 Subunidad, Vinculado-O N-acetilglucosamina (GlcNAc) transferasa (UDP-N-acetilglucosamina: Polipéptido-N-acetilglucosaminil transferasa, UDP-N-Acetylglucosamine--péptido N- acetilglucosaminiltransferasa 110 KDa Subunidad, UDP-N-acetilglucosamina: polipéptido-N-acetilglucosaminil transferasa, Difosfouridina-N-acetilglucosamina: polipéptido Beta-N-acetilglucosaminil transferasa, O- GlcNAc transferasa Subunidad P110, CE 2.4.1.255, Vinculado-O N-acetilglucosamina transferasa 110 KDa Subunidad, CE 2.4.1, HRNT1, CE 2.4.1.186, O-GlcNAc; GenBank: AAH38180.1); OA1 (Osteoartritis QTL 1, OASD; GenBank: CAA88742.1); NY-ESO-1/LAGE-2 (cáncer/testículo antígeno 1B, CTAG1B, NY-ESO-1, LAGE- 2, ESO1, CTAG1, CTAG, LAGE2B, antígeno cáncer/testículo 1, Antígeno cáncer/testículo Autoimmunogénico NY- ESO-1, Antígeno ancer 3, antígeno cáncer/testículo 6,1, Carcinoma de células escamosas del esófago Nueva York 1, L antígeno miembro de la Familia 2, LAGE2, CT6.1, LAGE2A; GenBank: AAI30365.1); NY-BR-1 (ANKRD30A, Dominio repetido Ankirina 30A, antígeno cáncer de pecho NY- BR- 1, Antígeno de cáncer de seno definido serológicamente NY-BR-1, Proteína con contenido de dominio repetido Ankirina 30A; Secuencia de Referencia NCBI: NP_443723.2); N-ras (NRAS, neuroblastoma RAS virales (V-Ras) Homólogo oncogen, NRAS1, Transformando la Proteína N-Ras, GTPase ANR, ALPS4, Proteína N-Ras Parte 4, NP6, Homólogo oncogen, HRAS1; GenBank: AAH05219.1); FJCN (factor de transcripción nuclear Y, Gamma, Hap5, HSM, Factor de transcripción nuclear Y Subunidad C, transactivador HSM-1/2 media, CCAAT subunidad de unión al factor C, NF-YC, CCAAT de transcripción de unión factor subunidad gamma, caja CAAT ADN-proteína de unión subunidad C, Subunidad de grandes dimensiones 2A del factor de unión de transcripción Histona H1, CBFC, Factor de transcripción nuclear Y subunidad gamma, CBF-C, transactivador HSM-1, H1TF2A, factor de transcripción NF-Y, C subunidad; neo-PAP (PAPOLG, Poly (A) polimerasa gamma, Neo-poli (A) polimerasa, Nuclear poli (A) polimerasa gamma, Polinucleótido adeniltransferasa gamma, SRP ARN 3" Enzima adelinato PAP2, PAP-gamma, Neo-PAP, SRP ARN 3" Enzima adelinato, PAP2, CE 2.7.7.19, PapG; Secuencia de Referencia NCBI: NP_075045.2); NCA (CEACAM6, acceso de GenBank n.º M1872); Napi3b (NAPI-3B, NPTIIb, Slc34a2, familia transportista de soluto 34 (fosfato de sodio), miembro 2, tipo II transportador de fosfato 3b dependiente de sodio, acceso de GenBank n.º NM_00642); Miosina clase I; MUM-3; MUM-2 (TRAPPC1, Subunidad 1 compleja de partículas de proteína de tráfico, BET5, Homólogo de BET5, MUM2, melanoma ubicuo mutado 2, Proteína de mieloma múltiple 2, Subunidad 1 compleja de partículas de proteína de tráfico; MUM-1f ; mucina (MUC1, mucina 1, célula superficiales asociadas, PEMA, PUM, CA 15-3, MCKD1, ADMCKD, Enfermedad de riñón medular quística 1 (autosómica dominante), ADMCKD1, mucina 1, transmembrana, CD227, Antígeno asociado al

carcinoma de seno DF3, MAM6, Antígeno de cáncer 15-3, MCD (Documento de Control de Materiales), Carcinoma asociada mucina, MCKD, Krebs Von Den Lungen-6, MUC-1/SEC, Mucina urinaria reactiva al maní, MUC1/ZD, Antígeno de emembrana epitelial asociada a tumores, Antígeno DF3, Mucina asociada a tumores, episialin, EMA, Antígeno de H23, H23AG, mucina-1, KL-6, Mucina epitelial asociada a tumores, MUC-1, Episialin, PEM, Antígeno CD227; UniProtKB/Swiss-Prot: P15941.3); MUC5AC (mucina 5AC, moco/formadores de gel oligoméricico, mucina traqueobronquial, MUC5, TBM, mucina 5, subtipos A y C, traqueobronquial/gástrico, LEB, mucina gástrica, mucina 5AC, pseudogen moco/formadores de gel oligomérico, antígeno del grupo de sangre Lewis B, LeB, vías respiratorias de la glucoproteína principales, MUC- 5AC, mucina 5 subtipo AC, traqueobronquial; MUC1 (mucina 1, superficie celular asociada, PEMA, PUM, CA 15-3, MCKD1, ADMCKD, enfermedad quística medular renal 1 (autosómica dominante), ADMCKD1, mucina 1, transmembrana, CD227, antígeno DF3 asociado al carcinoma de seno, MAM6, antígeno de cáncer 15-3, MCD (Documento de Control de Materiales), mucina asociada al carcinoma, MCKD, Krebs Von Den Lungen-6, MUC1/SEC, mucina urinaria reactiva al maní, MUC-1/X, mucina epithelial polimórfica, MUC1/ZD, antígeno de membrana epithelial asociado a tumores, antígeno DF3, mucina asociada a tumores, episialin, EMA, antígeno de h23, H23AG, mucina-1, KL-6, mucina epithelial asociada a tumores, MUC1, Episialin, PEM, antígeno de CD227; ; MSG783 (RNF124, proteína hipotética FLJ20315, acceso de GenBank n.º NM-01776; MRP4 - proteína 4 isoforma 3 asociada a la resistencia a múltiples fármacos, MOAT-B; MOATB [Homo sapiens]; Secuencia de Referencia NCBI: NP_001288758.1; MPF (MPF, MSLN, SMR, megacariocitos potenciando el factor, mesothelin, Genbank adhesión no. NM_00582; MMP-7 (MMP7, matrilysin, MPSL1, matrin, 7 metaloproteinasa de la matriz (útero, Matrilysin), Matrilysin uterina, metaloproteinasa de la matriz-7, CE 3.4.24.23, bomba-1 proteasa, Matrin, Metaloproteinasa uterina, PUMP1, MMP-7, CE 3.4.24, bomba-1; GenBank: AAC37543.1); MMP-2 (MMP2, matriz curación 2 (gelatinasa A, 72kDa gelatinasa, 72kDa tipo colagenasa IV), MONA, CLG4A, metaloproteinasa de la matriz 2 (gelatinasa A, 72kD gelatinasa, 72kD tipo colagenasa IV), CLG4, 72kDa gelatinasa, 72kDa tipo colagenasa IV), matriz metaloproteinasa-2, MMP-II, 72 KDa gelatinasa, colagenasa tipo IV-A, MMP-2, metaloproteinasa de la matriz-II, TBE-1, gelatinasa neutrófila, CE 3.4.24.24, CE 3.4.24; GenBank: AAH02576.1); y Meloe.

Por ejemplo, en algunas situaciones, un anticuerpo anti CD3 que tiene un primer dominio de unión puede comprender al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis regiones hipervariables (RHV) que se seleccionan de (a) una RHV-H1 que consta en una secuencia de aminoácidos con N°. de ID de SEC.: 1; (b) una RHV-H2 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.° de ID de SEC.: 2; (c) una RHV-H3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 3; (d) una RHV-L1 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 4; (e) una RHV-L2 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 5; y (f) una RHV-L3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 6, como 40G5c, puede tener un segundo dominio

de unión que se une con CD20.

En algunas situaciones, un anticuerpo anti CD3 que tiene un primer dominio de unión puede comprender al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis regiones hipervariables (RHV) que se seleccionan de (a) una RHV-H1 que consta en una secuencia de aminoácidos con N°. de ID de SEC.: 1; (b) una RHV-H2 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.° de ID de SEC.: 2; (c) una RHV-H3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 3; (d) una RHV-L1 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 4; (e) una RHV-L2 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 5; y (f) una RHV-L3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 6, como 40G5c, puede tener un segundo dominio de unión que se une con HER2. El segundo dominio de unión que se liga con HER2 puede, por ejemplo, comprender de al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis regiones hipervariables (RHV) que se seleccionan de (a) una RHV-CD20 que consta en una secuencia de aminoácidos con N°. de ID de SEC.: 169; (b) una RHV-H2 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.° de ID de SEC.: 170; (c) una RHV-H3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 171; (d) una RHV-L1 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 172; (e) una RHV-L2 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 173; y (f) una RHV-L3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 174, como las que tiene el anticuerpo anti HER2, hu4D5. En algunas situaciones, el segundo dominio de unión que une HER2 contiene al menos una (p.ej., 1, 2, 3, o 4) de las regiones del marco de las cadenas pesadas FR-H1, FR-H2, FR-H3, y FR-H4 que consiste en las secuencias de N.º de ID de SEC.: 549-552, respectivamente, y/o al menos una (p.ej., 1, 2, 3, o 4) de las regiones del marco de la cadena liviana FR-L1, FR-L2, FR-L3, y FR-L4 que consiste en las secuencias de N.º de ID de SEC.: 553-556, respectivamente. En algunas situaciones, el segundo dominio de unión que se liga con HER2 puede, por ejemplo, comprender de (a) un dominio de VH que consta de una secuencia de animoácidos que tiene al menos una identidad de secuencia del 90% (p.ej., con una identidad de secuencia de al menos el 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%) con, o la secuencia de, N.° de ID de SEC.: 270; (b) un dominio de VL que consta de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una identidad de secuencia del 90% (p.ej., con una identidad de secuencia de al menos el 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%) con, o la secuencia de, N.° de ID de SEC.: 271; o (c) un dominio de VH como en (a) y un dominio de VL como en (b).

En algunas situaciones, un anticuerpo anti CD3 que tiene un primer dominio de unión puede comprender al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis regiones hipervariables (RHV) que se seleccionan de (a) una RHV-H1 que consta en una secuencia de aminoácidos con N°. de ID de SEC.: 7; (b) una RHV-H2 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.° de ID de SEC.: 8; (c) una RHV-H3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 9; (d) una RHV-L1 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 10; (e) una RHV-L2 que consiste en una secuencia de

aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 11; y (f) una RHV-L3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 12, como 38E4v1, puede tener un segundo dominio de unión que se une con HER2. El segundo dominio de unión que se liga con HER2 puede, por ejemplo, comprender de al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis regiones hipervariables (RHV) que se seleccionan de (a) una RHV-CD20 que consta en una secuencia de aminoácidos con N°. de ID de SEC.: 169; (b) una RHV-H2 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.° de ID de SEC.: 170; (c) una RHV-H3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 171; (d) una RHV-L1 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 172; (e) una RHV-L2 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 173; y (f) una RHV-L3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 174, como las que tiene el anticuerpo anti HER2, hu4D5. En algunas situaciones, el segundo dominio de unión que se liga con HER2 puede, por ejemplo, comprender de (a) un dominio de VH que consta de una secuencia de animoácidos que tiene al menos una identidad de secuencia del 90% (p. ej., con una identidad de secuencia de al menos el 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%) con, o la secuencia de, N.° de ID de SEC.: 270; (b) un dominio de VL que consta de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una identidad de secuencia del 90% (p. ej., con una identidad de secuencia de al menos el 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%) con, o la secuencia de, N.° de ID de SEC.: 271; o (c) un dominio de VH como en (a) y un dominio de VL como en (b).

.

En algunas versiones, también se pueden utilizar anticuerpos biespecíficos para localizar agentes citotóxicos en células que expresan un antígeno tumoral, como los antígenos tumorales que aparecen en la Tabla 1 (p. ej. CD20, FcRH5, HER2, LYPD1, LY6G6D, PMEL17, LY6E, CD19, CD33, CD22, CD79A, CD79B, EDAR, GFRA1, MRP4, RET, Steap1, o TenB2). También se pueden preparar anticuerpos biespecíficos como fragmentos o anticuerpos completos.

Entre las técnicas para crear anticuerpos específicos se encuentran, pero no se limitan a, coexpresión recombinante de dos pares de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina con especificidades diferentes (consulte Milstein y Cuello, *Nature* 305: 537 (1983)), WO 93/08829, y Traunecker et ál., *EMBO J.* 10: 3655 (1991)), ingeniería "botón en ojal" (consulte, p. ej., patente de EE.UU. N.° 5.731.168). Se puede utilizar la ingeniería de "botón en ojal" para generar un primer grupo que contenga un botón y un segundo grupo que contenga un ojal que se pueda unir con el botón del primer grupo. El botón de los anticuerpos mutiespecíficos de la invención puede estar en un grupo anti-CD3 en una versión. De forma alternativa, el botón de los anticuerpos mutiespecíficos de la invención puede estar en un grupo anti-objetivo/antígeno en una versión. El ojal de los anticuerpos mutiespecíficos de la invención puede estar en un grupo anti-CD3 en una versión. De forma alternativa, el ojal de los anticuerpos multiespecíficos de la invención puede estar en un grupo anti-objetivo/antígeno en una versión. También se pueden crear anticuerpos multiespecíficos con tecnología de cruzado de inmunoglobulina

(también conocida como intercambio de dominio Fab o formato CrossMab) (consulte p. ej., WO2009/080253; Schaefer et ál., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108:11187-11192 (2011)). También se pueden crear anticuerpos multiespecíficos por medio de efectos reguladores electrostáticos para la creación de moléculas heterodiméricas del Fc del anticuerpo (WO 2009/089004A1); con una unión cruzada de dos más anticuerpos o fragmentos (consulte, p. ej., patente de EE.UU. N.° 4.676.980, y Brennan et ál., Science, 229: 81 (1985)); con una cremallera de leucina para producir anticuerpos biespecíficos (consulte, p. ej., Kostelny et ál., J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992)); con tecnología "diacuerpo" para crear fragmentos de anticuerpo biespecíficos (consulte, p. ej., Hollinger et ál., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)); y con dímeros de fragmento Fv de cadena sencilla (sFv, por su sigla en inglés) (consulte, p. ej., Gruber et ál., J. Immunol., 152:5368 (1994)); y preparando anticuerpos triespecíficos como se indica, p. ej., en Tutt et ál. *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

Los anticuerpos creados con tres o más sitios de unión de antígenos funcionales, entre ellos los "anticuerpos pulpo", también se incluyen en este documento (consulte, p. ej., US 2006/0025576A1).

Estos anticuerpos, o sus fragmentos, también pueden incluir "fragmentos FAb de doble acción" o "DAF" (por su sigla en inglés) que constan de un sitio de unión de antígeno que se une a CD3 y a otro antígeno diferente (p. ej., una segunda molécula biológica) (consulte, p. ej., US 2008/0069820).

7. Variantes de Anticuerpos

Se contemplan en algunas versiones las variantes de las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos anti-CD3 de la invención (p. ej., los anticuerpos anti-CD3 biespecíficos de la invención que se unen a CD3 y a una segunda molécula biológica como, p. ej., el antígeno de superficie de una célula, p. ej., el antígeno de un tumor, como los anticuerpos TDB de la invención o las variantes correspondientes). Por ejemplo, se puede desear aumentar la afinidad de unión u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Se pueden preparar variantes de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo al ingresar las modificaciones apropiadas en la secuencia de nucleótidos que codifica al anticuerpo, o con una síntesis peptídica. Entre estas modificaciones se encuentran, por ejemplo, las eliminaciones de, o inserciones en o sustituciones de los residuos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Cualquier combinación de eliminación, inserción o sustitución puede llegar a la construcción final, siempre que la construcción final tenga las características esperadas, por ejemplo, unión de antígenos.

a. Variantes de Sustitución, Inserción y Eliminación

En algunas versiones, se incluyen las variantes de anticuerpos que tienen una o más sustituciones de aminoácidos. Entre los sitios de interés para la mutagénesis por sustitución se encuentran las RHV y FR. En la Tabla 2 aparecen las sustituciones conservadoras con el título "sustituciones preferidas". En la Tabla 2 se incluyen más

cambios considerables con el título “sustituciones ilustrativas”, y como se describe posteriormente en referencia a las clases de cadenas laterales de los aminoácidos. Se pueden introducir sustituciones de aminoácidos en un anticuerpo de interés y se pueden seleccionar los productos según la actividad deseada, por ejemplo, aumento/mantenimiento de la unión de antígenos, disminución en la inmunogenicidad o aumento de ADCC o CDC.

TABLA 2. Sustituciones de Aminoácidos Ilustrativas y Preferidas

Original Residuo	**Sustituciones Ilustrativas**	**Sustituciones Preferidas**
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

modificaciones (p. ej., mejoras) en ciertas propiedades biológicas (p. ej., aumento de la afinidad, disminución de la inmunogenicidad) relativas al anticuerpo original o habrá

conservado sustancialmente ciertas propiedades biológicas del anticuerpo original. Una variante de sustitución ilustrativa es un anticuerpo madurado por afinidad que puede generarse convenientemente, p. ej., con técnicas de maduración por afinidad por medio de fagos como las que se describen aquí. Brevemente, se mutan uno o dos residuos RHV y se presentan los anticuerpos variables en los fagos y se selecciona según cierta actividad biológica (p. ej., afinidad de unión).

Se pueden realizar alteraciones (p. ej., sustituciones) en las RHV, p. ej., para aumentar la afinidad de los anticuerpos. Se pueden realizar esas alteraciones en los "puntos de acceso" de RHV, p. ej., los residuos decodificados por codones que tienen una mutación en una frecuencia alta durante el proceso de maduración somática (consulte, p. ej., Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)), o residuos que contactan con los antígenos, con la prueba de afinidad de unión de la variación resultante de VH o VL. Maduración por afinidad construyendo y seleccionando de genotecas secundarias como se describe, p. ej., en Hoogenboom et ál en Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien et ál., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001).) En algunas versiones de maduración por afinidad, se introduce diversidad en los genes variables seleccionados para madurar con cualquiera de varios métodos (p. ej., RCP con tendencia al error, intercambio de cadenas o mutagénesis dirigida por oligonucleótidos). Entonces se crea una genoteca secundaria. Se examina la genoteca para identificar cualquier variante en los anticuerpos con la afinidad deseada. Otro método para introducir diversidad incluye un método dirigido por RHV, en el que se hacen aleatorios varios residuos RHV (p. ej., entre 4 y 6 residuos por vez). Los residuos RHV involucrados en la unión de antígenos pueden identificarse específicamente, p. ej., utilizando modelado o mutagénesis por barrido de alanina. Se suele concentrar sobre CDR-H3 y CDR-L3.

En algunas versiones, puede haber sustituciones, inserciones o eliminaciones dentro de una o mas RHV siempre que las alteraciones no reduzcan sustancialmente la habilidad del anticuerpo para unirse con el antígeno. Por ejemplo, se pueden convertir en RHV a las alteraciones conservadoras (p. ej., las sustituciones conservadoras que se incluyen aquí) que no reduzcan sustancialmente la afinidad de unión. Esas alternaciones pueden estar, por ejemplo, por fuera de residuos en contacto con antígenos en las RHV. En algunas versiones de la variante de las secuencias VH y VL que se mencionan antes, cada RHV no tiene alteración o contiene no más de una, dos o tres sustituciones de aminoácidos.

Un método útil para identificar los residuos o regiones de un anticuerpo que pueden ser objeto de mutagénesis se llama "mutagénesis por barrido de alanina" como describe Cunningham y Wells (1989) Science, 244:1081-1085. En este método, se identifica y reemplaza un residuo o grupo de residuos objetivo (p. ej., residuos cargados como arg, asp, his, lys y glu) con aminoácidos neutrales o con carga negativa (p. ej., alanina o polialanina) para determinar si se afecta la interacción del anticuerpo con el antígeno. Se pueden introducir más sustituciones en los sitios de los aminoácidos que demuestran

sensibilidad funcional a las sustituciones iniciales. Opcional, o adicionalmente, se puede agregar una estructura de cristal de un complejo antígeno-anticuerpo para identificar los puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Esos residuos de contacto o linderos pueden ser objeto o eliminarse como candidatos para la sustitución. Se pueden evaluar las variantes para determinar si contienen las propiedades deseadas.

Las inserciones en la secuencia de aminoácidos incluyen fusiones de amino o carboxilo terminales que puede variar desde un residuo hasta polipéptidos que contengan cientos de residuos, así como las inserciones intrasecuencia de uno o varios residuos de aminoácidos. Entre los ejemplos de las inserciones terminales se encuentra un anticuerpo con un residuo metionil N-terminal. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión de N- o C-terminal del anticuerpo con una enzima (p. ej., para ADEPT) o un polipéptido que aumenta la vida media del suero del anticuerpo.

b. Variantes de Glucosilación

En ciertas versiones, los anticuerpos anti-CD3 de la invención (p. ej., los anticuerpos anti-CD3 biespecíficos de la invención que se unen a CD3 y a una segunda molécula biológica como, p. ej., un antígeno de superficie celular, p. ej., el antígeno de un tumor, como los anticuerpos TDB de la invención o las variantes correspondientes) pueden alterarse para aumentar o disminuir cuanto se glucosila el anticuerpo. Se puede lograr agregar o eliminar sitios de glucosilación a un anticuerpo anti-CD3 de la invención alterando la secuencia de aminoácidos para que se creen o eliminen uno o más de los sitios de glucosilación.

Cuando el anticuerpo involucra una región Fc, se puede alterar el hidrato de carbono unido a él. Los anticuerpos nativos que producen las células de los mamíferos generalmente incluyen un oligosacárido biantenario y ramificado que por lo general se liga por una unión N- con Asn297 del dominio CH2 de la región Fc. Consulte, p. ej., Wright et ál. *TIBTECH* 15:26-32 (1997). El oligosacárido puede incluir varios hidratos de carbono, p. ej., manosa, N-acetilglucosamina (GlcNAc), galactosa y ácido siálico, así como una fucosa unida a un GlcNAc en la "raíz" de la estructura del oligosacárido biantenario. En algunas versiones, se pueden realizar las modificaciones del oligosacárido en un anticuerpo de la invención para crear variantes de anticuerpo con ciertas propiedades mejoradas.

En una versión, se incluyen las variantes del anticuerpo anti-CD3 que tienen una estructura de hidrato de carbono sin fucosa unida (directa o indirectamente) a una región Fc. Por ejemplo, la cantidad de fucosa en dicho anticuerpo puede variar entre 1% y 80%, 1% y 65%, 5% y 65% o 20% y 40%. La cantidad de fucosa se determina calculando la cantidad promedio de fucosa dentro de la cadena de azúcar en Asn297, en relación a la cantidad de glicoestructuras unidas a Asn297 (p. ej., estructuras complejas, híbridas y altas en manosa) como se mide con la espectrometría de masas MALDI-TOF, como se describe por ejemplo en WO 2008/077546. Asn297 hace referencia al residuo

de asparagina ubicado por la posición297 en la región Fc (numeración UE de los residuos de la región Fc); sin embargo, Asn297 también puede encontrarse ±3 aminoácidos arriba o abajo de la posición 297, o sea, entre las posiciones 294 y 300, por algunas variaciones menores en la secuencia de los anticuerpos. Dichas variantes fucolizadas podrían mejorar la función ADCC. Consulte, p. ej., presentación de patentes de EE.UU. N.° US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Entre los ejemplos de publicaciones relacionadas con variantes de anticuerpos "desfucolizados" o "deficientes en fucosa" se encuentran: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki et ál. *J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et ál. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004). Entre los ejemplos de líneas celulares capaces de producir anticuerpos desfucolizados se encuentran las células CHO Lec 13 sin fucolización de proteínas (Ripka et ál. *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); Presentación de patente de EE.UU. N.º US 2003/0157108 A1, Presta, L; y WO 2004/056312 A1, Adams *et ál*., en espacial en el ejemplo 11) y líneas celulares knockout, tales como el gen alfa-1,6-fucolsiltransferasa, *FUT8, células de* knockout CHO (consulte, por ejemplo a Yamane-Ohnuki et ál. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004); Kanda, Y. et ál*., Biotechnol. Bioeng*., 94(4):680-688 (2006); y WO2003/085107).

También se proporcionan variantes de los anticuerpos anti-CD3 con oligosacáridos bisectados, por ejemplo, en los cuales se bisecta con GIcNAc un oligosacárido biantenario ligado a la región Fc del anticuerpo. Es posible que tales variantes hayan reducido la fucosilación y/o mejorado la función de la ADCC. Se describen ejemplos de tales variantes de anticuerpos, p.ej., en WO 2003/011878 (Jean-Mairet et ál.), Presentación de patente de EE.UU. N.º 6.602.684 (Umana et ál.) y US 2005/0123546 (Umana *et ál.*). También se proporcionan variantes de anticuerpos con al menos un residuo de galactosa en el oligosacárido unido a la región Fc. Es posible que estas variantes de anticuerpos hayan mejorado la función de la CDC. Estas variantes de anticuerpos se describen, por ejemplo, en WO 1997/30087 (Patel et ál.), WO 1998/58964 (Raju, S.) y WO 1999/22764 (Raju, S.).

c. Variantes de la región Fc

En algunas versiones, se puede introducir una o más modificaciones a los amino ácidos en la región Fc de un anticuerpo anti-CD3 de la invención (por ejemplo, un anticuerpo anti-CD3 biespecífico de la invención que se une al CD3 y a una segunda molécula biológica, p.ej., a un antígeno de superficie celular, un antígeno tumoral, como un anticuerpo TDB de la invención o sus mismas variantes), por lo tanto se genera una variante de la región Fc (consulte, p.ej., US 2012/0251531). La variante de la región Fc puede comprender una secuencia de la región Fc humana, p.ej., una región Fc humana IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, que incluye una modificación a un amino ácido, p.ej., una

sustitución, en una o más posiciones de amino ácidos.

En algunas versiones, la invención contempla una variante del anticuerpo anti-CD3 que posee algunas pero no todas las funciones de efector, lo que la convierte en una buena candidata para las presentaciones en las que si bien la semivida del anticuerpo *in vivo* es importante, algunas funciones de efector son innecesarias o perjudiciales, como un complemento o una ADCC. *También es posible realizar ensayos de citotoxicidad* in vitro *y/o* in vivo para confirmar la reducción/agotamiento de la actividades de la CDC y/o de la ADCC. Por ejemplo, es posible realizar ensayos de unión de receptores Fc (FcR) para garantizar que el anticuerpo carece de unión FcγR (por lo tanto, es probable que carezca de actividad ADCC), pero sigue manteniendo la capacidad de unión FcRn. Las células primarias para la mediación de ADCC, células NK, expresan Fc(RIII solamente, mientras que los monocitos expresan Fc(RI, Fc(la expresión de FcR RII y Fc(RIII. Fen células hematopopéyicas se resume en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991). Se presentan ejemplos, no restrictivos, de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad de la ADCC de una molécula de interés, en la patente de EE.UU. N.º 5.500.362 (consulte, p.ej., Hellstrom, I., et ál. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83:7059-7063 (1986)) y Hellstrom, I et ál., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82:1499-1502 (1985); 5,821,337 (consulte Bruggemann, M. et ál., *J. Exp. Med.* 166:1351-1361 (1987)). Por otra parte, se pueden utilizar métodos de determinación no radioactivos (consulte, p.ej., el ensayo de citotoxicidad no radiactivo ACTI™ para la citometría de flujo (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA; y el ensayo de citotoxicidad no radiactivo CytoTox 96® (Promega, Madison, WI). La células efectoras útiles para estos ensayos incluyen las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células asesinas naturales (NK). Por otro lado, o adicionalmente, se puede determinar la actividad de la ADCC de la molécula de interés *in vivo*, p.ej., en un modelo de animal como el que presenta Clynes et ál. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 95:652-656 (1998). También se pueden realizar ensayos de unión de C1q para confirmar que el anticuerpo es incapaz de unir C1q, y, en consecuencia, carece de actividad CDC. Consulte, p.ej. el método ELISA de unión C1q y C3c en WO 2006/029879 y en WO 2005/100402. A fin de evaluar la activación del complemento, se puede realizar un ensayo de CDC (consulte, por ejemplo, Gazzano-Santoro *et ál. J. Immunol. Métodos* 202:163 (1996); Cragg, M.S. et ál. *Blood.* 101:1045-1052 (2003); y Cragg, M.S. y M.J. Glennie *Blood.* 103:2738-2743 (2004)). Los ensayos de la unión FcRn y la eliminación/semivida *in vivo* también pueden realizarse con métodos conocidos (consulte, p.ej. Petkova, S.B. et ál. *Int'l. Immunol.* 18(12):1759-1769 (2006)).

Los anticuerpos con función de efector disminuida incluyen aquellos con sustitución de uno o más de los residuos de las región Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 (de las patentes de EE.UU. N.° 6.737.056 y 8.219.149). Estos mutantes Fc incluyen mutantes Fc con sustituciones en dos o más posiciones de aminoácidos 265, 269, 270, 297 y 327, incluido el mutante Fc llamado "DANA" con sustitución en los residuos 265 y 297 a la alanina (patente de EE.UU. N.° 7.332.581 y 8.219.149).

En algunas versiones, se sustituye la prolina en la posición 329 de una región Fc humana en estado natural en el anticuerpo con glicina o arginina o un residuo de aminoácido lo suficientemente grande para destruir el sandwich de prolina dentro de la interfaz del receptor Fc/Fc.gamma. que se forma entre la prolina 329 del Fc y los residuos triptófanos Trp 87 y Trp 110 de FcgRIII (Sondermann et ál.: Nature 406, 267-273 (20 de julio 2000)). En algunas versiones, el anticuerpo incluye al menos una sustitución más de aminoácido. En una versión, la sustitución adicionada de aminoácido es S228P, E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297D o P331S, e incluso en otra versión, la sustitución adicionada de aminoácido es L234A y L235A de la región humana Fc IgG1 o S228P y L235E de la región humana Fc IgG4 (consulte, p.ej., US 2012/0251531) e incluso en otra versión, la sustitución adicionada de aminoácido es L234A y L235A y P329G de la región humana Fc IgG1.

Se describen ciertas variantes de anticuerpo con unión a FcR mejorada o disminuida (consulte, p.ej., Patente de EE.UU. N.º 6.737.056; WO 2004/056312, y Shields et ál.*, J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001)).

En algunas versiones, una variante de anticuerpo incluye una región Fc con una o más sustituciones de aminoácidos que mejoran la ADCC, p.ej., sustituciones en las posiciones 298, 333, y/o 334 de la región Fc (numeración de residuos de la UE).

En algunas versiones, las alteraciones se realizan en la región Fc que resultan en la unión de C1q alterada (es decir, mejorada o disminuida) y/o en Citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), p.ej., como lo describe la Patente de EE.UU. N.º 6.194.551, WO 99/51642 e Idusogie et ál. *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

Los anticuerpos con semividas aumentadas y unión mejorada para el receptor Fc neonatal (FcRn), el cual es responsable de la transferencia de IgC materno al feto (Guyer et ál, *J. Immunol.* 117:587 (1976) y Kim et ál., *J. Immunol.* 24:249 (1994)), se describen en US2005/0014934A1 (Hinton et ál.). Esos anticuerpos incluyen una región Fc con una o más sustituciones ahí mismo que mejoran la unión de la región Fc con FcRn. Tales variantes Fc incluyen aquellas con sustituciones en uno o más residuos de la región Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 o 434, p.ej., sustitución del residuo de la región Fc 434 (patentes de EE.UU. N.° 7.371.826).

También consulte Duncan & Winter, *Nature* 322:738-40 (1988), patente de EE.UU. N.° 5.648.260, patente de EE.UU. N.° 5.624.821 y WO 94/29351 en relación a otros ejemplos de las variantes de la región Fc.

En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD3 (p.ej., el anticuerpo anti-CD3 bioespecífico) contiene una región Fc que incluye una mutación N297G. En algunos entornos, el anticuerpo anti-CD3 que incluye la mutación N297G comprende un grupo de anti-CD3 que está compuesto por un primer dominio de unión que consta de las siguientes seis RHV: (a) una RHV-H1 que comprende una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 1; (b) una RHV-H2 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 2; (c) una RHV-H3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de

SEC.: 3; (d) una RHV-L1 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 4; (e) una RHV-L2 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 5; y (f) una RHV-L3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 6; y un grupo anti-CD20 que consiste en un segundo dominio de unión que incluye los siguientes seis RHV: (a) un RHV-H1 que comprende la secuencia de amino ácido con N.º de ID de SEC.: 157; (b) una RHV-H2 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 158; (c) una RHV-H3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 159; (d) una RHV-L1 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 160; (e) una RHV-L2 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 161; y (f) una RHV-L3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 162.

En algunas versiones, el anticuerpo anti-CD3 que incluye la mutación N297G comprende un grupo de anti-CD3 que está compuesto por un primer dominio de unión que consta de (a) una HV que comprende una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 184 y (b) un dominio de VL que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 185 y un grupo anti-CD20 que comprende un segundo dominio de unión que consta de (a) un dominio de HV que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 266 y (b) un dominio de VL que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 267.

En algunas versiones, el anticuerpo anti-CD3 que incluye la mutación N297G puede comprender uno o más dominios constantes de cadenas pesadas, donde el o los dominios constantes de cadenas pesadas son seleccionados de un primer dominio CH1 ($CH1_1$), un primer dominio CH2 ($CH2_1$), un primer dominio CH3 ($CH3_1$), un primer dominio CH1 ($CH1_2$), un segundo dominio CH2 ($CH2_2$) y un segundo dominio CH3 ($CH3_2$). En algunas ocasiones, al menos uno o los dominios constantes de cadenas pesadas está emparejado con otro dominio constante de cadenas pesadas. En algunas ocasiones, los dominios $CH3_1$ y $CH3_2$ comprenden una protuberancia o una cavidad, donde la protuberancia o cavidad en el dominio $CH3_1$ puede posicionarse en la cavidad o la protuberancia respectiva del dominio $CH3_2$. En algunas ocasiones, los dominios $CH3_1$ y $CH3_2$ se encuentran en una interfaz entre la protuberancia y cavidad mencionadas. En algunas ocasiones, los dominios $CH2_1$ y $CH2_2$ comprenden una protuberancia o una cavidad, donde la protuberancia o cavidad en el dominio $CH2_1$ puede posicionarse en la cavidad o la protuberancia respectiva del dominio $CH2_2$. En otras ocasiones, los dominios $CH2_1$ y $CH2_2$ se encuentran en una interfaz entre la protuberancia y cavidad mencionadas. En algunas ocasiones, el anticuerpo anti-CD3 es un anticuerpo IgG1.

En otras versiones, el anticuerpo anti-CD3 que incluye la mutación N297G comprende un grupo de anti-CD3 que está compuesto por un primer dominio de unión que consta de (a) una HV que comprende una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 184 y (b) un dominio de VL que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 185 y un grupo anti-CD20 que comprende un segundo dominio de unión que consta de (a) un dominio de HV que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de

SEC.: 266 y (b) un dominio de VL que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 267, donde (a) el grupo anti-CD3 comprende mutaciones por sustitución de T366S, L368A, Y407V y N297G y (b) el grupo anti-CD20 comprende mutaciones por sustitución de T366W y N297G.

d. Variantes de anticuerpos creados con cisteína

En ciertas versiones, es posible querer crear anticuerpos creados con cisteína, p.ej., "thioMAbs", en el cual se sustituye uno o más residuos de un anticuerpo con residuos de cisteína. En versiones particulares, los residuos sustituidos ocurren en sitios accesibles del anticuerpo. La sustitución de esos residuos con cisteína hace que los grupos de tiol se posicionen ahí mismo en sitios accesibles del anticuerpo y pueden utilizarse para conjugar el anticuerpo con otras fracciones, como fracciones de medicamentos o fracciones de medicamentos de enlace para crear un inmunoconjugado, como se describe más adelante. En algunas versiones, se puede sustituir con cisteína a uno o más de los siguientes residuos: V205 (numeración Kabat) de la cadena ligera, A118 (numeración de la UE) de la cadena pesada y S400 (numeración de la UE) de la cadena pesada de la región Fc. Es posible generar anticuerpos creados con cisteína de acuerdo a lo descrito en, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N.° 7.521.541.

e. Derivados de anticuerpos

En algunas versiones, se puede introducir una o más modificaciones al anticuerpo anti-CD3 de la invención (p.ej., un anticuerpo anti-CD3 biespecífico de la invención que se une al CD3 y a una segunda molécula biológica, p.ej., a un antígeno de superficie celular, un antígeno tumoral, como un anticuerpo TDB de la invención o sus mismas variantes) para que dispongan de fracciones no protéicas conocidas y disponibles. Las fracciones adecuadas capaces de ser derivadas del anticuerpo incluyen pero no se limitan a polímeros solubles en agua. Ejemplos no restrictivos de polímeros solubles en agua incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/polietilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrán, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, poli-1, 3-dioxolano, poli-1, 3, 6-trioxano, copolímero de anhidro maleico/etileno, poliaminoácidos (ya sean homopolímeros o copolímeros aleatorios) y polietilenglicol de dextrán o poli (n-vinil pirrilidona), homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de etileno/óxido de polipropileno, poliol polioxietilado (p.ej., glicerol), alcohol polivinílico y mezclas correspondientes. Los propionaldehídos de polietilenglicol pueden presentar ventajas en el proceso de fabricación debido a su estabilidad en el agua. El polímero puede presentar un cierto peso molecular y puede estar o no ramificado. El número de polímeros ligados al anticuerpo puede variar y, si se liga más de un polímero, pueden ser la misma o diferentes moléculas. En general, el número y/o tipo de polímeros utilizados para derivar puede determinarse con base en consideraciones que incluyen, pero no se limitan a, las propiedades particulares o funciones del anticuerpo que deben mejorarse, ya sea que el derivado del anticuerpo se

utilizará en una terapia bajo determinadas condiciones, etc.

En otra versión, se proporcionan los conjugados de un anticuerpo y la fracción no proteica que puede ser calentada por selección mediante la exposición a radiación. En una versión, la fracción no proteica es un nanotubo de carbono (Kam et ál., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102: 11600-11605 (2005)). La radiación puede ser de cualquier longitud de onda, pero no se limita a longitudes de onda que no dañan células ordinarias, pero que calientan la fracción no proteica a una temperatura en la que se mata a las células próximas a la fracción no proteica del anticuerpo.

B. Métodos recombinantes y composiciones

Es posible producir con los métodos recombinantes y las composiciones anticuerpos anti-CD3 de la invención (p. ej., los anticuerpos anti-CD3 biespecíficos de la invención que se unen a CD3 y a una segunda molécula biológica como, p. ej., el antígeno de la superficie celular, p. ej., el antígeno de un tumor, como los anticuerpos TDB de la invención o las variantes correspondientes), según lo descrito en la patente de EE.UU. N.° 4.816.567. En una versión, se presenta el ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-CD3 aquí descrito. Tal ácido nucleico puede codificar una secuencia de aminoácidos que incluye el VL y/o una secuencia de aminoácidos que incluye el VH del anticuerpo (p.ej. las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo). En otra versión, se presentan uno o más vectores (p.ej., los vectores de expresión) que incluyen el mencionado ácido nucleico. En otra versión, se presenta una célula huésped que incluye el mencionado ácido nucleico. En una de dichas versiones, una célula huésped consta de (p.ej., fue transformada con): (1) un vector que consta de un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que consta del VL del anticuerpo y una secuencia de aminoácidos que consta del VH del anticuerpo o (2) un primer vector que consta de un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que consta del VL de un anticuerpo y un segundo vector que consta de un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que consta del VH del anticuerpo. En una versión, la célula huésped es eucariota, p.ej., la célula del ovario de un hamster chino (CHO) o una célula linfoide (p.ej., la célula Y0, NS0, Sp20). En una versión, se presenta el método para formar un anticuerpo anti-CD3, donde el método comprende el cultivo de una célula huésped que consta de un ácido nucleico que codifica al anticuerpo, como se presenta arriba, en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo y, de manera optativa, recupera el anticuerpo de la célula huésped (o el medio de cultivo de la célula huésped).

Para la producción recombinante de un anticuerpo anti-CD3, se aísla e inserta ácido nucleico codificante de un anticuerpo, como se describe anteriormente, en uno o más vectores para una clonación y/o expresión adicional en una célula huésped. Es posible aislar y secuenciar dicho ácido nucleico fácilmente por medio de procedimientos convencionales (p. ej., mediante sondas oligonucleótidas que son capaces de unirse específicamente a genes codificantes de las cadenas pesadas y livianas del anticuerpo).

Dentro de las células huésped consideradas apropiadas para la clonación o expresión de

los vectores codificantes de anticuerpos se incluyen las células procariotas y eucariotas que se describen en el presente. Por ejemplo, es posible producir anticuerpos en bacterias, en particular, cuando no se requiere glucosilación ni la función efectora de Fc. Para la expresión de fragmentos de anticuerpos y polipéptidos en bacterias, véase, p. ej., los siguientes números de las patentes de EE.UU.: 5,648,237, 5,789,199, y 5,840,523. (Véase, a su vez, Charlton, *Methods in Molecular Biology, Vol. 248* (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), págs. 245-254, descripción de la expresión de fragmentos de anticuerpos en *E. coli*.) Después de la expresión, es posible aislar el anticuerpo de la pasta de células bacterianas en una fracción soluble y se puede purificar aún más.

Además de las procariotas, los microbios eucariotas tales como los hongos filamentosos o las levaduras son huéspedes adecuados de clonación o expresión para vectores codificantes de anticuerpos como, por ejemplo, cepas de hongos o levaduras cuyas vías de glucosilación se han "humanizado", resultando, así, en la producción de un anticuerpo con un patrón de glucosilación parcialmente o totalmente humano. Véase Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004), y Li et al., *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006).

Las células huésped consideradas apropiadas para la expresión de anticuerpos glicosilados se derivan, a su vez, de organismos pluricelulares (invertebrados y vertebrados). Entre los ejemplos de células de invertebrados se incluyen las células de los insectos y de las plantas. Se han identificado numerosas cepas baculovirales que se pueden usar en conjunción con las células de los insectos, especialmente para la transfección de las células de la *Spodoptera frugiperda*.

A su vez, es posible usar los cultivos de las células vegetales como huéspedes. *Véase, p. ej.*, los siguientes números de las patentes de EE.UU.: 5,959,177, 6,040,498, 6,420,548, 7,125,978, y 6,417,429 (descripción de la tecnología PLANTIBODIES™ para la producción de anticuerpos en plantas transgénicas).

Las células de los vertebrados también se pueden usar como huéspedes. Por ejemplo, las líneas celulares de los mamíferos que se adaptan para crecer en suspensión pueden resultar útiles. Algunos ejemplos de aquellas líneas celulares huésped de los mamíferos que pueden resultar útiles son: una línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7); una línea de riñón embrionario humano (293 o células 293, como se describe, p. ej., en Graham et al., *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); células de riñón de hámster neonato (BHK); células de Sertoli de ratón (células TM4, como se describe, p. ej., en Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1); células de riñón de mono verde africano (VERO-76); células de carcinoma cervical humano (HELA); células de riñón canino (MDCK); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A); células de pulmón humano (W138); células de hígado humano (Hep G2); tumor mamario de ratón (MMT 060562); células TRI, como se describe, p. ej., en Mather et al*., Annals N.Y. Acad. Sci*. 383:44-68 (1982); células MRC 5; y células FS4. Entre otras de las líneas celulares huésped de los mamíferos que pueden resultar útiles se incluyen las células del ovario del hámster chino (CHO), incluidas las células DHFR-CHO (Urlaub et al., Proc. *Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 77:4216 (1980)); y las líneas celulares de mieloma como, por ejemplo, Y0,

NS0 y Sp2/0. Para una revisión de ciertas líneas celulares huésped de los mamíferos que resultan apropiadas para la producción de anticuerpos, véase, p. ej., Yazaki y Wu, *Methods in Molecular Biology, Vol. 248* (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), págs. 255-268 (2003).

C. Ensayos

Es posible identificar, seleccionar o caracterizar los anticuerpos anti-CD3 de la invención (p. ej., los anticuerpos anti-CD3 biespecíficos de la invención que se unen a CD3 y a una segunda molécula biológica como, p. ej., el antígeno de la superficie celular, p. ej., el antígeno de un tumor, como los anticuerpos TDB de la invención o las variantes correspondientes) que se proporcionan en el presente en relación con sus propiedades químicas o físicas y/o las actividades biológicas por medio de varios ensayos conocidos en la materia.

1. Ensayos de unión y demás ensayos

En un aspecto, se prueba un anticuerpo anti-CD3 de la invención en relación con su actividad de unión de antígenos, por ejemplo, a través de métodos tales como ELISA, Western blot, etc.

En otro aspecto, es posible usar ensayos de competencia para identificar un anticuerpo que compite con un anticuerpo anti-CD3 de la invención para la unión con el CD3.

En un ensayo ejemplar de competición, se incuba el CD3 inmovilizado en una solución que comprende un primer anticuerpo etiquetado que se une al CD3 y un segundo anticuerpo no etiquetado que se analiza en relación con su capacidad para competir con el primer anticuerpo en la unión al CD3. El segundo anticuerpo se puede encontrar presente en un hibridoma sobrenadante. A modo de control, se incuba el CD3 inmovilizado en una solución que comprende un primer anticuerpo etiquetado, pero no así el segundo anticuerpo no etiquetado. Después de la incubación bajo condiciones permisivas para la unión del primer anticuerpo al CD3, se elimina el anticuerpo excedente sin unir y se mide la cantidad de etiquetas asociadas al CD3 inmovilizado. Si la cantidad de etiquetas asociadas al CD3 inmovilizado es significativamente más reducida en la muestra de la prueba relativa a la muestra de control, esto indica, entonces, que el segundo anticuerpo compite con el primer anticuerpo en la unión con el CD3. Véase, p. ej., Harlow y Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cap.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

2. Ensayos de actividad

En un aspecto, se proporcionan ensayos para la identificación de los anticuerpos anti-CD3 correspondientes con actividad biológica. La actividad biológica puede incluir, por ejemplo, la unión al CD3 (p. ej., CD3 en la superficie de una célula T) o un fragmento peptídico correspondiente, ya sea *in vivo*, *in vitro*, o *ex vivo*. En el caso de un anticuerpo anti-CD3 multiespecífico (p. ej., biespecífico) de la invención (p. ej., un anticuerpo TDB

con un brazo anti-CD3 y un brazo que reconoce una segunda molécula biológica, p. ej., un antígeno de la superficie celular, p. ej., un antígeno de un tumor), la actividad biológica puede incluir, a su vez, activación de la célula efectora (p. ej., activación de la célula T (p. ej., CD8+ y/o CD4+ célula T)), expansión de la población de células efectoras (es decir, una reducción en la población de las células que expresan la segunda molécula biológica en su superficie celular), y/o matanza de las células objetivo. Se proporcionan los anticuerpos con dicha actividad biológica *in vivo* y/o *in vitro.* En ciertas realizaciones, un anticuerpo de la invención se analiza en relación con dicha actividad biológica, como se describe en detalle en los Ejemplos que se encuentran a continuación.

En algunas representaciones, la actividad comprende la capacidad de sostener la eliminación de células B y/o la activación de células T citotóxicas. En ciertas representaciones, se evalúan las células anti-B que buscan anticuerpos anti-CD3 de la invención (tales como una TDB anti-CD20) para tal eliminación de células B y/o la activación del efecto citotóxico de la actividad de las células T biológicas mediante cualquiera de los métodos aquí descritos, en particular los exjemplos. En algunas representaciones de cualquiera de los ensayos de estas actividades, las PBMC pueden aislarse a partir de sangre entera de donantes saludables por separación Ficoll. Particularmente, la sangre de seres humanos puede extraerse en jeringas con heparina y las PBMC aisladas con Leucosep y Ficoll Paque Plus. De ser necesario, se pueden separar las células CD4+T y CD8+T con kits Miltenyi conforme las instrucciones del fabricante.

Además, las células pueden lavarse en un medio de RPMI con un 10% de FBS, suplementado con GlutaMax, penicilina y estreptomicina; y se agregaron ~0,2 millones de células suspendidas a una placa con fondo en U de 96 pocillos. Las células pueden cultivarse en RPMI 1640 suplementado con 10% de FBS a 37 °C en una incubadora de cultivo de células estándar humidificada. Para los ensayos de eliminación de células BJAB, se pueden incubar 20.000 células BJAB con células efectoras, ya sea células T purificadas o huPBMC, como lo indican las proporciones según el ensayo, en presencia de diversas concentraciones de anticuerpos TDB durante 24 horas. Para los ensayos de eliminación de células B endógenas, se pueden incubar 200.000 huPBMC en diversas concentraciones de anticuerpos TDB durante 24 horas.

Tras el cultivo, las células pueden lavarse con un tampón FACS (BSA al 0.05 %, azida de Na al 0.05 % en PBS) y suspenderse en 100µl de un tampón FACS con 1 µg/ml de yoduro de propidio. Los datos pueden recopilarse en un citómetro de flujo FACSCalibur y analizarse con FlowJo. Las células B vivas pueden descartarse como células PI-CD19 o PI-CD20+B mediante FACS y puede obtenerse el recuento de células absoluto con perlas FITC agregadas a la mezcla de la reacción como control de recuento interno. El porcentaje (%) de eliminación de células puede calcularse con base en los controles no tratados con TDB. Las células T activadas se pueden detectar por la expresión de superficie de CD69 y CD25 mediante el uso de anti-CD69-FITC y anti-CD25-PE.

D. Inmunoconjugados

La invención, a su vez, proporciona inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo

anti-CD3 que se conjuga a uno o más agentes citotóxicos, tales como medicamentos o agentes quimioterapéuticos, agentes inhibidores del crecimiento, toxinas (p. ej., toxinas proteicas, toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal, o animal, o fragmentos de la misma), o isotopos radioactivos.

En una realización, un inmunoconjugado es un conjugado de anticuerpo y fármaco (ADC) donde se conjuga un anticuerpo a uno o más medicamentos, que incluye, pero no se limita a, un maitansinoide (véase los siguientes números de las patentes de EE.UU.: 5,208,020, 5,416,064 y la patente europea EP 0 425 235 B1); una auristatina como, por ejemplo, las fracciones DE y DF del fármaco monometil auristatina (MMAE y MMAF) (véase los siguientes números de las patentes de EE.UU.: 5,635,483 y 5,780,588, y 7,498,298); una dolastatina; una calicheamicina o derivado de la misma (véase los siguientes números de las patentes de EE.UU.: 5,712,374, 5,714,586, 5,739,116, 5,767,285, 5,770,701, 5,770,710, 5,773,001, y 5,877,296; Hinman et al., *Cancer Res.* 53:3336-3342 (1993); y Lode et al., *Cancer Res.* 58:2925-2928 (1998)); una antraciclina como, por ejemplo, daunomicina o doxorrubicina (véase Kratz et al., *Current Med. Chem.* 13:477-523 (2006); Jeffrey et al., *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 16:358-362 (2006); Torgov et al., *Bioconj. Chem.* 16:717-721 (2005); Nagy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 97:829-834 (2000); Dubowchik et al., *Bioorg. & Med. Chem. Letters* 12:1529-1532 (2002); King et al., *J. Med. Chem.* 45:4336-4343 (2002); y el siguiente número de las patentes de EE.UU.: 6,630,579); un metotrexato; una vindesina; un taxano como, por ejemplo, docetaxel, paclitaxel, larotaxel, tesetaxel y ortataxel; un tricoteceno; y CC1065.

En otra realización, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo anti-CD3, como se describe en el presente, conjugado con una toxina enzimáticamente activa o con un fragmento de la misma, que incluye, pero no se limita a, difteria de cadena A, fragmentos activos no vinculantes de la toxina de la difteria, exotoxina de cadena A (a partir de Pseudomonas aeruginosa), ricina de cadena A, abrina de cadena A, modeccina de cadena A, alfa-sarcina, proteínas de Aleurites fordii, proteínas de diantina, proteínas de Phytolacca americana (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de Momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de Saponaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y tricotecenos.

En otra realización, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo anti-CD3, como se describe en el presente, conjugado con un átomo radioactivo para formar un radioconjugado. Se encuentra disponible una variedad de isotopos radioactivos para la producción de radioconjugados. Algunos ejemplos incluyen At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32}, Pb^{212} e isotopos radioactivos de Lu. Cuando el radioconjugado se usa para la detección, puede comprender un átomo radioactivo para los estudios cintigráficos, por ejemplo, tc99m o I123, o una etiqueta de espín para las imágenes por resonancia magnética nuclear (NMR) (también conocida como resonancia magnética (MRI)), como, por ejemplo, iodo-123 nuevamente, iodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

Se puede conjugar un anticuerpo con un agente citotóxico por medio de una variedad de

agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales como, p. ej., N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados de imidoésteres bifuncionales (como, p. ej., dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (como, p. ej., disuccinimidil suberato), aldehídos (como, p. ej., glutareldehído), compuestos bis-azido (como, p. ej., bis (p-azidobenzoil) hexandiamina), derivados bis-diazonio (como, p. ej., bis-(p-diazoniumbenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (como, p. ej., 2,6-diisocianato de tolieno), y compuestos de flúor bis-activos (como, p. ej., 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina según se describe en Vitetta et al., *Science* 238:1098 (1987). El ácido triaminepentaacético 1-isotiocianatobencil-3-metildietileno (MX-DTPA) etiquetado con carbono-14 es un agente quelante ejemplar para la conjugación de radionucleótidos en el anticuerpo. Véase WO94/11026. El enlace puede ser un "enlace escindible" que facilita la liberación de un fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, es posible usar un enlace ácido lábil, un enlace peptídico, un enlace fotolábil, un enlace dimetil o un enlace con contenido de disulfuro (Chari et al., *Cancer Res.* 52:127-131 (1992); Patente de EE.UU. No. 5,208,020).

Los presentes inmunoconjugados o ADCs contemplan expresamente, pero no se limitan a, los conjugados preparados con re-agentes de enlace cruzado, que incluyen, pero no se limitan a, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC, y sulfo-SMPB, y SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfona)benzoato) que se encuentran comercialmente disponibles (p. ej., en Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., EE.UU.).

E. Métodos y composiciones para el diagnóstico y la detección

En ciertas realizaciones, cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 de la invención (p. ej., los anticuerpos anti-CD3 biespecíficos de la invención que se unen a CD3 y a una segunda molécula biológica como, p. ej., un antígeno de la superficie celular, p. ej., el antígeno de un tumor, como los anticuerpos TDB de la invención o las variantes correspondientes) es útil para la detección de la presencia de un CD3 en una muestra biológica. El término "detección", según su uso en el presente, incluye la detección tanto cuantitativa como cualitativa. En ciertas realizaciones, una muestra biológica comprende una célula o un tejido.

En una realización, se proporciona un anticuerpo anti-CD3 para ser usado en un método de diagnóstico o detección. En un aspecto adicional, se suministra un método para la detección de la presencia de un CD3 en una muestra biológica. En ciertas realizaciones, el método implica contactar la muestra biológica con un anticuerpo anti-CD3, según se describe en el presente, bajo condiciones permisivas para la unión del anticuerpo anti-CD3 al CD3, y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo anti-CD3 y el CD3. Dicho método puede ser *in vitro* o *in vivo*.

En ciertas realizaciones, se proporcionan anticuerpos anti-CD3 etiquetados. Las etiquetas incluyen, pero no se limitan a, etiquetas o fracciones que se detectan

directamente (como, por ejemplo, etiquetas fluorescentes, cromofóricas, electrodensas, quimioluminiscentes y radiactivas), como así también fracciones, tales como enzimas o ligandos, que se detectan indirectamente, por ejemplo, a través de una reacción enzimática o de una interacción molecular. Las etiquetas ejemplares incluyen, pero no se limitan a, los radioisótopos ^{32}P, ^{14}C, ^{125}I, ^{3}H, y ^{131}I, fluoróforos como, por ejemplo, quelatos de tierra rara o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, luceriferasas, por ejemplo, la luciferasa de luciérnaga y la luciferasa bacteriana (Patente de EE.UU. No. 4,737,456), luciferina, 2,3-dihidroftalazinedionas, la peroxidasa de rábano rusticano (HRP), la fosfatasa alcalina, la β-galactosidasa, la glucoamilasa, la lisozima, la sacarida, las oxidasas como, por ejemplo, la glucosa oxidasa, la galactosa oxidasa y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, las oxidasas heterocíclicas como, por ejemplo, la uricasa y la xantina oxidasa, acoplada con una enzima que emplea peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor de un tinte como, por ejemplo, HRP, la lactoperoxidasa o la microperoxidasa, biotina/avidina, etiquetas de espín, etiquetas con bacteriófagos, radicales libres estables, y similares.

F. Formulaciones farmacéuticas

Las formulaciones farmacéuticas de un anticuerpo anti-CD3 de la invención (p. ej., el anticuerpo anti-CD3 biespecífico de la invención que se une al CD3 y a una segunda molécula biológica como, por ejemplo, un antígeno de la superficie celular como, p. ej., un antígeno de un tumor, como un anticuerpo TDB de la invención o la variante correspondiente) se preparan al mezclar dicho anticuerpo con el grado deseado de pureza con uno o más portadores farmacéuticamente aceptados de carácter opcional (*Pharmaceutical Sciences de Remington,* 16a edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los portadores farmacéuticamente aceptados son, por lo general, no tóxicos para los receptores en las dosis y las concentraciones empleadas, e incluyen, pero no se limitan a: tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluidos el ácido ascórbico y la metionina, conservantes (como el cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; butil, fenol o alcohol bencílico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m- cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas como, p. ej., albúmina sérica, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos incluyendo glucosa, mañosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; iones formadores de sales como el sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos proteicos de Zn), y/o agentes tensoactivos no iónicos tales como el polietilenglicol (PEG). Los presentes portadores farmacéuticamente aceptables de carácter ejemplar incluyen, a su vez, agentes intersticiales para la dispersión farmacológica tales como glicoproteínas

hialuronidasa solubles activas a pH neutro (sHASEGP), por ejemplo, glicoproteínas hialuronidasa PH-20 solubles en humanos tales como rHuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.). Ciertas sHASEGPs ejemplares y los métodos de uso, incluido rHuPH20, se describen en los siguientes números de las publicaciones de las patentes de EE.UU.: 2005/0260186 y 2006/0104968. En un aspecto, una sHASEGP se combina con uno o más glicosaminoglicanos adicionales como, por ejemplo, las condroitinas.

Las formulaciones de anticuerpos liofilizadas de carácter ejemplar se describen en la patente de EE.UU. No. 6,267,958. Las formulaciones de anticuerpos acuosas incluyen las descriptas en la patente de EE.UU. No. 6,171,586 y WO2006/044908, las últimas formulaciones incluyen un tampón de histidina-acetato.

La presente formulación puede contener, a su vez, más de un ingrediente activo según sea necesario en relación con la indicación específica que se esté tratando, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no se afectan negativamente entre sí. Por ejemplo, podría resultar deseable proporcionar un agente terapéutico adicional (p. ej., un agente quimioterapéutico, un agente citotóxico, un agente inhibidor del crecimiento, y/o un agente anti-hormonal, como los mencionados anteriormente). Dichos ingredientes activos se encuentran presentes de manera apropiada en combinación en cantidades que son efectivas para los propósitos previstos.

Los ingredientes activos se pueden atrapar en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacilato), respectivamente; en sistemas coloidales de suministro de fármacos (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se describen en *Pharmaceutical Sciences de Remington,* 16a edición, Osol, A. Ed. (1980).

Es posible elaborar preparaciones de liberación sostenida. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el anticuerpo, matrices que están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas.

Las formulaciones a usar para la administración *in vivo* son, por lo general, estériles. La esterilidad se puede lograr con facilidad, por ejemplo, por medio de la filtración a través de membranas de filtración estériles.

G. Métodos y composiciones terapéuticos

Es posible usar cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 de la invención (p. ej., los anticuerpos anti-CD3 biespecíficos de la invención que se unen a CD3 y a una segunda molécula biológica como, p. ej., el antígeno de la superficie celular, p. ej., el antígeno de un tumor, como los anticuerpos TDB de la invención o las variantes correspondientes) en los métodos terapéuticos.

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-CD3 para ser usado como un medicamento. En otros aspectos, se proporciona un anticuerpo anti-CD3 para ser usado

en el tratamiento o en el retraso correspondiente al progreso de un trastorno de proliferación celular (p. ej., cáncer) o de un trastorno autoinmunitario (p. ej., artritis). En ciertas realizaciones, se proporciona un anticuerpo anti-CD3 para ser usado en un método de tratamiento. En ciertas realizaciones, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD3 para ser usado en un método de tratamiento de un individuo con un trastorno de proliferación celular o con un trastorno autoinmunitario que comprenda la administración a dicho individuo de una cantidad efectiva del anticuerpo anti-CD3. En una realización de la antes mencionada naturaleza, el método comprende, a su vez, la administración al individuo de una cantidad efectiva de, al menos, un agente terapéutico adicional, según se describe anteriormente. En otras realizaciones, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD3 para ser usado en la mejora de la función inmunitaria de un individuo que padezca un trastorno de proliferación celular o un trastorno autoinmunitario. En ciertas realizaciones, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD3 para ser usado en un método para la mejora de la función inmunitaria de un individuo que padezca un trastorno de proliferación celular o un trastorno autoinmunitario que comprenda la administración al individuo de una cantidad efectiva del anticuerpo anti-CD3 para activar las células efectoras (p. ej., células T, p. ej., CD8+ y/o CD4+ células T), expandir (incrementar) una población de células efectoras, reducir una población de células objetivo (p. ej., una célula que expresa una segunda molécula biológica reconocida por un anticuerpo anti-CD3 de la invención como, por ejemplo, un anticuerpo TDB biespecífico de la invención), y/o matar una célula objetivo (p. ej., célula objetivo de un tumor). Un “individuo”, conforme a cualquiera de las realizaciones anteriores, puede ser un humano.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD3 para ser usado en la fabricación o preparación de un medicamento. En una realización, el medicamento se usa para el tratamiento de un trastorno de proliferación celular (p. ej., cáncer) o de un trastorno autoinmunitario (p. ej., artritis). En una realización adicional, el medicamento es para ser usado en un método de tratamiento de un trastorno de proliferación celular o de un trastorno autoinmunitario que comprenda la administración a un individuo con un trastorno de proliferación celular o con un trastorno autoinmunitario de una cantidad efectiva del medicamento. En una realización de la antes mencionada naturaleza, el método comprende, a su vez, la administración al individuo de una cantidad efectiva de, al menos, un agente terapéutico adicional, según se describe anteriormente. En una realización adicional, el medicamento se usa para activar las células efectoras (p. ej., células T, p. ej., CD8+ y/o CD4+ células T), expandir (incrementar) una población de células efectoras, reducir una población de células objetivo (p. ej., una célula que expresa una segunda molécula biológica reconocida por un anticuerpo anti-CD3 de la invención como, por ejemplo, un anticuerpo TDB biespecífico de la invención), y/o matar células objetivo (p. ej., célula objetivo de un tumor) en el individuo. En una realización adicional, el medicamento es para ser usado en un método para la mejora de la función inmunitaria de un individuo que padezca un trastorno de proliferación celular o un trastorno

autoinmunitario que comprenda la administración al individuo de una cantidad efectiva del medicamento para activar las células efectoras (p. ej., células T, p. ej., CD8+ y/o CD4+ células T), expandir (incrementar) una población de células efectoras, reducir una población de células objetivo (p. ej., una célula que expresa una segunda molécula biológica reconocida por un anticuerpo anti-CD3 de la invención como, por ejemplo, un anticuerpo TDB biespecífico de la invención), y/o matar una célula objetivo (p. ej., célula objetivo de un tumor). Un "individuo", conforme a cualquiera de las realizaciones anteriores, puede ser un humano.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para el tratamiento de un trastorno de proliferación celular (p. ej., cáncer) o de un trastorno autoinmunitario (p. ej., artritis). En una realización, el método comprende la administración al individuo que padezca un trastorno de proliferación celular o un trastorno autoinmunitario de una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-CD3. En una realización de la antes mencionada naturaleza, el método comprende, a su vez, la administración al individuo de una cantidad efectiva de, al menos, un agente terapéutico adicional, según se describe anteriormente. Un "individuo", conforme a cualquiera de las realizaciones anteriores, puede ser un humano.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para la mejora de la función inmunitaria de un individuo que padezca un trastorno de proliferación celular o un trastorno autoinmunitario en un individuo con un trastorno de proliferación celular o con un trastorno autoinmunitario. En una realización, el método comprende la administración al individuo de una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-CD3 para activar las células efectoras (p. ej., células T, p. ej., CD3+ y/o CD8+ células T), expandir (incrementar) una población de células efectoras, reducir una población de células objetivo (p. ej., una célula que expresa una segunda molécula biológica reconocida por un anticuerpo anti-CD4 de la invención como, por ejemplo, un anticuerpo TDB biespecífico de la invención), y/o matar una célula objetivo (p. ej., célula objetivo de un tumor). En una realización, un "individuo" es un humano.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para el tratamiento de un cáncer hematológico tal como un cáncer de células B (por ejemplo, linfoma de células B maduras) por medio de la administración de una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-CD3 de la invención, como un anticuerpo anti-CD3 biespecífico de la invención, como una TDB que busca células anti-B, como un CD20-TDB con un brazo anti-CD3 y un brazo anti-CD20. En un aspecto adicional de la realización, el linfoma de células B maduras es un linfoma no Hodgkin (NHL). En un aspecto adicional de la realización, el NHL es seleccionado del grupo que comprende: linfoma difuso de células B grandes semejantes a las del centro germinal (GCB), linfoma difuso de células B grandes semejantes a la célula B activada (ABC), linfoma folicular (FL), linfoma de células de manto (MCL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfoide crónica (CLL), linfoma de zona marginal (MZL), leucemia linfocítica de célula pequeña (SLL), linfoma linfoplasmacítico (LL), macroglobulinemia de Waldenstrom (WM), linfoma del sistema nervioso central (CNSL),

linfoma de Burkitt (BL), leucemia prolinfocítica de células B, linfoma esplénico de zona marginal, leucemia de células vellosas, linfoma o leucemia esplénico, inclasificable, linfoma esplénico difuso de células B pequeñas de la pulpa roja, variante de leucemia de células vellosas, macroglobulinemia de Waldenstrom, enfermedades de cadenas pesadas, enfermedad de cadenas pesadas alfa, enfermedad de cadenas pesadas gamma, enfermedad de cadenas pesadas μ, mieloma de células plasmáticas, plasmocitoma óseo solitario, plasmocitoma extraóseo, linfoma de zona marginal nodal de tejido linfoide asociado a mucosa (linfoma MALT), linfoma de zona marginal nodal, linfoma de zona marginal nodal pediátrico, linfoma folicular pediátrico, linfoma primario cutáneo de células del centro folicular, linfoma de células grandes B rico en células T/histiocitos, linfoma primario del sistema nervioso central, linfoma cutáneo primario, linfoma tipo pierna, linfoma difuso de células B grandes positivo al virus de Epstein-Barr del anciano, linfoma difuso de células B grandes asociado con la inflamación crónica, granulomatosis linfomatoide, linfoma primario mediastinal de células B (tímico), linfoma de células B grandes intravascular, linfoma de células B grandes positivo al ALK, linfoma plasmablástico, linfoma de células B grandes tras enfermedad de Castleman asociada a infección por virus HHV8, linfoma primario de efusión: linfoma de células B, inclasificable, con características intermedias entre linfoma difuso de células B grandes y linfoma de Burkitt, y linfoma de células B, inclasificable, con características intermedias entre linfoma difuso de células B grandes y linfoma clásico de Hodgkin. En una realización preferente de la invención, el método abarca el tratamiento de un cáncer que comprende linfoma difuso de células B grandes semejantes a las del centro germinal (GCB), linfoma difuso de células B grandes semejantes a la célula B activada (ABC), linfoma folicular (FL), linfoma de células de manto (MCL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfoide crónica (CLL), linfoma de zona marginal (MZL), leucemia linfocítica de célula pequeña (SLL), linfoma linfoplasmacítico (LL), macroglobulinemia de Waldenstrom (WM), linfoma del sistema nervioso central (CNSL), linfoma de Burkitt (BL).

En una realización, el método comprende la administración a un individuo que padezca dicho cáncer hematológico (como un cáncer de células B, por ejemplo, linfoma de células B) de una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-CD3 de la invención, como un anticuerpo TDB biespecífico, como un CD20-TDB que comprende un brazo dirigido a anti-CD20 y un brazo dirigido a anti-CD3. En una realización, un CD20 TDB es co-administrado con rituximab y obinutuzumab.

En una realización adicional, el anticuerpo anti-CD3 de la invención (por ejemplo, el CD20 TDB), con o sin un anticuerpo monoclonal CD20, es administrado con un agente quimioterapéutico y/o un conjugado de anticuerpo y fármaco (ADC). En otra realización, el agente terapéutico es un modificador biológico.

En un aspecto adicional de la invención, el tratamiento adicional comprende un anticuerpo anti-CD20. En una realización, el anticuerpo anti-CD20 es rituximab. En una realización, el anticuerpo anti-CD20 es un anticuerpo B-Ly 1 humanizado. En una

realización, el anticuerpo B-Ly 1 humanizado es obinituzumab. En una realización, el anticuerpo anti-CD20 es ofatumumab, ublituximab, o ibritumomab tiuxetan.

En un aspecto adicional de la invención, el tratamiento adicional comprende un agente alquilante. En una realización, el agente alquilante es 4-[5-[Bis(2-cloroetil)amino]-1-metilbenzimidazol-2-il]ácido butanoico y las sales del mismo. En una realización, el agente alquilante es bendamustina.

En un aspecto adicional de la invención, el tratamiento adicional comprende un inhibidor de BCL-2. En una realización, el inhibidor de BCL-2 es 4-(4-{[2-(4-clorofenil)-4,4-dimetilciclohex-1-en-1-il]metiyl}piperazin-1-il)-N-({3-nitro-4-[(tetrahidro-2H-piran-4-ilmetil)amino]fenil}sulfonil)-2-(1H-pirrolo[2,3-b]piridin-5-iloxi)benzamida y las sales de la misma. En una realización, el inhibidor de BCL-2 es venetoclax (CAS n.°: 1257044-40-8).

En un aspecto adicional de la invención, el tratamiento adicional comprende un inhibidor de fosfoinositida 3-quinasa (PI3K). En una realización, el inhibidor de PI3K inhibe la isoforma delta de PI3K (p.ej. P110δ). En algunas realizaciones, el inhibidor de PI3K es 5-fluoro-3-fenil-2 - [(1S) -1- (7H-purin-6-ilamino) propil] -4 (3H) -quinazolinona y las sales de la misma. En algunas realizaciones, el inhibidor de PI3K es idelalisib (CAS n.°: 870281-82-6). En una realización, el inhibidor de PI3K inhibe las isoformas alfa y delta de PI3K. En algunas realizaciones, el inhibidor de PI3K es 2-{3-[2-(1-isopropil-3-metil-1H-1,2–4-triazol-5-il)-5,6-dihidrobenzo[f]imidazo[1,2-d][1,4]oxazepin-9-il]-1H-pirazol-1-il}-2-metilpropanamida y las sales de la misma.

En un aspecto adicional de la invención, el tratamiento adicional comprende un inhibidor de tirosina quinasa de Bruton (BTK). En una realización, el inhibidor de BTK es1-[(3R)-3-[4-amino-3-(4-fenoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il]piperidin-1-il]prop-2-en-1-ona y las sales de la misma. En una realización, el inhibidor de BTK es ibrutinib (CAS n.°: 936563-96-1).

En un aspecto adicional de la invención, el tratamiento adicional comprende talidomida o un derivado de la misma. En una realización, la talidomida o un derivado de la misma es (RS)-3-(4-amino-1-oxo 1,3-dihidro-2H-isoindol- 2-il) piperidina-2,6-diona y las sales de la misma. En una realización, la talidomida o un derivado de la misma es lendalidomida (CAS n.°: 191732-72-6).

En un aspecto adicional de la invención,el tratamiento adicional comprende una o más de ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina o prednisolona (CHOP). En una realización, el tratamiento adicional comprende además un anticuerpo anti-CD20 según lo antes descrito (p.ej. GA-101 o Rituxan®). Puede utilizarse, sin limitación, cualquiera de los métodos y tratamientos anteriores para cualquier tipo de cáncer, que incluye, por ejemplo, el tratamiento de un cáncer de células B o cáncer de mama.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para el tratamiento de cánceres HER2 positivos. En una realización, el método comprende la administración a un individuo que padezca dicho cáncer de una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-HER2 de la invención, como un anticuerpo TDB biespecífico, con un brazo dirigido anti-

HER2 y un brazo dirigido anti-CD3. En una realización preferente, el HER2-TDB posee un perfil de toxicidad aceptable cuando se lo administra en una dosis efectiva al paciente. En una realización, el brazo CD3 del HER2-TDB con un perfil de toxicidad aceptable es un brazo CD3 de baja afinidad. En una realización, el brazo CD3 del HER2-TDB con un perfil de toxicidad aceptable es 40G5c.

En una realización preferente, el cáncer HER2 positivo es un cáncer de mama HER2 positivo o cáncer gástrico HER2 positivo. En una realización, un HER2 TDB es co-administrado con uno o más agentes terapéuticos adicionales que se dirigen a la vía HER. En una realización, el agente terapéutico que se dirige a la vía HER es seleccionado de un inhibidor EGFR, un inhibidor HER2, un inhibidor HER3, y/o un inhibidor HER4. En una realización, un HER2 TDB es co-administrado con uno o más agentes terapéuticos adicionales seleccionados de trastuzumab (Herceptin®), T-DM1 (Kadcyla®) y pertuzumab (Perjeta®). En una realización, un HER2 TDB es co-administrado con trastuzumab. En una realización, un HER2 TDB es co-administrado con T-DM1. En una realización, un HER2 TDB es co-administrado con pertuzumab. En una realización, un HER2 TDB es co-administrado con trastuzumab y pertuzumab. En una realización, un HER2 TDB es co-administrado con T-DM1 y trastuzumab.

En un aspecto adicional, la invención proporciona formulaciones farmacéuticas que comprenden alguno de los anticuerpos anti-CD3 previstos en el presente, p.ej. para utilizar en alguno de los métodos clínicos anteriores. En una realización, una fórmula farmacéutica comprende alguno de los anticuerpos anti-CD3 previstos en el presente y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización, una formulación farmacéutica comprende alguno de los anticuerpos anti-CD3 previstos en el presente y, al menos, un agente clínico adicional, por ejemplo, según lo descrito en el presente.

Los anticuerpos de la invención pueden utilizarse solos o en combinación con otros agentes en un tratamiento. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención puede coadministrarse con, al menos, un agente clínico adicional. En ciertas realizaciones, un agente clínico adicional es un agente quimioterapéutico, agente inhibidor del crecimiento, agente citotóxico, agente utilizado en terapia de radiación, agente anti-angiogénesis, agente apoptótico, agente anti-tubulina, u otro agente, tal como un antagonista del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (p.ej. un inhibidor de tirosina quinasa), inhibidor de HER1 / EGFR (p.ej. erlotinib (Tarceva*TM*), inhibidor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (p.ej. Gleevec*TM* (mesilato de imatinib)), un inhibidor de la COX-2 (p.ej. celecoxib), interferón, citoquinas, anticuerpos que no sean el anticuerpo anti-CD3 de la invención, como un anticuerpo que se une a uno o más de los siguientes receptores ErbB2, ErbB3, ErbB4, PDGFR-beta, BlyS, APRIL, BCMA VEGF, o VEGF objetivo, TRAIL/Apo2, PD-1, PD-L1, PD-L2, u otro agente bioactivo o de química orgánica.

En algunas modalidades, la invención proporciona un método en el que el agente clínico adicional es un glucocorticoide. En una realización, el glucocorticoide es dexametasona.

Dichas terapias de combinación indicadas anteriormente abarcan la administración

combinada (donde dos o más agentes clínicos se incluyen en las mismas formulaciones o formulaciones separadas) y la administración separada, en cuyo caso, se pueden producir la administración del anticuerpo de la invención antes, simultáneamente, o después de la administración del agente o agentes clínicos adicionales. En una realización, la administración del anticuerpo anti-CD3 y la administración de un agente clínico adicional se producen en un mes o en el plazo de aproximadamente una, dos o tres semanas, o en aproximadamente uno, dos, tres, cuatro, cinco, o seis días, el uno del otro. También se puede usar cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 de la invención (p. ej., los anticuerpos anti-CD3 biespecíficos de la invención que se unen a CD3 y a una segunda molécula biológica como, p. ej., el antígeno de la superficie celular, el antígeno de un tumor, como el anticuerpo TDB de la invención o la variante correspondiente) en combinación con el tratamiento de radiación.

Un anticuerpo de la invención (o cualquier agente clinico adicional) se puede administrar por cualquier medio adecuado, que incluye parenteral, intrapulmonar e intranasal, y, si se desea para el tratamiento local, la administración intralesional. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, o subcutánea. En algunas representaciones, el anticuerpo se administra por vía subcutánea. En algunas representaciones, el anticuerpo anti-CD3 que se daministra mediante inyección subcutánea exhibe una respuesta menos tóxica en el paciente en que el mismo anticuerpo anti-CD3 le es administrado por inyección intravenosa. La dosis puede administrarse por cualquier vía adecuada, por ejemplo, mediante inyecciones, como inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica. En el presente se contemplan varios cronogramas de administración de la dosis que incluyen, por ejemplo, administraciones únicas o múltiples, en diversos puntos de tiempo, administración en bolo e infusión de pulso.

Los anticuerpos de la invención se formularían, dosificarían y administrarían de manera coherente con la buena práctica médica. Los factores a considerar en este contexto incluyen el trastorno particular a tratar, el mamífero específico que se trata, la condición clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de suministro del agente, el método de administración, el cronograma de la administración y otros factores conocidos por los médicos. El anticuerpo no necesariamente debe ser, pero se formula opcionalmente con uno o más agentes utilizados en la actualidad para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad del anticuerpo presente en la formulación, el tipo de trastorno o tratamiento y otros factores analizados anteriormente. En general, se utilizan en las mismas dosis y vías de administración que se describen en el presente, o aproximadamente del 1 al 99% de las dosis descritas en el presente, o en cualquier dosis y por cualquier vía que se determine que es empíricamente/clínicamente adecuada.

Para la prevención o el tratamiento de la enfermedad, la dosis adecuada de un anticuerpo de la invención (cuando se usa solo o en combinación con uno o más de otros

agentes clínicos adicionales) dependerá del tipo de enfermedad a tratar, el tipo de anticuerpo, la gravedad y el curso de la enfermedad, si el anticuerpo se administra con fines preventivos o clínicos, tratamiento previo, la historia clínica del paciente y la respuesta al anticuerpo, y la discreción del médico tratante. El anticuerpo se administra convenientemente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos.

Como propuesta general, la cantidad clínicamente eficaz del anticuerpo anti-CD3 administrada a humanos estará en el rango de alrededor de 0,01 a 100 mg/kg del peso corporal del paciente ya sea mediante una o más administraciones. En algunas realizaciones, el anticuerpo utilizado es de alrededor de 0,01 a 45 mg/kg, alrededor de 0,01 a 40 mg/kg, alrededor de 0,01 a 35 mg/kg, alrededor de 0,01 a 30 mg/kg, alrededor de 0,01 a 25 mg/kg, alrededor de 0,01 a 20 mg/kg, alrededor de 0,01 a 15 mg/kg, alrededor de 0,01 a 10 mg/kg, alrededor de 0,01 a 5 mg/kg, o alrededor de 0,01 a 1 mg/kg administrador diariamente, por ejemplo. En una realización, un anticuerpo anti-CD3 descrito en el presente se administra a humanos a una dosis de alrededor de 100 mg, alrededor de 200 mg, alrededor de 300 mg, alrededor de 400 mg, alrededor de 500 mg, alrededor de 600 mg, alrededor de 700 mg, alrededor de 800 mg, alrededor de 900 mg, alrededor de 1000 mg, alrededor de 1100 mg, alrededor de 1200 mg, alrededor de 1300 mg o alrededor de 1400 mg el día 1 de los ciclos de 21 días. La dosis puede administrarse como una dosis única o con dosis múltiples (p.ej. 2 o 3 dosis), como infusiones. Para las dosis repetidas durante varios días o más, según la condición, el tratamiento se mantendría, en general, hasta que se produzca una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Una dosis ejemplar del anticuerpo estaría en el rango de alrededor de 0,05 mg/kg a alrededor de 10 mg/kg. Por lo tanto, una o más dosis de alrededor de 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas) podría administrarse al paciente. Dichas dosis pueden administrarse intermitentemente, por ejemplo, cada semana o cada tres semanas (p.ej. de modo tal que el paciente reciba de aproximadamente dos a unas veinte o, por ejemplo, alrededor de seis dosis del anticuerpo anti-CD3). Puede administrarse una dosis de carga inicial más elevada, seguida de una o más dosis más bajas. El avance de este tratamiento se monitoriza fácilmente a través de técnicas y ensayos convencionales.

En algunas realizaciones, los métodos pueden comprender además un tratamiento adicional. El tratamiento adicional puede ser terapia de radiación, cirugía, quimioterapia, terapia genética, terapia de ADN, terapia viral, terapia de ARN, inmunoterapia, trasplante de médula osea, nanoterapia, terapia de anticuerpo monoclonal o una combinación de los anteriores. El tratamiento adicional puede ser en forma de tratamiento adyuvante o neoadyuvante. En algunas realizaciones, el tratamiento adicional es la administración del inhibidor de molécula pequeña enzimática o del agente anti-metastásico. En algunas realizaciones, el tratamiento adicional es la administración de agentes limitantes de efectos secundarios (p.ej. agentes destinados a disminuir la ocurrencia o gravedad de los efectos secundarios del tratamiento, como los agentes antinauseosos, etc.). En algunas realizaciones, el tratamiento adicional es la terapia de radiación. En algunas

realizaciones, el tratamiento adicional es cirugía. En algunas realizaciones, el tratamiento adicional es una combinación de terapia de radiación y cirugía. En algunas realizaciones, el tratamiento adicional es la irradación gamma. En algunas realizaciones, el tratamiento adicional puede ser una administración separada de uno o más de los agentes clínicos antes descritos.

H. Artículos de fabricación

En otro aspecto de la invención, se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento, la prevención o el diagnóstico de los trastornos antes descritos. El artículo de fabricación comprende un envase y una etiqueta o un inserto del empaque en o asociado con el envase. Los envases adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas, bolsas de solución IV, etc. Los envases pueden estar formados de diversos materiales como vidrio o plástico. El envase contiene una composición que es por sí misma o combinada con otra composición eficaz para tratar, prevenir o diagnosticar la condición y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el envase puede tener una bolsa de infusión o un vial que tiene un tapón perforable con una aguja de inyección hipodérmica). Por lo menos un agente activo de la compoisición es un anticuerpo de la invención. La etiqueta o el inserto del empaque indica que la composición se utiliza para tratar la condición de elección. Por otra parte, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer envase con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un anticuerpo de la invención; y (b) un segundo envase con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un agente citotóxico o de otro modo clínico adicional. El artículo de fabricación en esta realización de la invención puede comprender, además, un inserto del empaque que incique que la composiciones pueden utilizarse para tratar una condición especíica. Opcional o adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo (o tercer) envase que comprende una solucíoon amortiguadora farmacéuticamente aceptable, como agua bacteriostática para inyección (BWFI), solución salina amortiguada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, que incluyen otras soluciones amortiguadoras, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

III. EJEMPLOS

Los siguientes son ejemplos de métodos y composiciones de la invención. Se entiende que pueden ponerse en práctica otras diversas versiones, dada la descripción general proporcionada anteriormente.

Ejemplo 1. Generación de Anticuerpos Anti-CD3

Antígenos CD3ε

A. CD3ε humano y macaco biespecíficos+ CD3γ fusionado con IgG2a-Fc de ratón (CD3εγ-muFc)

El ADNc que codifica porciones extracelulares de CD3ε humano o de mono cynomolgus (macaco) o CD3γ se fusionó en el C-terminal con un IgG2a de ratón en Fc para generar fusiones de CD3-Fc. Los ADNc que codifican los dominios extracelulares de CD3ε y CD3γ humano o macaco se generaron con ARN total de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) activada con anti-CD3/anti-CD28. Las PBMC normales se activaron mediante anti-CD3 y anti-CD28 inmovilizados por placa en RPMI complementado con un 10% de FBS durante 72 h. El ARNm total se aisló con un mini kit RNeasy de Qiagen. Se clonó el ADNc con iniciadores específicos de genes por RT-PCR en vectores TOPO con productos de PCR amplificados con polimerasa Taq siguiendo el protocolo proporcionado con el kit de clonación TOPO TA de Invitrogen. Los fragmentos resultantes se introdujeron en un vector de expresión mamífero que contiene un dominio Fc de IgG2a murino por subclonación libre de restricciones con polimerasa de ADN de alta fidelidad Phusion (New England Biolabs, Catálogo n.° M0530L). Los fragmentos de CD3 se amplificaron de esta manera con la superposición de las regiones contenidas en el plásmido de la plantilla para orientarlos directamente en forma descendente de la secuencia de la señal y el N-terminal al Fc murino.

Tanto para las construcciones humana como de macaco, el CD3ε-Fc que contiene el plásmido se co-expresó temporalmente con el CD3γ-Fc que contiene el plásmido en las células CHO mamíferas. Los heterodímeros de CD3ε/γ se purificaron con sefarosa de proteína A (Pharmacia Biotech).

B. Conjugados de KLH de péptido de N-terminal (CD3ε-KLH)

Se sintetizaron fragmentos de péptidos que contienen secuencias de N-terminal de CD3ε de macaco y humano. Los fragmentos destinados a la inmunización se conjugaron con hemocianina de lapa californiana (KLH), una proteína portadora ampliamente utilizada para generar una respuesta inmune importante. Al añadir la cisteína de origen natural en la posición 28 para el CD3ε de macaco y humano permitía el acoplamiento de KLH activada por maleimida a la cisteína de C-terminal que contiene tiol.

*C. CD3ε-26mero-CD3*γ de cadena sencilla *(CD3εγ)*

Los ADNc que codifican porciones extracelulares de subunidades CD3ε y CD3γ humanas fueron generados por RCP. Los aminoácidos 1-97 de CD3ε humano y los aminoácidos 1-81 de CD3γ humano se conectaron con un conector peptídico flexible de 26 aminoácidos para formar una construcción de CD3ε-26mero-CD3γ (CD3εγ) (Figura 1). La construcción se clonó en un vector de expresión con un His-tag para la secreción de *E. coli* con el promotor de fosfatasa alcalina y la secuencia de la señal de secreción STIII. CD3εγ se purificó en una columna Ni y posteriormente se volvió a plegar. A continuación, el CD3εγ debidamente plegado se purificó luego con una columna de afinidad OKT3.

Además, para algunos experimentos de aglutinación, se compró CD3ε comercial a Creative Biomart, Shirley, New York 11967 (Número de catálogo CD3E-2194H).

Inmunizaciones

A. Inmunizaciones de ratón

Se inmunizó a ratones BALB/c o C57BL/6 (2 µg o 10 µg/inyección por ratón). Los antígenos, suspendidos en adyuvante de monofosforil lípido A /trehalosa dicorinomicolato, se inyectaron en la almohadilla de la pata a intervalos de 3 a 4 días por un total de 12-15 refuerzos. Tres días después del refuerzo previo a la infusión final, se recolectaron linfocitos de bazos y nódulos linfáticos de ratones inmunizados. Los linfocitos de los ratones aislados se fusionaron con células de mieloma SP2/0-Ag14 (Recolección de cultivo tipo estadounidense) con el aparato Cyto Pulse CEEF-50 (Cyto Pulse Sciences). Brevemente, después de lavar dos veces con medio C de Citofusion (N.° de cat. LCM-C), las células del bazo y las células SP2/0-Ag14 aisladas se mezclaron en una proporción de 1:1 y luego se suspendieron a 10 millones de células/ml en medio C de Citofusion, se realizó electrofusión de acuerdo con la instrucción del fabricante. Las células fusionadas se cultivaron en medio C de ClonaCell-HY (N.° de cat. 03803) durante la noche a 37 °C en una incubadora de CO_2 al 7%. Al día siguiente, las células fusionadas se centrifugaron y luego se suspendieron en 10 ml de medio C de ClonaCell-HY y luego se mezclaron suavemente con 90 ml de medio D basado en metilcelulosa ClonaCell-HY (N.° de cat. 03804) que contiene componentes de HAT. Las células se colocaron en placas OmniTray (Thermo Scientific) y se permitió su crecimiento a 37 °C en una incubadora de CO_2 al 7%. Después de 6 a 7 días de incubación, se recogieron clones de hibridoma individuales con ClonePix FL (Molecular Devices) y se transfirieron en placas de cultivo de células de 96 pozos (N.° 353075, Becton Dickinson) con medio E de 200 µl/pozo de ClonaCell-HY (N.° de cat. 03805). Los medios de cultivo de hibridoma se cambiaron antes de la evaluación ELISA.

B. Inmunizaciones de conejo

Se realizaron inmunizaciones en conejos con 0,5 mg/inyección con CD3ε-KLH humano y de macaco CFA/IFA cada 2 semanas por 5 inyecciones (d0, d14, d28, d42, d56). Se tomaron sangrados los días 52 y 66.

Las fusiones y selecciones de PEG se realizaron de la siguiente manera: Se evaluaron los clones para unión a la porción N-terminal de CD3ε conjugada con tiroglobulina (THY) con ELISA. Se determinó que todos los clones positivos tienen una reacción cruzada con CD3ε de macaco mediante ELISA y se seleccionaron 16 clones únicos para subclonación. Se extrajo el ARN total del sedimento celular congelado y se purificó con un kit RNeasy de Qiagen siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADNc de primera cadena se sintetizó con un paso de RT-PCR (Qiagen). Los dominios VH y VL de conejo se amplificaron aún más con PCR con un protocolo descrito para generar genotecas inmunes de conejo (Kontermann y Dubel. *Antibody Engineering*. 1: 115-123, 2010). Se

designó la degeneración moderada para representar los genes de inmunoglobulina de la línea germinal del conejo común.

Selección de anticuerpos

A. Selección de hibridoma de ratón

3 días después del cambio de medios, se seleccionaron supernadantes de hibridoma mediante ELISA para la unión con CD3ε tanto humano como de macaco, como se describe a continuación. Todos los clones positivos de ELISA se seleccionaron además mediante citometría de flujo para la unión a células T Jurkat humanas, PBMC humanas y PBMC de macaco (Figuras 2 y 3). Se purificaron supernadantes de hibridoma mediante cromatografía de afinidad de Proteína A, luego se realizó una filtración estéril (tamaño de poro de 0,2-µm, Nalge Nunc International, NY, EE.UU.) y se almacenaron a 4°C en PBS. Se confirmaron mAbs purificados mediante ELISA antes de la evaluación en ensayos funcionales. Se determinó el isotopo mAb con un kit para isotipos de anticuerpos monoclonales de ratón de Roche Diagnostics Corporation.

La Figura 4A muestra las secuencias de aminoácidos de dominios variables de cadena ligera y pesada de los anticuerpos anti-CD3 13A3, 72H6 y 19B1. La Figura 4A también delimita las secuencias de HVR para cada uno de los tres anticuerpos. Las Figuras 4B, 4C, 5A y 5B muestran las secuencias de aminoácidos de dominios variables de cadena ligera y pesada de otros anticuerpos anti-CD3.

B. Selección después de las inmunizaciones de conejo

Se clonaron ocho secuencias de cadena pesada individuales y seis secuencias de cadena ligera individuales de las líneas de células de hibridoma. La Figura 7 muestra las secuencias de cadena pesada y ligera para uno de estos anticuerpos, Rab17. Debido a la gran similitud en la secuencia se decidió enfocarse en 6 pares pesados y ligeros. Los 6 anticuerpos resultantes se expresaron como IgG quiméricos de conejo/humano a pequeña escala (cultivos de 100 ml de 293S) y se seleccionaron para la unión a CD3 epsilon mediante ELISA.

Caracterización de anticuerpos: ensayos de afinidad de unión y actividad de activación de células T

A. Ensayo ELISA de unión de CD3εγ

El ensayo ELISA de unión de CD3εγ se llevó a cabo en placas ELISA de microtitulación de 96 pozos (Greiner, Alemania) recubiertos con aminoácidos de N-terminal de CD3ε ya sea humano/de macaco conjugados con THY o CD3ε/γ ya sea humano/de macaco fusionado con Fc murino a 2 µg/ml en una solución amortiguadora de carbono de 0,05 M (pH 9,6), 4°C durante la noche. Después de lavar tres veces con solución amortiguadora de lavado (0,05% Tween 20 en PBS), las placas se bloquearon con 200 µL de diluyentes de ensayo ELISA con BSA. Se añadieron e incubaron 100 µL de supernadantes cultivados o mAb purificados diluidos durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres

veces y se incubaroncon IgG Fc anti ratón de cabra conjugado con HRP durante 1 hora. Después de lavar tres veces, se detectó una enzima ligada al agregar 100 µL/pozo de sustrato de TMB (BioFX Laboratories, MD, EE.UU.) durante 5 minutos. Se detuvieron las reacciones al agregar 100 µL/pozo de reactivo de detención (BioFX Laboratories, MD, EE.UU.) y la detección de color a A_{630} *nm*.

B. Análisis de citometría de flujo

Células T Jurkat humanas, PBMC humanas o PBMC de macaco se lavaron dos veces con solución amortiguadora de tinción de FACS (solución salina amortiguada con fosfato que contiene un 1% de suero fetal bovino) y luego se suspendieron en solución amortiguadora de tinción de FACS hasta una concentración final de 5 x 10^6 celulas/ml. Se agregaron células de 100 µl a la placa de cultivo de tejido de 96 pozo con fondo en U (#353077, Becton Dickinson) y se agregaron 100 µl de supernadantes de hibridoma o mAbs purificados diluidos. Después de 30 minutos de incubación en hielo, se lavaron las células dos veces con solución amortiguadora de tinción de FACS y se tiñeron posteriormente con anticuerpo IgG anti ratón de cabra conjugado con FITC o aloficocianina (APC)(#1012-11, Southern Biotech) a una dilución de 1:300 durante 30 minutos. Después de lavar dos veces con solución amortiguadora de tinción de FACS, las células se analizaron mediante citometría de flujo FACSCalibur (BD Biosciences). Los datos se analizaron con el software FlowJo (Tree Star, Inc.).

C. Ensayo de activación de célula T humana

Se recolectó sangre humana en jeringas heparinizadas y se aisló PBMC con Leucosep (Greiner Bio-one, n.° de cat. 227290P) y Ficoll Paque Plus (GE Healthcare Biosciences, n.° de cat. 95038-168), según lo recomendado por la fabricación. Las células se lavaron en medio RPMI que contiene un 10% de FBS, complementado con GlutaMax (Gibco, n.° de cat. 35050-061), penicilina y estreptomicina (Gibco, n.° de cat.15140-122), y se agregaron ~0,2 millones de células suspendidas a una placa con fondo en U de 96 pocillos. Se agregaron anticuerpos anti-CD3 entre 0,01 y 10 µg/ml. Después cultivar durante ~ 20 horas, se lavaron las células con solución amortiguadora FACS (0,5% BSA, 0,05% azida de Na en PBS). Luego se tiñeron las células con anti-CD69-FITC (BD, cat n.° 555530), anti-CD25-PE (BD, cat n.° 555432) anti-CD4-APC (BD, cat n.° 555349) o anti-CD8-APC (BD, cat n.° 555369) en solución amortiguadora FACS, se lavaron con solución amortiguadora FACS y se suspendieron en 100 ul de solución amortiguadora de FACS que contiene 1µg/ml de yoduro de propidio. Se recopilaron los datos en un citómetro de flujo FACSCalibur y se analizaron con FlowJo. Se determinó el grado de activación de las células T comparando el porcentaje de población CD69 + y CD25 + en las células CD4 + o CD8 + T.

D. Ensayo de activación de células T en macacos

Se extrajo sangre de macaco en tubos heparinizados. Se lisaron glóbulos rojos dos veces

con tampón de lisis de glóbulos rojos ACK (0,874% de NH4Cl, 0,1% de KHCO3, 0,00368 de EDTA de disodio). Las células se lavaron en medio RPMI que contiene un 10% de FBS, complementado con GlutaMax (Gibco, n.° de cat. 35050-061), penicilina y estreptomicina (Gibco, n.° de cat.15140-122), y se agregaron ~0,2 millones de células suspendidas a una placa con fondo en U de 96 pocillos. Se agregaron anticuerpos anti-CD3 a 10 µg/ml. Después cultivar durante ~ 20 horas, se lavaron las células con solución amortiguadora FACS (0,5% BSA, 0,05% azida de Na en PBS). Luego se tiñeron las células con anti-CD69-FITC (BD, n.° de cat. 555530), anti-CD25-PE (BD, n.° de cat. 555432) anti-CD4-APC (BD, n.° de cat. 551980) en solución amortiguadora FACS, se lavaron con solución amortiguadora FACS y se suspendieron en 100 µg de solución amortiguadora de FACS que contiene 1 µg/ml de yoduro de propidio. Se recopilaron los datos en un citómetro de flujo FACSCalibur y se analizaron con FlowJo. Se determinó el porcentaje de activación de células T al comparar el porcentaje de la población de CD69+ y CD25+ en las células T CD4+.

Generación de variantes de anticuerpos anti-CD3

A. Clonación y secuenciación de hibridomas de reacción cruzada humano/macoco de ratón CD3εγ

Se extrajo el ARN total de células de hibridoma de ratón con el kit RNeasy (Qiagen) y se sintetizó ADNc de primera cadena con un kit SuperScript III RT (Invitrogen). Se amplificaron genes de anticuerpo con RCP de polimerasa Taq con corrección de errores con una mezcla de cebadores 5' degenerados y cebadores 3' Cγ□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□Se purificaron los productos RCP y se obtuvieron las regiones variables de los anticuerpos de cadenas ligeras y pesadas mediante la secuenciación del producto de RCP. Se digirieron las regiones variables de anticuerpo de cadenas ligeras y pesadas con enzimas de restricción adecuadas y se clonaron en los vectores de expresión pRK respectivos. Los anticuerpos murinos se expresaron en 293 células.

B. Humanización

Se alinearon las secuencias de hibridomas de reacción cruzada de humano/macaco CD3εγ hasta lograr el consenso humano o los dominios variables pesados o ligeros de la línea germinal más homólogos posibles (Figura 7). Se derivó una secuencia de consenso llamada mu40G5c de los dominios variables de cadena pesada o ligera de los clones de hibridona relacionados (Figura 7). Se diseñaron regiones hipervariables (HVR) en marcos humanos de selector para generar injertos de CDR humanizados (consulte, por ejemplo, las figuras 8A-8F). Variantes humanizadas se evaluaron en forma de fragmentos Fab o como IgG. Las posiciones de dominio VL 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) y las posiciones de dominio VH 26-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) se utilizaron para los injertos (Figuras 8A-8F). También se generaron variantes adicionales que incluyeron varias combinaciones de una o más posiciones de vernier de ratón y se evaluaron para

determinar la afinidad de unión (consulte, p.ej., las Figuras 9A-9F). Se incorporaron residuos de dominio de variables murinas en posiciones seleccionadas de *vernier* en una secuencia humanizada final con base en su capacidad para mejorar la afinidad de unión. La Figura 10 muestra las afinidades de unión monovalentes para los anticuerpos humanizados seleccionados para los diferentes antígenos CD3ε. La Figura 11 muestra las afinidades de unión para las variantes de afinidad del anticuerpo anti-CD3 humanizado 38E4 (38E4v1-38E4v9) y 40G5c.

C. Mapeo parátopo

Cada residuo en HVR-L3 y HVR-H3 de hu38E4 se mutó por separado a la alanina con la mutagénesis Kunkle. Además, la posición 95 en HVR-H3 también se mutó a serina, treonina o glutamato. Se expresaron la variantes con estas mutaciones puntuales como Fab en células HEK293 y se seleccionaron inicialmente con un método de cinética de ciclo único en un Biacore T100. También se aumentaron las variantes seleccionadas y se purificaron para un método convencional de cinética por multiciclo. Para la cinética de ciclo único, se inmovilizaron chips de sensor Biacore serie S CM5 con anticuerpos Fab anti-humanos (kit de captura de Fab humana, GE Healthcare). Cada Fab fue capturado de sobrenadante de cultivo y las concentraciones crecientes (que van desde 3 nM a 250 nM en tampón de IESE) de CD3εγ humano fueron inyectados secuencialmente con un caudal de 30 µl/min en un solo ciclo de análisis sin regeneración de la superficie entre las inyecciones; se adquirió una disociación de 10 min para cada ciclo. Para el ciclo múltiple de cinética convencional, se inmobilizaron CD3εγ humano, CD3εγ macaco o un 27-mer péptido sobre chip sensor Biacore serie S CM5 con el uso del kit de acoplamiento amino de Biacore. Diluciones seriadas 3 veces de cada variante Fab se inyectaron con un caudal de 30 µl/min. Cada muestra se analizó con un protocolo de Asociación de 3 minutos y disociación de 3 minutos. En ambos métodos, los chips Biacore se regeneraron mediante 10 mM glicina (pH 1.7). Se corrigió la respuesta de unión mediante sustracción en blanco y se utilizó un modelo de Languir 1:1 de colocación simultánea de k_{on} y k_{off} para el análisis de la cinética. Los efectos de estas mutaciones, resumidos en la figura 12, indican residuo de la cadena ligera R96 y residuos de cadena pesada Y97, R99 y F100b juegan un papel crítico en el enlace a CD3εγ.

D. Mapeo epítopo CD3

Se introdujeron mutaciones de la alanina en CD3ε1-27-Fc para evaluar el reconocimiento de epítopos de anticuerpos de anti-CD3ε N-terminal vinculante. Se inmovilizó cada variante de CD3ε1-27-Fc en placas Nunc Maxisorp de un día para el otro en PBS a 2 µg/ml a 4 °C. Tras bloquear las placas con leche en polvo al 2% en PBS con 0,05% de Tween 20 durante 1h, se agregó 100 µl de 3 nM anti-CD3ε a cada uno bueno y se dejó enlazar durante 1h a 25 °C. Después de 6 lavados con PBS con un 0,05% Tween 20, se detectó la unión de anticuerpos por la adición de anti-ratón IgG-HRP de anticuerpo secundario, como se muestra en la figura 13A.

CD3εγ se sub clonó en un Fagémido M13 que contiene una etiqueta de gD C-terminal seguido de un codón de parada ámbar, para que pueda aparece en fago o expresarse en una cepa no supresora de *E. coli*. Se utilizó este Fagémido CD3εγ como una plantilla para hacer las mutaciones individuales de alanina en CD3ε mediante mutagénesis Kunkel. Cada mutante de alanina CD3ε que aparece en Fago, se confirmó por secuenciación del ADN aislado de una sola colonia, crecido durante la noche en 2YT/Carb plus fago KO7 ayudante y se purificó mediante la precipitación de PEG. El efecto de la mutación de alanina en CD3εγ en la unión de anticuerpos anti-CD3 se evaluó mediante un fago ELISA. Se inmovilizó cada anticuerpo anti-CD3 en una placa maxisorp NUNC a 2 µg/ml de tampón PBS durante la noche a 4 °C. Se agregó el sobrenadante fago purificado que muestra una variante de alanina CD3εγ (1.0 OD450) a la placa y se dejó enlazar a temperatura ambiente con agites durante 1 h. Después del lavado, se detectó fago ligado con anti-M13-HRP (GE Healthcare cat. # 45-001-419). Se comparó el ligado de cada variante de alanina CD3εγ con el ligado fago CD3εγ tipo salvaje (figura 13B). También se caracterizaron las variantes de alanina que afectaron enlace con anticuerpos anti-CD3, por la evaluación de enlace como una función de la concentración de fago (Figura 13C).

Para cuantificar el impacto de las mutaciones de alanina en CD3 en la unión de anticuerpos, se expresaron mutantes de alanina de CD3 en una cepa de no supresora de *E. coli*. Las variantes CD3εγ secretadas fueron capturadas de la fracción periplásmica cruda mediante el uso del anticuerpo anti-CD3 UCHT1v9. Se inmobilizó a UCHT1v9 en un chip serie S CM5 a través del acoplamiento de amina mediante el uso del kit de captura del anticuerpo anti-humano IgG (Fc) (BR-1008-39) de GE Healthcare. Se realizaron mediciones SPR en el instrumento Biacore 4000, mediante el software de evaluación cinética. Para medir las afinidades vinculantes monovalentes, se utilizaron anticuerpos anti-CD3 biespecíficos, en los cuales un brazo era el anti-CD3 a ser probado y el brazo reconoció un antígeno irrelevante. Los anticuerpos anti-CD3 biespecíficos se transmitieron por el sobrenadante capturado en una serie de concentración de diluciones dobles de 0,39 a 100 nM. La cinética resultante (figura 13D) se midió y calculó con el software de Biacore 4000 BIAevaluation (código de producto 28-9664-57).

E. Mapeo estructural del lugar de unión de CD3ε

1. Hu38E4.v1 Fab

Se mezcló Hu38E4.v1 Fab, disuelto en NaCl 0,15 M, 25 mM tris, pH 7,5 a 10 mg/ml y un doble exceso molar (1 mg) de péptido CD3ε, QDGNEEMGGITQTPYK (N.° de ID de SEC.: 284) (Figura 14A) y se sometió a ensayos de cristalización. Se realizó la proyección inicial con una matriz rala de precipitados en formato de difusión de vapor por gota sentada. Los cristales optimizados se desarrollaron en una mezcla 1:1 con una solución de depósito con 70% de v/v de metilpentano, y 0,1 m de tampón HEPES a un pH de 7,5. El depósito se utilizó como crioprotector. Los cristales se transferirieron a temperatura criogénica por inmersión súbita en nitrógeno líquido.

Los datos de difracción de co-cristales péptidos hu38E4.v1 y CD3ε se recopilaron en

línea de haz del Advanced Photon Source hu38E4, con un detector CCD v1. Luego, se integraron las defracciones registradas pueden y se ampliaron con el uso del programa HKL2000.

La estructura se escalonó mediante el método de reemplazo molecular (MR) utilizando el programa Phaser. El modelo de búsqueda de MR fue una sub-unidad Fab derivada de una estructura cristalina del complejo HGFA/Fab (código PDB: 2R0L). El péptido de complejo CD3ε se desarrolló en la estructura basada en un mapa Fo-Fc. Como consecuencia, la estructura se refinó con los programas REFMAC5 y PHENIX, implementando las funciones objetivo de probabilidad, el método de refinamiento de factor-B individual anisotrópico y el método de refinamiento TLS, para lograr la convergencia. Las estadísticas de datos y el refinamiento se muestran en la tabla 3A.

TABLA 3A. Recopilación de datos y estadísticas de refinamiento para el complejo hu38E4.v1/CD3ε

Grupo de espacio	P3221
Células unitarias	a=73,2Å, b=73,2Å,c=183,7Å α=90° β=120° γ=90°
Resolución	50,0 - 1,95 Å
Cantidad total de reflejos	42632 (4188)[1]
Integridad (%)	100 (100)
Redundancia	19,7 (8,3)
I/σ	7,1 (3,0)
Rsym[2]	0,112 (0,812)
Rango de resolución	50 - 1,95 Å
Rcryst[3] / Rfree[4]	0,152/0,185
Atomos que no son de hidrógeno	3960
Moléculas de agua	446
Promedio B, General	21,97
Promedio B, Proteína	20,63
Promedio B, Agua	32,27
longitudes de enlace r.m.s.d.	0,009 Å
ángulos r.m.s.d.	1,258°

[1]Los valores entre paréntesis son para la cubierta con resolución más alta, que es 2,02 Å–1,95 Å.

[2]Rsym = $\Sigma|I_{hi} - I_h|/ \Sigma I_{hi,}$ donde I_{hi} es la intensidad aumentada de la observación relacionada con la simetría *i*th del reflejo *h e* I_h es el valor medio.

[3]Rcryst = $\Sigma_h|F_{o,h} - F_{c,h}| / \Sigma_h F_{o,h}$, donde $F_{o,h}$ y $F_{c,h}$ son las amplitudes de factor estructural observadas y calculadas para el reflejo *h*.

[4]El valor de R_{libre} se calcula para el 5% de las reflexiones escogidas de forma aleatoria en el perfeccionamiento.

La estructura cristalina del complejo péptido Fab/CD3ε hu38E4.v1 se determinó a una resolución del 1.9Å. La estructura reveló que el péptido CD3ε hace un pequeño giro y se inserta profundamente en la hendidura entre las cadenas pesadas y ligeras de Fab 38E4.v1 (figuras 14B y 14C). La unión entierra 666 Å2 del área de superficie accesible de solvente entre el péptido y el fragmento Fab y consiste en una intrincada red de enlace interacciones iónicas, hidrofóbicas y de hidrógeno (Figura 14D). El anillo de piroglutamato (pyroglu) N-terminal se empaca contra la cadena pesada Tyr33 y hace un enlace de hidrógeno con la cadena pesada His35 en RHV-H1. La cadena lateral abultada del residuo F100b en HVR-H3 empuja a His35 en una orientación adecuada para su interacción con pyroglu y explica la pérdida de enlace observada cuando F100b muta a alanina, un residuo de la cadena lateral pequeño. Además, en consonancia con los resultados del análisis de alanina, el R96 en CDR-L3 hace una unión hidrógena crítica con el grupo carboxilo en el pyroglu, mientras que Y97 en CDR-H3 hace una unión hidrógena con el Met7 del péptido CD3ε (figura 14E). Curiosamente, mientras que la substitución de alanina en R99 en CDR-H3 tiene un impacto dramático en la unión del antígeno, la estructura revela que esta cadena apunta fuera del péptido CD3ε y no se involucra en las interacciones con el péptido. En cambio, R99 hace amplios contactos con varios residuos en CDR-H3, entre ellos un enlace de hidrógeno con D101 y un empaque hidrofóbico contra Y100a que también impacta en el residuo vernier, Y49 LC (figura 14F). Estas interacciones son, probablemente, importantes para el apoyo y la disposición general de los bucles CDR en el 38E4.v1 Fab organizando la crítica hendidura central entre las cadenas pesadas y ligeras para permitir el enlace de péptido CD3ε.

La Figura 14G identifica todos los residuos de la 38E4.v1 Fab que estaban decididos a residir dentro de 5 Å desde el péptido CD3ε. Estos residuos de contacto antígeno son idénticos entre hu38E4.v1 y hu40G5c, con la excepción que ese residuo G96 de hu38E4.v1 es un residuo de serina (S96) en hu40G5 (ver figura 14 H, que representa la ubicación del residuo de contacto G96 de hu38E4.v1).

Los contactos entre anti-CD3 (38E4.v1) y el péptido $CD3_{\varepsilon\gamma}$ se calculan con base en el análisis de alanina. Los epítopos reconocidos por el 38E4v1 anti-CD3 son contactos con una distancia de 3,5 Angstroms o menos, como en la siguiente tabla 3B. De este análisis, se descubrió que los epítopos CD3 Gln1 (PCA1, ácido piroglutámica), Asp2, Glu6 y Met7 son un contacto importante que forman residuos con la paratopes de la cadena ligera y las regiones variables de la cadena pesada del anticuerpo CD3.

TABLA 3B. Contactos de CD3 para el complejo hu38E4.v1/CD3ε

Cadena de anticuerpos	**Residuos**	**Nombre del átomo**	**Átomo**	**Péptido CD3**	**Residuos**	**Nombre del átomo**	**Átomo**	**Distancia**
/L/	96(ARG)	NH2	N	**/A/**	**1(PCA)**	**O**	**O**	2,76
/H/	35(HIS)	NE2	N	/A/	1(PCA)	OE	O	2,85*
/L/	96(ARG)	NH1	N	**/A/**	**1(PCA)**	**O**	**O**	2,9
/L/	96(ARG)	CZ	C	/A/	1(PCA)	O	O	3,24
/H/	33(TYR)	CG	C	/A/	1(PCA)	OE	O	3,27
/L/	96(ARG)	NH2	N	/A/	1(PCA)	OE	O	3,28
/H/	100(TYR)	CD1	C	/A/	1(PCA)	O	O	3,33
/H/	33(TYR)	CB	C	/A/	1(PCA)	OE	O	3,34
/L/	96(ARG)	NH2	N	/A/	1(PCA)	CD	C	3,35
/H/	33(TYR)	CD2	C	/A/	1(PCA)	OE	O	3,44
/H/	50(TRP)	CH2	C	/A/	1(PCA)	N	N	3,45
/H/	33(TYR)	CD2	C	/A/	1(PCA)	CD	C	3,47
/H/	50(TRP)	CZ3	C	/A/	1(PCA)	N	N	3,48
/L/	**94(LEU)**	**N**	**N**	/A/	2(ASP)	OD1	O	2,71
/H/	50(TRP)	CH2	C	/A/	2(ASP)	OD1	O	3,23
/L/	92(PHE)	O	O	/A/	2(ASP)	CB	C	3,44
/H/	100(TYR)	CE1	C	/A/	2(ASP)	O	O	3,48

/L/	**91(SER)**	**O**	**O**	**/A/**	**3(GLY)**	**N**	**N**	2,88
/L/	27(ASN)d	ND2	N	**/A/**	**3(GLY)**	**O**	**O**	2,96
/L/	**92(PHE)**	**O**	**O**	**/A/**	**3(GLY)**	**N**	**N**	3,22
/L/	32(TYR)	OH	O	/A/	3(GLY)	O	O	3,3
/L/	32(TYR)	CZ	C	/A/	3(GLY)	O	O	3,42
/L/	32(TYR)	CE2	C	/A/	3(GLY)	O	O	3,42
/L/	91(SER)	O	O	/A/	3(GLY)	CA	C	3,49
/L/	**92(PHE)**	**O**	**O**	**/A/**	**4(ASN)**	**N**	**N**	2,81
/L/	27(ARG)f	NH1	N	**/A/**	**4(ASN)**	**O**	**O**	3,06
/L/	92(PHE)	O	O	/A/	4(ASN)	CB	C	3,11
/L/	92(PHE)	CZ	C	/A/	4(ASN)	OD1	O	3,43
/L/	32(TYR)	OH	O	/A/	6(GLU)	OE1	O	2,58*
/L/	30(LYS)	NZ	N	/A/	6(GLU)	OE2	O	2,74*
/L/	27(ARG)f	NH1	N	**/A/**	**6(GLU)**	**O**	**O**	2,77
/L/	27(ASN)d	ND2	N	**/A/**	**6(GLU)**	**O**	**O**	3,04
/L/	30(LYS)	NZ	N	/A/	6(GLU)	OE1	O	3,2
/L/	30(LYS)	CD	C	/A/	6(GLU)	OE1	O	3,35
/L/	30(LYS)	NZ	N	/A/	6(GLU)	CD	C	3,36
/H/	100(TYR)	CE2	C	/A/	6(GLU)	OE1	O	3.4
/H/	98(SER)	CA	C	/A/	6(GLU)	OE2	O	3,42
/H/	100(TYR)	OH	O	/A/	6(GLU)	CB	C	3,44
/L/	32(TYR)	CZ	C	/A/	6(GLU)	OE1	O	3,47
/H/	97(TYR)	OH	O	**/A/**	**7(MET)**	**N**	**N**	2,87
/L/	27(ARG)f	NE	N	**/A/**	**7(MET)**	**O**	**O**	2,95
/H/	97(TYR)	OH	O	/A/	7(MET)	CB	C	3,49
/L/	27(ARG)f	CD	C	/A/	7(MET)	O	O	3,5

*Representa la vinculación de hidrógeno entre dos cadenas laterales.
Las células sombreadas grises representan los contactos de la vinculación de hidrógeno confiables.
Los contactos en negrita son enlaces del hidrógeno formados entre las cadenas laterales y la columna vertebral de la cadena principal.

2. SP34v52 Fab

SP34v52 Fab se disolvió en 0,25 M NaCl, pH de MES 25 mM 5,5 a 10 mg/mL. La proyección de cristalización inicial se realizó con una matriz rala (PEGII, Qiagen) en un formato de difusión de vapor por gota sentada. Se encontró un hit de cristalización en una gota con el depósito que contiene 0,2 M $CaCl_2$; 0,1M HEPES pH 7,5 y 30% w/v PEG 4000. Se desarrollaron cristales optimizados de una mezcla de proteína µL 2 y 2 µL de la solución de depósito que contiene 20-23% w/v PEG 3350; 0,1M, pH HEPES 7,2, 0,1 M de $CaCl_2$. Se utilizó el método de difusión de vapor por gota colgante y la caída final de cristalización se incubó a 18 °C.

Se recolectaron los datos de difracción de SP34v52 Fab en línea de haz de Stanford Synchrotron Light Source 12-2, con un detector de PILATUS. Luego, se integraron las defracciones registradas con un programa XDS y se ampliaron con el uso del programa SCALA. La estructura se escalonó mediante el método de reemplazo molecular (MR) utilizando el programa Phaser. El modelo de búsqueda de MR es una sub-unidad Fab derivada de una estructura cristalina del complejo HGFA/Fab (código PDB: 2R0L). El péptido de complejo CD3ε se desarrolló en la estructura con base en un mapa Fo-Fc. Como consecuencia, la estructura se refinó con los programas REFMAC5 y PHENIX, implementando las funciones objetivo de probabilidad, el método de refinamiento de factor-B individual anisotrópico y el método de refinamiento TLS, para lograr la convergencia. Las estadísticas de datos y el refinamiento se muestran en la tabla 4.

TABLA 4. Recopilación de datos y estadísticas de refinamiento para SP34v52

Grupo de espacio	P622
Células unitarias	a=b=146.3Å, c=80.1Å α=90° β=90° γ=120°
Resolución	50,0 - 2,50 Å
Cantidad total de reflejos	18004 (170)[1]
Integridad (%)	100 (100)
Redundancia	19,3 (19,7)
I/σ	24,0 (3,6)
Rsym[2]	0,127 (0,896)
Rango de resolución	50 - 2,50 Å
Rcryst[3] / Rfree[4]	0,152/0,185
Atomos que no son de hidrógeno	3451
Moléculas de agua	123

Promedio B, General	29,59
Promedio B, Proteína	29,81
Promedio B, Agua	22,47
longitudes de enlace r.m.s.d.	0,007 Å
ángulos r.m.s.d.	1,163°

[1]Los valores entre paréntesis son para la cubierta con resolución más alta, que es 2,51 Å–2,50 Å.

[2]Rsym = $\Sigma|I_{hi} - I_h|/ \Sigma I_{hi,}$ donde I_{hi} es la intensidad aumentada de la observación relacionada con la simetría *i*th del reflejo *h e* I_h es el valor medio.

[3]Rcryst = $\Sigma_h|F_{o,h} - F_{c,h}| / \Sigma_h F_{o,h}$, donde $F_{o,h}$ y $F_{c,h}$ son las amplitudes de factor estructural observadas y calculadas para el reflejo *h*.

[4]El valor de R_{libre} se calcula para las reflexiones de 5% escogidas de forma aleatoria no incluidas en el refinamiento.

En las figuras 14I-14L, las estructuras de cristal de los Fabs hu38E4.v1 y SP34v52 se comparan en la misma orientación. Cuando el péptido CD3ε fue superpuesto en el Fab SP34v52 con la misma orientación que en el hu38E4.v1, se observaron choques evidentes del péptido con SP34v52 (Figura 14L). Los residuos HVR-H2, R50 y R52 de SP34v52, que no estaban presentes en hu38E4.v1 ni en hu40G5c, se hallaron importantes para la unión de CD3 por SP34v52 (Figura 14L). Estos datos demuestran que hu38E4.v1 y hu40G5c se unen con CD3 de una forma distinta que SP34v52.

La estructura de cristal de hu38E4.v1 en el complejo con el péptido N-terminal de CD3Εγ se encuentra ilustrada en las Figuras 14M y 14N. La Figura 14M proporciona una vista ampliada de las interacciones intermoleculares clave involucradas en el contacto del sexto residuo en $CD3_{\varepsilon\gamma}$. Con una vista alejada, la Figura 14N muestra un modelo de llenado de espacio del complejo del péptido Fab/CD3, donde el quinto residuo está apuntando por completo hacia afuera del sitio de interacción. El sexto residuo, como se muestra, está involucrado en las interacciones con Fab y los puntos dentro del sitio activo.

Ejemplo 2. Generación y selección de Anticuerpos biespecíficos dependientes de células T (TBD)

Un método para emplear el alto potencial citotóxico de las células T para erradicar las células tumorales ha sido el uso de los anticuerpos biespecíficos dependientes de linfocitos T (TBD). Se han informado respuestas clínicas alentadoras con moléculas como blinatumomab dirigidas a células B, el anticuerpo BiTE CD19/CD3-biespecífico. Sin embargo, la promesa clínica de muchas modalidades de anticuerpos biespecíficos informadas ha sido limitada por las responsabilidades, que incluyen farmacocinética desfavorable, toxicidad y/o problemas de producción. En consecuencia, inicialmente, hemos generado y caracterizado anticuerpos TBD anti-CD3 con combinaciones variadas de los grupos de antígeno antitumoral y anti-CD3 (p. ej., anti-CD20, anti-FcRH5, anti-HER2, anti-LYPD1, anti-LY6E, anti-LY6G6D, anti-PMEL17, anti-CD19, anti-CD22, anti-CD33, anti-CD79A, anti-CD79B, anti-EDAR, anti-GFRA1, anti-MRP4, anti-RET, anti-Steap1, anti-TenB2), producidos como anticuerpos de cuerpo entero en el formato de botón en el ojal (knob-into-hole). Inesperadamente, observamos que ciertas combinaciones (pares) particulares de grupos de antígeno antitumoral y anti-CD3 resultaron en TDB que presentan una actividad favorable en relación con los otros TDB.

Los anticuerpos TBD se produjeron como anticuerpos de longitud completa en el formato de botón en ojal (knob-into-hole) como IgG1 humana, como se describió previamente (Atwell y otros. *J. Mol. Biol.* 270: 26-35, 1997). La mitad de los anticuerpos se expresaron en *E. coli* o en células de ovarios de hámster chino (CHO), purificados por cromatografía de afinidad de proteínas A, y los pares adecuados de anticuerpos medios se hibridaron *in vitro* como se describió anteriormente (Spiess y otros. *Nat. Biotechnol.* 2013). Si la producción de anticuerpos TDB se llevó a cabo en células CHO, el anticuerpo puede incluir una mutación de glicosilación, por ejemplo, en el residuo N297 (p. ej., N297G), de manera tal que el anticuerpo TDB era una variante sin efector e incapaz de iniciar citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC). La Figura 15 muestra una visión general esquemática de la producción de TDB CD3/CD20.

Luego de la hibridación, los TBD CD3/CD20 se purificaron mediante cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) y se caracterizaron por filtración analítica en gel, espectrometría de masas y electroforesis en gel de poliacrilamida. Los anticuerpos

purificados funcionan como un pico único (>99% de la señal) en la filtración en gel con menos del 0,2% de agregados. No se detectaron homodímeros por medio de la espectometría. Los grupos anti-CD20 analizados en la generación de TDB CD3/CD20 incluyeron 2H7v16, 2H7v114, 2H7v511, y GA101. Los grupos anti-CD3 analizados en la generación de TDB CD3/CD20 incluyeron UCHT1v1, UCHT1v9, UCHT1vM1, 72H6, 13A3, 30A1, 41D9a, SP34v52, 40G5c, 38E4v1-38E4v9, 21B2, 125A1 y 21A9. Los TDB CD3/CD20 se analizaron en relación con la unión con CD3, así como con la actividad, según lo evaluado por los ensayos de destrucción de células B *in vitro* y ensayos de activación de células T.

A. Afinidad de unión

Las afinidades de unión para cada uno de los TDB CD3/CD20 se examinaron por medio de análisis FACS o Biacore, como se describió anteriormente para los anticuerpos anti-CD3. En resumen, para los ensayos de unión de Biacore, se inmobilizó CD3εγ humano en el chip sensor Biacore CM5 Serie S, utilizando el kit de acoplamiento de amino de Biacore y los TDB CD3/CD20 o variantes de Fab presentes estaban en el flujo. Para los ensayos de unión de FACS, se incubaron células Bjab (para antígenos de células B) o células Jurkat (para antígenos CD3) con varias concentraciones de anticuerpos TDB a 4 °C durante 30 minutos. Luego, las células fueron enjuagadas e incubadas con el segundo anticuerpo (anti-huIgG-PE; BD Bioscience) durante otros 15 minutos, antes de ser enjuagadas nuevamente y preparadas para el análisis de FACS. La figura 16 muestra los resultados de ensayos de unión de FACS *in vitro* de los TDB CD3/CD20. Los resultados demuestran que las combinaciones particulares del grupo de anticuerpo anti-CD3 y el grupo del antígeno antitumoral (p. ej., grupo anti-CD20) resultan en anticuerpos TDB con propiedades de unión más favorables. La figura 17 muestra las afinidades de unión monovalentes y bivalentes para estos TDB CD3/CD20 particulares. La combinación particular de 2H7v16 con los grupos anti-CD3 (p.ej., UCHT1v9), por ejemplo, resultó en un TDB CD3/CD20 que mostró una unión sorprendentemente fuerte con las células Bjab y Jurkat en comparación con otros TDB CD3/CD20 analizados con diferentes grupos anti-CD20. La afinidad de unión de otros TDB CD3/CD20 con un grupo anti-CD20 2H7v16 y varios grupos anti-CD3 también fueron analizados (observe las Figuras 18-24).

B. Ensayos in vitro de activación de células T y eliminación de células B.

Los TDB CD3/CD20 generados también se analizaron para determinar su capacidad para soportar la eliminación de células B y la activación del efecto citotóxico de las células T. En estos ensayos, se obtuvieron líneas de células tumorales B (Bjab) a partir de ATCC y se aislaron las PBMC de la sangre completa de los donantes sanos por medio de separación Ficoll. De se necesario, se separaban las células CD8+T y CD4+T con los kits Miltenyi, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células fueron cultivadas en RPMI1640 complementado con 10% FBS (Sigma-Aldrich) a 37 °C en un incubador de cultivos celulares humidificado estándar. Para los ensayos de eliminación de células Bjab,

20.000 células Bjab fueron incubadas con células efectoras ya sea como huPBMCs o células T purificadas, en relaciones indicadas por el ensayo, en presencia de varias concentraciones de anticuerpos TDB durante un período de tiempo indicado por el ensayo. Para los ensayos de eliminación de células B endógenas, se incubaron 200.000 huPBMCs con varias concentraciones de anticuerpos TDB durante la cantidad de horas indicada en el ensayo. Al final de cada ensayo, las células B vivas fueron separadas como células PI-CD19+ o PI-CD20+ B por medio de FACS, se obtuvo un recuento de células absoluto, con perlas FITC agregadas a la mezcla de la reacción como control de recuento interno. El porcentaje de eliminación de células se calculó con base en los controles no tratados con TDB. Las células T activadas fueron detectadas por la expresión de superficie de CD69 y CD25.

Las eficacias variadas de los anticuerpos TDB generados con biespecificidad para CD3 y una segunda molécula biológica (en esta instancia, CD20), enfatizan las contribuciones impredecibles y críticas de ambos grupos de anticuerpos en la generación de un TDB ejemplar de alta eficacia (consulte Figuras 25-49).

Ejemplo 3. Caracterización de TDB CD3/CD20 ejemplares (TDB CD20)

Caracterizamos en más detalle dos de los TDB CD3/CD20 (TDB CD20) ejemplares descritos anteriormente, que mostraron una alta eficacia en los ensayos *in vitro* de eliminación de células B y activación de células T. El grupo CD20 de cada anticuerpo TDB era el clon 2H7.v16 de anti-CD20 (observe la figura 50), mientras que el grupo CD3 era el clon UCHT1v9 (consulte, p-ej, Zhu, et ál *Int. J. Cancer*. <62> 62 319-324, 1995) o el clon 40G5c de macaco de reacción cruzada (consulte, p.ej., Figura 51), que comparte actividades comparables.

Materiales y métodos

A. Producción de anticuerpos

Los anticuerpos biespecíficos dependientes de células T (TDB) se produjeron como anticuerpos de longitud completa en el formato de botón en ojal (knob-into-hole) como IgG1 humana, como se describió previamente (Atwell y otros. *J. Mol. Biol.* 270: 26-35, 1997). La mitad de los anticuerpos se expresaron en *E. coli, y por lo tanto aglicosilados, purificados por cromatografía de afinidad de proteína A, y los pares adecuados de anticuerpos medios se hibridaron* in vitro como se describió anteriormente (Spiess et al. *Nat. Biotechnol.* 2013). Luego de la hibridación, los anticuerpos se purificaron mediante cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) y se caracterizaron por filtración analítica en gel, espectrometría de masas y electroforesis en gel de poliacrilamida. Los anticuerpos purificados funcionan como un único pico (>99% de la señal) en la filtración en gel sin agregados detectados (figura 52A) y no se detectaron homodímeros con la espectrometría de masas (figura 52B).

B. Ensayos in vitro de activación de células T y eliminación de células B.

Se obtienen líneas de células tumorales B a partir de ATCC y se aislaron las PBMC de la sangre completa de los donantes sanos por medio de separación Ficoll. Se separaban las células CD8+T y CD4+T con los kits Miltenyi, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células se cultivaban en RPMI1640 complementado con 10%FBS (Sigma-Aldrich). Para los ensayos de eliminación de células B, las células B vivas fueron separadas como células PI-CD19+ B por medio de FACS, se obtuvo un recuento de células absoluto con perlas FITC agregadas a la mezcla de la reacción como control de recuento interno. Las células T activadas fueron detectadas por la expresión de superficie de CD69 y CD25. La inducción de la granzima B intracelular fue detectada por medio de FACS. La concentración de perforina en el medio se detecta por medio de ELISA (eBioscience). Todos los anticuerpos se adquirieron en BD Bioscience.

C. Estudios de eficacia in vivo en modelos murinos

Los ratones SCID y NSG humanizados fueron adquiridos en Jackson Labs. Los ratones transgénicos con CD20 humano y los ratones transgénicos con CD3 humano fueron producidos como se describe anteriormente (Gong et ál. *J. Immunol.* 174. 817-826, 2005 y de la Here et ál. *J. Exp. Med.* 173: 7-17, 1991), y los ratónes trasgénicos dobles con CD20/CD3 humanos fueron producidos cruzando los dos ratones transgénicos simples. Los modelos de linfoma humano en ratones fueron generados inyectando 5 x 10^6células Bjab-luciferase solas o mezcladas con 10 x 10^6 PBMC de donante humano en HBSS de manera subcutánea en los flancos derechos de 40 ratones hembra. Se trató a los ratones por vía intravenosa con vehículo o TDB CD20 0,5 mg/kg una hora después de la inoculación y una semana después del tratamiento inicial. Los tumores se medían 1-2 veces por semana, y los pesos corporales dos veces por semana después de hasta 7 días a partir del tratamiento final. Si no se observaba pérdida de peso, se dejaba de medir el peso de cierto animal. Si la pérdida de peso era de más del 15% del peso total del cuerpo, los ratones afectados se pesaban a diario, y si excedía el 20%, se sacrificaban (o se dejaban a cargo del personal veterinario). Las observaciones clínicas se realizaron dos veces por semana a lo largo de todo el estudio, para monitorear la salud de los animales, y se sacrificaron todos los animales con tumores de un tamaño o condición que pudiera interferir con la salud o la actividad del mismo. De lo contrario, los animales se sacrificaban 6 meses después del tratamiento inicial o en caso de ulceración del tumor o si el volumen de este excedía 2500 mm^3.

Los modelos de ratones con leucemia linfocítica crónica (CLL) derivada de pacientes se generaron según la descripción anterior (Bagnara et ál. *Blood.* 117 5463-5472, 2011). En resumen, las 5 x 10^5 células T activadas fueron purificadas de PBMC de CLL e inyectadas de manera retro-orbital en los ratones NSG. Después del injerto de la célula T, 2 x 10^7 PBMC CLL se inyectaron de manera retro-orbital. Después de 14 días, la circulación de las células B y T trasplantadas fue confirmada por el análisis FACS. Los animales implantados exitosamente fueron tratados posteriormente, 3,5 semanas después, con

anticuerpos TDB administrados por vía intravenosa, inyectados en la vena de la cola. Los animales fueron sacrificados 6 o 14 días después del tratamiento. Se extrajo la sangre completa por punción del seno retro-orbital utilizando pipetas heparinizadas, y fue trasferida de inmediato a tubos heparinizados, mientras los animales estaban anestesiados, o por punción cardíaca terminal, con una jeringa heparinizada, después de la eutanasia con CO2. Después de la eutanasia con CO2, se recolectaron los bazos. Para todos los estudios, se realizaron observaciones clínicas dos veces por semana para supervisar la salud de los animales. Se medía el peso corporal de los animales al menos una vez por semana. Se aislaron las PBMC después de la lisis celular de glóbulos rojos, y se analizaron por medio de FACS para células B (muCD45+CD19+) y células T (muCD90.2+CD4+, o muCD90.2+CD8+). Todos los anticuerpos utilizados son adquiridos en BD Biosciences o eBiosciences.

D. Estudio PKPD en monos cynomolgus

Todos los estudios en monos cynomolgus se realizaron utilizando monos cynomolgus criados con esa finalidad, no tratados previamente, de origen chino. Para el estudio de PKPD de dosis única, se administró a 3 monos cynomolgus machos una dosis única en bolo lento IV de 1mg/kg de TDB CD20; para la repetición del estudio de dosis, se administró a 4 monos cynomolgus una dosis en bolo lento IV de 1mg/kg de TDB CD20 una vez por semana, por un total de 4 dosis. Se recolectó la sangre completa o los tejidos en los momentos seleccionados para el recuento de células B y células T por medio de FACS. Se recolectó el suero y se almacenó a -70 °C hasta que se analizó por medio de ELISA para determinar la cantidad de artículo de prueba en cada muestra de suero. Se usaron los perfiles de tiempo-concentración sérica de cada animal para estimar los parámetros farmacocinéticos (PK) utilizando el software WinNonlin (Pharsight; Mountain View, CA).

TDB CD20 de alta calidad producido como un IgG de cuerpo completo, humanizado, con propiedad PK de anticuerpo convencional

Para explorar las propiedades objetivo que pueden afectar la potencia de TDB dirigido a células B, que incluyen la identidad del antígeno, tamaño del dominio extracelular y la distancia de epítopo de la membrana, creamos más de 40 TDB dirigidos a epítopes en CD3Ɛ, CD19, CD20, CD22, CD79a y CD79b diferentes. Los resultados representativos se muestran en la Figura 56I. Hallamos que los TDB más potentes fueron aquellos dirigidos a los antígenos para el cáncer con dominios extracelulares pequeños (ECD) y epítopes cercanos a la membrana de la célula objetivo. Entre los mejores objetivos, se encontraron CD20, CD79a y CD79b, con potencias de alrededor de 10 ng/ml o 67 pM para la eliminación de células B de donante normal por parte de las células T autólogas.

TDB anti-CD20/CD3 (CD20-TDB) se describe aquí como una prueba del concepto de molécula, que exhibe la actividad farmacológica de estos TDB dirigidos a células B. Los TDB CD20 fueron producidos como IgG de cuerpo completo, totalmente humanizados,

con arquitectura de anticuerpo natural de bacterias, libres de homodímeros y agregados (Figura 52). La propiedad farmacocinética (PK) de TDB CD20 en ratas, una especie no vinculante, se asemeja a la de otros anticuerpos IgG humanos, con una vida media de cerca de 7 días (Figura 53).

La eliminación de células B con TDB CD20 depende de las células T a lo largo de la vía de granzima-perforina.

Para evaluar TDB CD20 como tratamiento potencial para trastornos proliferativos de células, tales como neoplasias de células CD20 + B, primero investigamos su mecanismo de acción como un anticuerpo biespecífico identificador de células T. A diferencia de la actividad de ADCC, que es el principal mecanismo de acción del tratamiento clásico del anticuerpo monoclonal, TDB CD20 no requiere la región Fc para su actividad. La porción F(ab')2 de TDB CD20 retuvo la misma potencia que el TDB CD20 IgG de cuerpo completo en la eliminación de células B (Figura 54A). TDB CD20 es un agonista condicional, que requiere expresión de objetivo, células T y anticuerpos para la actividad. La actividad de eliminación de células B de TDB CD20 depende de las células T, dado que no se detectó eliminación de células B con PBMC agotadas de células CD3+ T (Figura 54B). Se requiere la expresión del objetivo para la activación de células T, dado que la falta de expresión de CD20 resulta en la ausencia de células T activadas (Figura 54). TDB CD20 es capaz de activar a las células CD4+ y CD8+T, como se mide por la inducción de CD69 y CD25 en las células T (Figura 54D). Se puede lograr una eliminación de células B comparable con células T como efectores, mientras que las células CD8+T parecen más potentes en la eliminación de células BJAB, dado que las células CD8+T resultaron en un mayor rango de eliminación celular que la misma cantidad de células CD4+T (Figura 54C). Sin embargo, la sobreregulación de granzima es más frecuente dentro de las células CD8+T (Figura 54E), así como se detectaron niveles más altos de liberación de perforina y granzimas A y B (no mostradas) asociada con las células CD8+T en el medio, por medio de ELISA (Figura 54F). Las células T activadas son capaces de proliferación (Figura 55). El recuento general de células T, sin embargo, no aumentó de manera significativa después de 24 horas en presencia de TDB CD20 y de células B sin suplemento de citoquinas *in vitro*, probablemente debido a las condiciones del cultivo. De hecho, se observó una expansión robusta de células B *in vivo* en los estudios de eficacia con modelos murinos y en monos cynomolgus (Figuras 58A y 67C).

Potencia de TDB CD20 para la eliminación de las células B de leucemia/linfoma y de las células B autólogas *in vitro*

También se analizó la potencia de TDB CD20 para la eliminación de células B con más de una docena de líneas de células B de leucemia/linfoma *in vitro*. Para evaluar la potencia de CD20-TDB, se seleccionaron 8 líneas que representaran las células con un amplio rango de nivel de expresión de CD20 (Figura 56B). Las curvas de dosis-respuesta de eliminación de células B se muestran con las 8 líneas celulares, con PBMC aisladas, de

donante sano, como células efectoras (figura 56A). Significativamente, CD20-TDB no ha presentado actividad contra las células SU-DHL1, desprovistas de expresión de CD20. La potencia de CD20-TDB se correlacionó con los varios niveles de superficie CD20 detectados mediante la citometría de flujo (56A).. No obstante, TDB CD20 resulta potente en la eliminación de las 8 líneas, de forma dependiente de dosis, con EC50 que oscila entre 0,38 y 11 ng/ml para el ensayo de 24 horas. El alcance de eliminación celular varía entre 60% y 90% con hasta 1000 ng/ml de TDB en un ensayo de 24 horas (Figura 56C). En general, la eliminación completa de células B se logra con una mayor concentración del anticuerpo o un tiempo de ensayo prolongado. Las células SU-DHL-1 se incluyen en el ensayo de eliminación como control negativo de CD20, donde no se observa eliminación celular, lo que demuestra la necesidad de la expresión de objetivo para la actividad de TDB CD20. La actividad de TDB CD20 parece necesitar un nivel muy bajo de expresión de objetivo, como las células Nalm-6 y SC-1 que se muestran aquí tienen muy baja expresión de superficie de CD20 (Figura 56B). La afinidad de unión monovalente de TDB CD20 para CD20 es más débil que la afinidad de unión bivalente del anti-CD20 parental, con un K_D de 54 nM, determinado por Scatchard. Tomados en conjunto, el valor KD y la potencia de eliminación de células B de TDB CD20, la ocupación de receptores necesaria para la actividad de TDB CD20 es solamente menor que 0,1%. Los TDB generados para atacar diferentes antígenos de células B, también son efectivos en la mediación de la eliminación de células B, como se muestra en la figura 56D, donde los TDB dirigidos a 5 antígenos de células B diferentes, entra ellos, un TDB CD20 (TDB A: 2H7v16/UCHT1v9), eliminaron el 75% a 90% de las células B. El TDB CD20 también puede mediar en la eliminación de líneas de linfoma B adicionales con expresión del antígeno de superficie CD20 variable (figura 56E).

El TDB CD20 también resulta muy potente en la eliminación de células B autógenas, comprobado con PBMC humanas aisladas de la sangre periférica, de donantes sanos (figura 56F). En la figura 56F se muestran las curvas de dosis-respuesta de eliminación para 8 donantes aleatorios, así como un resumen de EC50 y el alcance de eliminación de células B (figura 56G) con 1000 ng/ml de anticuerpo en un ensayo de 24 horas, en 30 donantes. De las 30 muestras analizadas, del 57% al 96% de las células B fueron eliminadas con hasta 1000 ng/ml de anticuerpo en el plazo de 24 horas, con EC50 oscilando entre 0,43 y 135 ng/ml, con un valor promedio de menos de 3 ng/ml. El grado de eliminación de células B en el plazo de 24 horas por TDB CD20 es altamente comparable, o aún mayor, que la eliminación de células B por un scFv anti-CD3/anti-CD19 (Figura 56H).

El TDB CD20 resulta potente en provocar el agotamiento de células B *in vivo* en los modelos murinos.

Dado que nuestro TDB CD20 analizado no reconoce los antígenos murinos CD20 y CD3, utilizamos los ratones transgénicos con CD20 humano y CD3 humano (descritos anteriormente) para producir ratones transgénicos dobles con CD3/CD20 humanos para

estudios de eficacia *in vivo* subsiguientes. Como se muestra en la Figura 57A, los ratones transgénicos dobles con CD3/CD20 humanos expresan huCD3$_\varepsilon$ en la superficie de las células CD4+ y CD8+ T, además de huCD20 en la superficie de las células CD19+ B, en niveles detectables, en comparación con las células B y T derivadas humanas. Con ratones transgénicos con CD20 humano, solamente rituximab es capaz provocar el agotamiento de las células B, dado que TDB CD20 no puede captar células T murinas sin expresión de CD3 humano (figura 57B). Mientras que con los ratones transgénicos dobles con CD3/CD20 humanos, TDB CD20 es capaz de captar células T murinas que expresan huCD3 y además resulta potente para provocar el agotamiento de células B murinas que expresan huCD20 (figura 57C). El TDB CD20 parece ser más potente para provocar el agotamiento de las células B *in vivo*, dado que se detectan menos células B en los bazos de ratón 7 días después de una dosis única IV de TDB CD20 de 0,5 mg/kg que después de la administración de una dosis única de rituximab de 10 mg/kg. Aquí se usó como un control del isotipo un TDB HER2, que tiene el mismo grupo de CD3 mientras que con el otro grupo se une a HER2, y no mostró actividad alguna en la disminución celular.

Para explorar la menor dosis eficaz con la cual el TDB CD20 puede agotar las células B en ratones transgénicos dobles con CD3/CD20 de origen humano, los ratones fueron tratados con una dosis única de TDB CD20 que comenzó en 0,5 mg/kg y terminó en 0,00005 mg/kg. Luego, se monitoreó el recuento de células B en la sangre en el D1 (24 horas después de la dosis), el D8 y el D15. Se observó una disminución en el recuento de células B en el D1, y el agotamiento de las células B continuó hasta el D15 luego del tratamiento con TDB CD20 (Figura 58A). De manera coherente con esta observación en el recuento de células B en la sangre, se logró el agotamiento casi completo de las células B en el bazo de ratones en el D7 tras una dosis única de 0,5 mg/kg, mientras que una dosis más baja de 0,05 mg/kg provocó el agotamiento parcial de las células B en el bazo y un nivel aproximado de dosis de ED50 (Figura 58B). Un estudio de evolución temporal realizado con los ratones transgénicos dobles reveló que el agotamiento de las células B es casi completo en el bazo tan solo 3 días después del tratamiento de dosis única de 0,5 mg/kg, sin signos de recuperación significativa de las células B hasta el D14 (Figura 58A). Como se ve en la Figura 58C, el TDB CD20 media el agotamiento de las células B en la periferia de los huCD20/huCD3 transgénicos dobles, lo cual se detecta en la sangre tan solo dos horas después del tratamiento y se mantiene durante hasta siete días después del tratamiento. Además, las células T CD8+ y CD4+ activadas son detectables en la sangre en el plazo de dos horas desde la administración del TDB CD20 y disminuyen dos días después del tratamiento (Figura 58D).

Además, el TDB CD20 agotó las células B de la zona marginal (MZB, por sus siglas en inglés) (Figura 59A y Figura 59B) tan eficientemente como las células B foliculares (FOB, por sus siglas en inglés) (Figura 59A y Figura 59C) en el bazo de ratones, luego de una sola dosis IV de 0,5 mg/kg. Observamos que las células B del bazo disminuyeron ~ 50% con respecto al valor basal hasta el día 1 (24 horas después de la dosis) y continuaron

disminuyendo hasta alcanzar el punto más bajo en el día 3, que se mantuvo durante todo el estudio. Aparentemente, esto difiere de un informe previo con rituximab, donde se piensa que el microambiente cumple una función en la eficacia de rituximab, lo cual sugiere un modo de acción para el TDB CD20 *in vivo* diferente al de rituximab. La activación de las células T murinas suele observarse a los 30 minutos de la administración del tratamiento de TDB CD20 en la sangre, y en el plazo de las primeras 24 horas en el bazo en la mayoría de los casos (Figuras 59D y 59E). Luego de la activación de las células T, se observó un incremento del recuento de las células T en los D2 a D3 aproximadamente (Figura 59D y 59E), como resultado de la proliferación celular. Para el día 2, la mayoría de las células T ya no eran positivas para CD69, aunque los niveles de células CD69+CD8+ siguieron oscilando entre el 10% y el 30% durante el resto del estudio de dos semanas. No obstante, posiblemente debido a la muerte celular inducida por la activación, los recuentos de las células T tienden a disminuir tras la fase de expansión. El recuento de células T finalmente se recuperará luego del tratamiento con TDB, lo cual sugiere que el tratamiento con TDB CD20 no tiene un efecto inhibitorio de la regeneración de las células T murinas.

También se usaron ratones NSG humanizados para continuar con la validación de la potencia del TDB CD20 para el agotamiento de las células B en modelos murinos y en el marco de una dosis repetida. Los ratones reales inscriptos en el estudio que se muestran en las Figuras 60A-60D tenían 35-80% de células CD45+ humanas en la sangre periférica, y los rangos de las células CD4+, CD8+ y CD20+ fueron 12-25, 2,1-8,7 y 32-60% respectivamente (porcentaje informado como fuera de una ventana viable de leucocitos). En la Figura 60E, se muestran ejemplos representativos de este valor inicial. Los niveles de los antígenos objetivo CD3 y CD20 de estos ratones se compararon con los de donantes humanos normales y no se halló que fueran significativamente diferentes (Figura 60F). Los ratones NSG humanizados que se muestran en la Figura 59 fueron tratados con 3 dosis semanales de TDB CD20 de 0,5 mg/kg. Las células B se agotaron en la sangre en el D7, y no se detectó casi ninguna célula B en el D21 (Figura 60A). También se observó un agotamiento sólido de las células B en el bazo de los ratones tratados con TDB en el D21 (Figura 60B). Además, el tratamiento de los ratones NSG humanizados con TDB CD20 estimuló la proliferación de las células T y condujo al agotamiento de las células B, como se muestra en la Figura 60C. El recuento de las células T CD8+ se incrementó hasta 10 veces en la sangre en el D7 y retornó al valor basal o a un valor inferior en el D14 y en el D21 (Figura 60D). Se observó una tendencia similar en las células T CD4+.

CD20 TDB es potente para eliminar las células B de la CLL *in vitro* e *in vivo*

También realizamos pruebas para determinar la potencia del TDB CD20 para eliminar las células B de la leucemia con células T autólogas de pacientes con CLL, donde la carga tumoral B suele ser alta mientras que el recuento de células T es bajo y la función de las células T podría estar potencialmente deprimida (Riches et al. *Semin. Cancer Biol.* 20(6):

431-438, 2010). Las PBMC aisladas de la sangre periférica de nueve pacientes con CLL fueron incubadas con una sola dosis elevada de 1000 ng/mL de TDB CD20 durante hasta 48 horas. Como se muestra en la Figura 61A, TDB CD20 es potente en la eliminación de las células B de la CLL con células T autólogas. Para las 2 muestras que se ven, la carga tumoral de la leucemia de células B es del 70% con el 8,4% de las células T CD8+ en las PBMC para la muestra de paciente n.º 1, y del 80% con el 4,4% de las células T CD8+ para la muestra de paciente n.º 2. TDB CD20 aparentemente puede lograr una eliminación eficiente de células B con relaciones efector/objetivo muy bajas (1:8 y 1:18 con las 2 muestras que se ven aquí). La eliminación de las células B de la CLL con células T autólogas que produce TDB CD20 tiene una alta correlación con el recuento de células T CD8+ (Figura 61B). Descubrimos que el contenido de las células T variaba de manera significativa (entre el 0,4% y el 8% de las células mononucleares), y cabe destacar que observamos que el alcance de la citólisis de las células B en comparación con los valores previos al tratamiento se correlacionaba en gran medida con el contenido de las células T. Al suplementar con las células T CD8+ purificadas a las PBMC de la CLL, donde hay muy pocas células T análogas disponibles, las células B de la leucemia fueron eliminadas eficientemente por TDB CD20 de una forma dependiente de las células T (Figura 61C).

TDB CD20 también es potente para provocar el agotamiento de las células de leucemia CLL injertadas en ratones (Figura 62A). En resumen, se injertaron células de leucemia de pacientes a los ratones NSG luego de injertar células T autólogas activas obtenidas de los pacientes y el tratamiento se inició luego de confirmar que el injerto de leucemia se había establecido. La tinción de IHC de ejemplos representativos de bazos de ratones mostró el injerto exitoso de las células B de leucemia y de células T autólogas de pacientes con CLL en ratones NSG. Luego de una dosis única de 0,1 o 0,5 mg/kg del tratamiento con TDB CD20, se pudieron detectar pocas células B. El agotamiento de las células B también se observó con el tratamiento de rituximab, mientras que no se detectó agotamiento alguno de las células B con el TDB HER2 como control del isotipo. (Figura 62B).

En el contexto de la progresión del tumor, el tratamiento con TDB CD20 es efectivo para prevenir el crecimiento de tumores tipo linfoma de células B en presencia de un donante humano de PBMC. Los ratones SCID (inmunodeficiencia severa combinada) con trasplantes de células Bjab humanas desarrollaron tumores detectables cuando fueron tratados con el vehículo o con TDB CD20 solo para el día 12 luego de la inoculación. Además, el trasplante solo de las PBMC demoró la excrecencia de tumores, aunque estos ratones desarrollaron tumores detectables para el día 25 luego de la inoculación. Por lo tanto, TDB CD20 también es efectivo para prevenir el crecimiento de tumores *in vivo* en presencia de células efectoras PBMC (Figura 63).

La potencia de TDB CD20 requiere un muy bajo nivel de expresión de CD20.

Además del requisito diferente para la región de anticuerpo Fc para la actividad de TDB CD20 comparada con un anti-CD20 convencional, y de la posible dependencia del

microambiente del tumor, TDB CD20 también parece requerir un menor nivel de antígeno para la eliminación eficiente de las células B. Para las células Bjab, que tienen un alto nivel de expresión de CD20 (Figura 64A), se logró una eliminación de células comparable con rituximab y TDB CD20 (Figura 64B). Sin embargo, las células Nalm-6, SC-1 y OCI-Ly19, que tienen un nivel de expresión de CD20 mucho más reducido (Figura 64A) solamente fueron eliminadas con TDB CD20 mientras que no se detectó eliminación de estas células con rituximab (Figura 64C). El número estimado de copias de CD20 para estas líneas celulares bajas de CD20 es menor que 500, en base a los datos de scatchard y de la unión de FACS en comparación con las células BJAB (no se muestran los datos). Además, la afinidad de unión monovalente de TDB CD20 para CD20 es ~50-100 nM, significativamente menor que la afinidad de 1-5 nM de rituximab (ambas medidas con scatchard). En conjunto, la potencia de CD20-TDB es coherente con la noción de que la activación de TCR solamente requiere una ocupación de receptores baja de 10-100 moléculas (Purbhoo, M.A., et al. *Nat Immunol* 5:524-530, 2004; Irvine, D.J.,et al. *Nature* 419:845-849, 2002; Sykulev, Y., et al. *Immunity* 4:565-571, 1996).

TDB CD20 es activo en presencia de rituximab y esteroides

Como rituximab y su combinación con la quimioterapia se utilizan ampliamente para tratar neoplasias de células B en la práctica clínica, es importante explorar cómo se puede utilizar TDB CD20 en este contexto, dado que tanto TDB CD20 como rituximab se enfocan en el mismo antígeno. Aprovechamos al rituximab-DANA, una variante no efectora de rituximab (rituximab con sustituciones de los residuos 265 y 297 a la alanina (mutaciones DANA descritas en las patentes de EE. UU. n.º 7,332,581 y 8,219,149)), la cual solamente se une a CD20 sin actividad de eliminación de células B, según las pruebas realizadas en ratones transgénicos dobles con CD20/CD3 humanos (Figura 64D). El tratamiento previo de células B objetivo de donantes normales con esta molécula inerte de rituximab que compite con la unión de TDB CD20 tuvo un efecto extraordinariamente mínimo en la reducción de la actividad de TDB CD20. En concentraciones de hasta 250 µg/ml rituximab-DANA (5000 veces en exceso sobre el nivel del dosis EC50 de 42 ng/ml), observamos solamente pequeños cambios en las curvas de respuesta a la dosis *in vitro* (un cambio menor a 7 veces en la EC50, 42 en comparación con 320 ng/ml). Cabe destacar que TDB CD20 sigue siendo activo en este marco. Aunque la EC50 para TDB CD20 se incrementó hasta ~7 veces con la concentración más elevada de rituximab-DANA, el grado de eliminación de células B no cambió significativamente (Figura 65A). Esto es coherente con nuestros hallazgos previos, según los cuales, para la potencia de TDB CD20, se requiere un nivel muy bajo de expresión del antígeno, o una ocupación muy baja de receptores. Las observaciones *in vitro* se recapitularon *in vivo* en ratones transgénicos duales CD3/CD20 que fueron tratados previamente con 2 o 10 mg/kg de la proteína rituximab-DANA y posteriormente recibieron TDB CD20. Aquí, mostramos *in vivo* que TDB CD20 sigue provocando el agotamiento de células B en ratones tratados previamente con rituximab-DANA (Figura

66). Estos resultados indican una gran versatilidad en las combinaciones prospectivas de tratamientos para neoplasias de células B.

TDB CD20 es un anticuerpo que recluta células T, y su potencia depende de la activación de las células T. También se realizaron exploraciones para ver si el tratamiento previo con esteroides, que potencialmente podría tener un impacto en la respuesta inmune de las células T, afectaría la actividad de TDB CD20. *In vitro,* TDB CD20 seguía eliminando las células B en presencia de una alta concentración de dexametasona (Figura 65B).

Validación preclínica de TDB CD20 como tratamiento potencial para neoplasias de células B CD20+ en monos cynomolgus

También se realizó un estudio piloto PKPD para TDB CD20 en monos cynomolgus. En un estudio de dosis única, en el cual 3 animales fueron tratados una vez de forma intravenosa con 1mg/kg de TDB CD20, se observó el agotamiento completo de las células B en la sangre (Figura 67A), así como también en el bazo y en los nódulos linfáticos (Figuras 67B y 67C), 7 días después del tratamiento con el anticuerpo. Los controles históricos del vehículo se muestran como la media y la desviación estándar de 4 animales tratados con vehículo (Figura 67D). No se observó una pérdida de células aparente, ya que tanto las células T CD8+ como las células T CD4+ tenían niveles comparables o más elevados que los de los controles, cuando se calcularon como % de linfocitos. Se detectó la activación de las células T en la sangre 4 horas después de la administración de la dosis. No se detectó pérdida de células T, y se detectó un recuento de células T CD8+ aparentemente más elevado en la sangre 7 días después del tratamiento (Figura 67A).

El efecto a largo plazo del tratamiento con TDB CD20 en células inmunes también se examinó en un estudio de dosis repetida de 4 semanas seguido de un período de recuperación de 8 semanas. En la sangre de 4 animales tratados con una dosis semanal de 1mg/kg, los recuentos delas células B y T, así como también la concentración sérica de TDB CD20, se midieron y se graficaron para cada animal individual durante 77 días (Figura 68A). En los 4 animales, las células B no se detectaron en la sangre poco tiempo después del tratamiento y no regresaron mientras la concentración sérica de TDB CD20 permaneció por encima de 100 ng/ml (animal 4502 en comparación con los animales 4001, 4002 y 4503). Los recuentos de células T CD8+, así como también los de las células T CD4+ en menor medida, se incrementaron significativamente luego de la primera dosis y retornaron gradualmente al 25-150% de los valores basales. Si se consideran juntas, TDB CD20 es altamente activo en producir el agotamiento de las células B, sin comprometer a las células T.

La propiedad PK de TDB CD20 también se resumió en la Figura 68B, con las mediciones de la concentración sérica de TDB CD20 de ambos estudios. Como se mostró para el estudio de dosis repetidas, TDB CD20 mantuvo una buena exposición durante todo el estudio, con una eliminación de aproximadamente 17 ml/día/kg durante la primera dosis (D0-D7). La eliminación mediada por el objetivo parece ser más elevada durante la primera dosis (D0-D7), ya que el valor de eliminación disminuyó hasta

aproximadamente 6 ml/día/kg durante la cuarta dosis (D21-28).

Combinación de TDB CD20 con un antagonista de PD-L1 es un modelo tumoral singeneico

También se examinó la eficacia in vivo de un TDB CD20 en combinación con un antagonista de PD-L1 (un anticuerpo anti-PD-L1 isotipo IgG2a murino, 25A1, con mutaciones DANA) en un modelo tumoral singeneico. En este estudio, se utilizaron células de linfoma B A20-huCD20 de ratones que expresan el CD20 humano y un PD-L1 de ratón sobre su superficie celular para generar un modelo tumoral singeneico (consulte, p.ej., la Figura 69A). El TDB CD20 utilizado fue un isotipo IgG2a murino 2H7v16/2C11 TDB producido en formato "botón en ojal" (K&H, consulte, p.ej., Atwell et al., *J Mol Biol.*, 270:26-35, 1997), donde el grupo "botón" es anti-CD20 2H7v16 y el grupo "ojal" es anti-CD3 2C11 (Leo et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 84:1374-8, 1987). El antagonista de PD-L1 utilizado fue un isotipo IgG2a murino anti-PD-L1 con mutaciones Fc DANA (sustitución de los residuos 265 y 297 a la alanina; consulte, p.ej., las patentes de EE. UU. n.º 7,332,581 y 8,219,149).

En el Día -7, 65 ratones Balb/C fueron inoculados simultáneamente en el área torácica unilateral derecha con 2,5 millones de células A20pRK-CD20-GFP en HBSS en un volumen de 100 µl (que no debía exceder los 200 µl). Se permitió que los ratones desarrollaran tumores. Luego, los ratones fueron pesados y medidos de 1 a 2 veces por semana hasta que los tumores alcanzaron un volumen medio tumoral de aproximadamente 100 a 200 mm^3 (aproximadamente 7 días después de la inoculación). Los animales luego fueron divididos en los siguientes grupos de tratamiento: Grupo 1: 2,5 millones de A20/CD20, Vehículo, qwx3, IV, n=9; Grupo 2: 2,5 millones de A20/CD20, anti-CD20xCD3 K&H TDB (2H7v16-2C11 IgG2 murino), 0,5 mg/kg, qwx3, IV, n=9; Grupo 3: 2,5 millones de A20/CD20, aPDL1 (25A1, mIgG2a DANA), 10 mg/kg, tiwx3, IP, n=9; y Grupo 4: 2,5 millones de A20/CD20, aPDL1 (25A1, mIgG2a DANA), 10 mg/kg, tiwx3, IP + anti-CD20xCD3 K&H TDB (2H7-2C11 IgG2 murino), 0,5 mg/kg, qwx3, IV, n=9. A los ratones que no se reunieron en uno de los grupos de tratamientos mencionados debido a tumores disimilares, se les practicó la eutanasia. El tratamiento comenzó el Día 0, y todas las dosis de anticuerpos se administraron por vía intravenosa en un volumen de 100 ml como se describió más anteriormente.

Los tumores se midieron de 1 a 2 veces por semana. El peso corporal de los animales se midió dos veces por semanas hasta 7 días después del tratamiento final. Si no se observaba pérdida de peso, se dejaba de medir el peso. Si se observaba que la pérdida de peso era >15%, los ratones afectados se pesaban diariamente y se les practicaba la eutanasia si la pérdida de peso era mayor o igual al 20%. Durante todo el estudio, las observaciones clínicas se realizaron dos veces por semana para monitorear la salud de los animales, y se le practicó la eutanasia a todo animal que tuviera un tumor de un tamaño o condición que pudiera interferir con su salud o actividad.

Como se muestra en la Figura 69B, el tratamiento combinado de TDB CD20 con el

anticuerpo anti-PD-L1 (Grupo 4) exhibió un efecto sinérgico inesperado en la inhibición del crecimiento tumoral cuando se comparó con el tratamiento con TDB CD20, anticuerpo anti-PD-L1 o vehículo solos.

Combinación de TDB CD20 con un antagonista de PD-1 es un modelo tumoral singeneico

Adicionalmente, se probó también la eficacia *in vivo* de un CD20 TDB en combinación con un antagonista de PD-1 (un anticuerpo anti-PD1 con isotipo IgG2 murino, 8F11, con mutaciones DANA) en el modelo sinérgico de ratón B con linfoma A20/huCD20. En este estudio, el CD20 TDB usado fue un isotipo isotype 2H7v16/2C11 TDB IgG2a murino y el antagonista PD-1 usado fue un anticuerpo anti-PD-1 con isotipo IgG2 con mutaciones DANA Fc.

Se transfectaron células B de los ratones A20 para expresar CD20 y GFP humano y posteriormente se clasificó una única célula para determinar la selección clonal y la expansión para la implementación. Ratones Balb/c hembra (Charles River; Hollister, CA) de 8-10 semanas fueron inoculados subcuténeamente en la región torácica unilateral derecha con 2,5 millones de células A20.hCD20-GFPCuando los tumores alcanzaron un volumen medio de 100-200 mm^3, los ratones se seleccionaron y colocaron aleatoriamente en los siguientes cuatro grupos de tratamiento n=9 ratones/grupo) y el tratamiento con anticuerpo comenzó al día siguiente 1: Grupo 1 2,5 millones A20/CD20, vehículo, qwx3, IV); Grupo 2 (2,5 millones A20/CD20, anti-CD20xCD3 K&H TDB (2H7v16-2C11 IgG2 murino), 0,5 mg/kg, qwx3, IV); Grupo 3 (2,5 millones A20/CD20, anti-PD1 (8F11, mIgG2a DANA), 10 mg/kg, tiwx3, IP) y Grupo 4 (2,5 millones A20/CD20, anti-PD1 (8F11, mIgG2a DANA), 10 mg/kg, tiwx3, IP + anti-CD20xCD3 K&H TDB (2H7v16-2C11 IgG2 murino), 0,5 mg/kg, qwx3, IV).

Los ratones se trataron con vehículo o CD20 TDB a 0,5mg/kg semanalmente IV durante 3 semanas, y/o anticuerpo anti-PD-1 a 10mg/kg IV para la primera dosis, seguido de dosificación IP 3 veces por semana durante 3 semanas. (N=9 ratones/grupo)

Como se muestra en las Figuras 108A y 108B, el tratamiento combinado de CD20 TDB con anticuerpo anti-PD-1 (Grupo 4) mostró un efecto inesperado y sinergístico al mostrar el crecimiento del tumor al compararlo con el tratamiento con el anticuerpo CD20 TDB, anti-PD-1 o con vehículo solamente.

Ejemplo 4. Generación y caracterización de los TDB CD3/FcRH5 ejemplares. (TDB FcRH5)

Además, exploramos la capacidad de anticuerpos de TDB para reclutar las actividades citotóxicas de las células T de extirpación de las células tumorales mediante el reconocimiento de un antígeno de superficie celular diferente, FcRH5. Para ello, generamos y caracterizamos anticuerpos anti CD3 que tienen un brazo anti-CD3 y un brazo anti-FcRH5 (TDB de FcRH5). Como se describió anteriormente, los TBD FcRH5 se

produjeron como anticuerpos de longitud completa en el formato de botón en ojal (knob-into-hole) como IgG1 humana, como se describió previamente (Atwell et al. *J. Mol. Biol.* 270: 26-35, 1997). La mitad de los anticuerpos se expresaron en *E. coli*, purificados por cromatografía de afinidad de proteínas A, y los pares adecuados de anticuerpos medios se hibridaron *in vitro* como se describió anteriormente (Spiess et al. *Nat. Biotechnol.* 2013). Luego de la hibridación, los TBD FcRH5 se purificaron mediante cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC, por sus siglas en inglés) y se caracterizaron por filtración analítica en gel, espectrometría de masas y electroforesis en gel de poliacrilamida, como se describió anteriormente. Un grupo anti-FcRH5 utilizado en la generación de los TDB FcRH5 fue el del anticuerpo anti-FcRH5 1G7, que comprende: (a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos con n.° de ID de SEC.: 268 y (b) un dominio de VL que comprende una secuencia de aminoácidos con n.º de ID de SEC.: 269. Los grupos anti-CD3 examinados en la generación de los TDB FcRH5 incluían a UCHT1v9, 40G5c, 38E4v1 y 38E4v1.

Los TDB FcRH5 específicos se examinaron para detectar la unión de células T CD8+ (unión CD3), así como también la actividad, según lo evaluado por ensayos de citotoxicidad *in vitro* y ensayos de activación de células T.

A. Afinidad de unión

Las afinidades de unión para cada uno de los TDB FcRH5 se examinaron mediante análisis FACS, como se describió anteriormente para los TDB CD20. Brevemente, para ensayos de unión FACS, se incubaron células T CD8+ con distintas concentraciones de anticuerpos de TDB FcRH5 a 4 °C durante 30 minutos, luego las células se lavaron e incubaron con el segundo anticuerpo (anti-huIgG-PE, BD Bioscience) durante otros 15 minutos, antes de que las células fueran lavadas nuevamente y estuvieran listas para el análisis FACS. La figura 70 muestra los resultados de ensayos de unión de FACS *in vitro* de los TDB FcRH5. Los resultados demuestran que la combinación particular del grupo del anticuerpo anti-CD3, 38E4v1, emparejado con el grupo del anti-FcRH5, 1G7, da como resultado un anticuerpo FcRH5 con una afinidad de unión mayor con las células efectoras.

B. Ensayos in vitro de activación de células T y eliminación de células diana MOLP-2

Los TDB FcRH5 también se examinaron para determinar su capacidad para respaldar la eliminación de las células diana MOLP-2 que expresan FcRH5 y la activación del efecto citotóxico de las células T. *La citotoxicidad* in vitro se monitoreó mediante citometría de flujo. Las células diana se marcaron con CFSE de acuerdo con el protocolo del fabricante (Invitrogen, n.º C34554). Las células diana marcadas con el éster de succinimidilo de carboxifluorescenía (CFSE) y las células T CD8+ purificadas de PBMC humanas se mezclaron en una relación 3:1, con o sin TDB durante 48 horas. Las células se resuspendieron en un volumen igual de PBS + 2% FBS + 1 mM EDTA + yoduro de propidio (PI). El análisis de citometría de flujo se realizó en un FACSCalibur en formato

de automatización. El número de células diana vivas se contó mediante la apertura o cierre de las células negativas CFSE+/PI. El porcentaje de citotoxicidad se calculó de la siguiente manera: % de citotoxicidad (número de células diana vivas sin TDB, número de células diana vivas con TDB) / (número de células diana vivas sin TDB) x 100. Como se representa en las Figuras 71A y 71B, los TDB FcRH5 con UCHT1v9 o 38E4v1 para su grupo anti-CD3 mostraron una eliminación de células diana MOLP-2 sólida *in vitro* en comparación con el TDB FcRH5 que tiene 40G5c como su grupo anti-CD3.

Al realizar las pruebas para los ensayos de activación de las células T, las Figuras 72A a 72D, muestran que los TDB FcRH5 con UCHT1v9 o 38E4v1 para su grupo anti-CD3 eran capaces de inducir fuertemente la actividad de las células T *in vitro*, en comparación con el TDB FcRH5 que tiene 40G5c como su brazo anti-CD3. En estos ensayos, las células diana y las células T CD8+ purificadas se mezclaron en presencia o ausencia de TDB y se analizó la activación de las células T mediante la citometría de flujo. Al final de la incubación, las células se tiñeron con CD8-FITC (BD Bioscience, 555634) CD69-PE (BD Bioscience, 555531) y CD107a-Alexa-Fluor647 (eBioscience, 51-1079). Opcionalmente, después de que la superficie se tiñó con CD8-FITC y CD69-PE, las células se fijaron y se permeabilizaron con una solución de Cytofix/Cytoperm (BD Bioscience, 554722) y se tiñeron de forma intracelular con anti-granzima B-Alexa-Fluor647 (BD Bioscience, 560212). La activación de las células T se evaluó a través del porcentaje de células CD8+CD69+, CD8+CD107a+ y CD8+CD69+GranzymaB+.

Ejemplo 5. Generación y caracterización de los TDB CD3/HER2 ejemplares. (TDB HER2)

Además, exploramos la capacidad de anticuerpos de TDB para reclutar las actividades citotóxicas de las células T de extirpación de las células tumorales mediante el reconocimiento de un antígeno de superficie celular diferente, HER2. Para ello, generamos y caracterizamos anticuerpos anti CD3 que tienen un brazo anti-CD3 y un brazo anti-HER2 (TDB HER2). Como se describió anteriormente, los TDB HER2 se produjeron como anticuerpos de longitud completa en el formato de botón en ojal como IgG1 humana, como se describió previamente (Atwell et al. *J. Mol. Biol.* 270: 26-35, 1997). La mitad de los anticuerpos se expresaron en *E. coli* o en células de ovarios de hámster chino (CHO), purificados por cromatografía de afinidad de proteínas A, y los pares adecuados de anticuerpos medios se hibridaron *in vitro* como se describió anteriormente (Spiess et al. *Nat. Biotechnol.* 2013). Si la producción de anticuerpos TDB se llevó a cabo en células CHO, el anticuerpo incluyó una mutación de glicosilación, por ejemplo, en el residuo N297 (p. ej., N297G), de manera tal que el anticuerpo TDB era una variante sin efector e incapaz de iniciar citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés). Luego de la hibridación, los TBD HER2 se purificaron mediante cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC, por sus siglas en inglés) y se caracterizaron por filtración analítica en gel, espectrometría de masas y electroforesis en gel de poliacrilamida, como se describió anteriormente. Un grupo anti-

HER2 utilizado en la generación de los TDB HER2 fue el del anticuerpo anti-HER2 hu4D5, que comprende: (a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 270 y (b) un dominio de VL que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 271. Los TDB HER2 adicionales se generaron para dirigirse a diferentes regiones del dominio extracelular (ECD, por sus siglas en inglés) de HER2. Un anticuerpo anti-HER2, 2C4, se utilizó como un grupo anti-Her2 que consta de: (a) un dominio de VH que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 593 y (b) un dominio de VL que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 594. Otro anticuerpo anti-HER2 utilizado como un grupo anti-HER2 fue el del anticuerpo anti-HER2, 7C2, que consta de: (a) un dominio de VH que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 595 y (b) un dominio de VL que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 596. Otros grupos anti-HER2 utilizados en la generación de los TDB HER2 incluyeron variantes de afinidad hu4D5, hu4D5.91A y hu4D5.Y100A (descrito en US 7,435,797).

Los TDB HER2 específicos se examinaron para la unión de células T CD8+ (unión CD3) y células SKBR3 (unión Her2), así como para la actividad, según lo evaluado por ensayos de toxicidad *in vitro* y ensayos de activación de células T.

A. Afinidad de unión

Las afinidades de unión para cada uno de los TDB HER2 se examinaron mediante análisis FACS, como se describe anteriormente para los TDB CD20. Brevemente, para ensayos de unión FACS, se incubaron células Jurkat (para el antígeno CD3), células CD8+ humanas (para el antígeno CD3) o SKBR3 (para el antígeno Her2) con distintas concentraciones de anticuerpos de TDB HER2 a 4 °C durante 30 minutos, luego las células se lavaron e incubaron con el segundo anticuerpo (anti-huIgG-PE, BD Bioscience; o anti-huIgG-AlexaFluor647, Southern Biotech) durante otros 15 minutos, antes de que las células se lavaran nuevamnte y estuvieran listas para el análisis FACS. La media geométrica de fluorescencia se leyó mediante citometría de flujo. Las Figuras 73, 76A, 78A-78C, 79A y 80A-80B muestran los resultados de los ensayos de unión FACS *in vitro* de los TDB HER2.

Los múltiples grupos HER2 que se unen a diferentes regiones de HER2 se examinaron en combinación con múltiples grupos CD3 que se unen a distintas regiones de CD3ε para caracterizar las propiedades de unión de cada combinación. La Figura 76A proporciona la estructura cristalina del ECD HER2 y la del $CD3_{\varepsilon}$ y resalta las regiones a las que se unen los diferentes grupos HER2 y CD3. El anticuerpo HER2 hu4D5 se conoce como trastuzumab y se une a un epítopo en el dominio IV de HER2 que es la región proteica que está más cerca de la membrana celular. El anticuerpo monoclonal recombinante humanizado 2C4 (rhuMAb 2C4) también se conoce como pertuzumab, que se une a un epítopo en el dominio II de HER2 que está a 50 angstromios del lugar donde se une hu4D5. Pertuzumab (PERJETA®, Genentech, Inc, South San Francisco) representa el primero de una nueva clase de agentes conocidos como inhibidores de la dimerización de HER (HDI, por sus siglas en inglés) y de funciones para inhibir la capacidad de HER2

de formar heterodímeros u homodímeros activos con otros receptores HER (tales como EGFR/HER1, HER2, HER3 y HER4) (Harari and Yarden. *Oncogene* 19:6102-6114, 2000; Yarden and Sliwkowski. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2:127-137, 2001; Sliwkowski. *Nat. Struct. Biol.*

10:158-159, 2003; Cho et al. *Nature* 421:756-60, 2003; and Malik et al. *Pro. Am. Soc. Cancer Res.* 44:176-177, 2003). El anticuerpo murino anti-HER2 7C2 se une a un epítopo en el dominio I de HER2 (publicación de PCT N.° WO 98/17797) que está a 100 angstromios de la región de HER2 unido por hu4D5 (Figura 76A).

Además, la afinidad de unión del TDB HER2 se probó con múltiples grupos anti-CD3. Uno de los grupos anti-HER2 proporcionados se combinó con grupos de alta afinidad dirigidos a CD3 humanos, tales como SP34 y 38E4v1. Otras combinaciones de TDB HER2 incluyó los grupos de baja afinidad dirigidos a CD3 humanos 40G5c o el grupo de 2C11 dirigido al CD3 murino. UCHT1v9 por su grupo anti-CD3 y hu4D5 por su grupo anti-HER2, referido en este documento como TDB HER2 (UCHT1v9/hu4D5) o TDB HER2, se comparó con el anticuerpo anti-HER2, trastuzumab y los fragmentos trastuzumab Fab en un ensayo de Scatchard competitivo (Ramirez-Carrozzi et al. *Nature Immunology*. 12: 1159-1166, 2011). En este ensayo, la unión a SKBR-3 se determinó por la competencia de unión de ^{125}I-trastuzumab Fab con trastuzumab, trastuzumab Fab o TDB HER2 bioespecíficos. La Figura 74A muestra los resultados del competitivo ensayo de Scatchard *in vitro* de TBD HER2.

B. Ensayos in vitro sobre la eliminación de células diana SKBR3 y MCF7 y la activación de células T

Las combinaciones de TDB HER2 de uno de los tres grupos anti-HER2 (hu4D5, 2C4 y 7C2) con el grupo anti-CD3 de alta afinidad 38E4v1 o con el grupo de baja afinidad 40G5c se examinaron *in vitro* por su capacidad de mediar en la eliminación de células diana de células SKBR3 o MCF7 que expresan HER2 (Figura 77). La actividad *in vitro* de los TDB hu4D5 con cualquier grupo anti-CD3 demostró ser más eficaz que los TDB 2C4 y 7C2 en la mediación de la eliminación celular máxima de las células SKBR3 y MCF7 como se mide por su EC50 (Figura 78). Esta actividad de eliminación también dependía del grupo CD3 utilizado. La combinación del grupo anti-CD 3 38E4v1 con cualquiera de los grupos anti-HER2 hu4D5, 2C4 o 7C2 fue más eficaz que las combinaciones de TDB HER2 40G5c (Figura 79). La prueba adicional de las 6 combinaciones de TDB HER2 reveló que su actividad de eliminación de células diana no depende del nivel de la expresión de HER2 en las células diana. La figura 80 muestra que los TDB HER2 no eran selectivos para los altos HER2 que expresan las células diana SKBR3 sobre los bajos HER2 que expresan las células diana MCF7. La actividad del TDB HER2 era, en cambio, dependiente de la afinidad del grupo anti-HER2 de HER2 (Figura 81). Los TDB de baja afinidad HER2 retuvieron la actividad en células MCF7 que expresan HER2 bajos y no pudieron matar selectivamente a las células SKBR3 amplificadas de HER 2 (Figura 82).

Los TDB HER2 también se ensayaron para determinar la especificidad del grupo anti-HER2 para sus respectivos epítopos HER2. La actividad de eliminación del TDB HER2

hu4D5-40G5c se limitó cuando se combinó con concentraciones crecientes de Trastuzumab (hu4D5). Sin embargo, la eficacia de trastuzumab no se ve afectada por la combinación del TDB hu4D5 con el anticuerpo hu4D5 (Figura 83). Por el contrario, la eliminación de las células diana mediada por 2C4-40G5c o 7C2 38E4v1 bloqueada por la coadministración de los anticuerpos monoespecíficos bivalentes pertuzumab (2C4) o 7C2, respectivamente (Figura 83). Cuando los grupos anti-HER2 se probaron en múltiples ensayos de afinidad, todos los clones que demostraban actividad alta o media de TDB HER2 competían con trastuzumab o pertuzumab (Figura 84). Para la identificación de los TDB candidatos para el ensayo *in vivo*, los grupos CD3 de alta (38E4v1, 38E4 y SP34) y baja (40G5c y 2C11) afinidad se probaron *in vitro* con células T CD3+ humanizadas derivadas de ratones en combinación con los grupos anti-HER2 hu4D5, 2C4 y 7C2 (Figuras 85-86). A partir de este ensayo, se seleccionaron tres TDB candidatos según su actividad de eliminación para una mayor caracterización *in vivo*: hu4D5-SP34, hu4D5-2C11 y 2C4-38E4. El tratamiento de animales con tumores con expresión HER2 con el TDB HER2 hu4D5-2C11 resultó en un aumento en las células CD45+ y CD8+ en el tumor tan pronto como a las 4 horas luego del tratamiento. Tras un análisis adicional, los tumores tratados TDB HER2 revelaron un aumento en las células T IFNγ+ y PD1+ CD8+ y un aumento en presencia de células T reguladoras (Treg) (Figura 87B). La detección de un aumento de infiltrados inmunes en tumores también se relacionó con una disminución del volumen del tumor de los animales tratados TDB HER2, en comparación con el tratamiento de control del vehículo (Figura 87A). En la figura 88A, el grupo anti-HER2 hu4D5 se combinó con el grupo anti-CD3 de baja afinidad, 2C11 o con el grupo anti-CD3 de alta afinidad, SP34, y ambos resultaron en la regresión del tumor en ratones HER2 transgénicos. Sin embargo, esta respuesta no se observó con el grupo anti-GER2 2C4 de baja afinidad combinado con el grupo anti-CD3 de alta afinidad 38E4 (Figuras 88A-88B).

El TDB HER2 también se comparó con fragmentos de trastuzumab y trastuzumab Fab bivalentes por su capacidad de inhibir directamente la proliferación de SKBR3. Las células dianas que expresan HER2 se incubaron en placas de 96 pocillos a una densidad de 5×10^3 células/posillo y se incubaron durante la noche para la fijación celular antes del tratamiento con el anticuerpo o fragmento de anticuerpo designado. Se analizó la proliferación/viabilidad celular después de 6 días de tratamiento mediante el Ensayo de viabilidad celular luminiscente CELLTITERGLO® (Promega, Madison, WI). En la Figura 74B se muestran los resultados de este ensayo. Además, se realizó un ensayo *in vitro* de toxicidad con trastuzumab, trastuzumab producida en *E. coli* y TDB HER2 para medir su capacidad para inducir la citotoxicidad NK mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC) (Jefferis *Trends in Pharmacological sciences.* 30: 356-362, 2009; Simmons et al. *Journal of Immunological Methods*. 263: 133-147, 2002). Los anticuerpos producidos en E. *coli* no están glicosilados, lo que resulta en deterioro de la unión FcyR, que se necesita para mediar la ADCC. El ensayo de citotoxicidad se realizó como en Junttila et al. (*Cancer Research.* 70: 4481-4489, 2010) con un a kit de detección de

citotoxicidad; LDH (Roche, Mannheim, Alemania). Brevemente, las células lisadas se detectaron mediante la liberación de la deshidrogenasa láctica (LDH, por sus siglas en inglés) después de 4 horas de tratamiento con el anticuerpo especificado. Los resultados se muestran en la Figura 74C.

Los TDB HER2 también se probaron para determinar su capacidad para soportar la eliminación de las células diana SKBR3 que expresan HER2 y la activación del efecto citotóxico de las células T. *La citotoxicidad* in vitro se controló mediante citometría de flujo. Las células dianas se marcaron con éster de succinimidilo de carboxifluoresceína (CFSE, por sus siglas en inglés) de acuerdo con el protocolo del fabricante (Invitrogen, # C34554). Las células diana marcadas con CFSE y las células T CD8+ purificadas de PBMC humanos se mezclaron en cierta proporción E:T (como se indica en las leyendas de la figura), con o sin TDB por 24 horas. Al final de la incubación, las células se levantaron con tripsina y se juntaron de la placa. Las células se resuspendieron en un volumen igual de PBS + 2% FBS + 1 mM EDTA + yoduro de propidio (PI). El análisis de citometría de flujo se realizó en un FACSCalibur en formato de automatización. El número de células diana vivas se contó mediante la apertura o cierre de las células negativas CFSE+/PI. El porcentaje de citotoxicidad se calculó de la siguiente manera: % de citotoxicidad (número de células diana vivas w/o TDB, número de células diana vivas w/TDB) / (número de células diana vivas w/o TDB) x 100. Como se muestra en la Figura 75, el TDB HER2 mostró una eliminación de células diana SKBR3 *in vitro* fuerte comparada con el TDB HER2 que tenía una variante de afinidad hu4D5 91A o Y100A como su grupo anti-HER2 (EC50 de hu4D5/ UCHT1v9 TDB = 0,1 ng/ml; hu4D5.91A/ UCHT1v9 TDB = 25,5 ng/ml; hu4D5.Y100A/ UCHT1v9 TDB = no se puede determinar).

Además, la afinidad de unión de la variante hu4D5 de anti-HER2 (0,4 nM) al dominio extracelular de HER2 (ECD) es mayor que los grupos HER2 2C4 (2,0 nM) y 7C2 (1,7 nM), que se muestra en la Figura 76B. Además, la Figura 76C muestra que el TDB HER2 hu4D5 es un mediador más potente de la eliminación de las células diana MCF7 que el TDB HER2 2C4 y el TDB HER2 7C2. La cinética de la eliminación inducida por el TDB HER2 se ensayó adicionalmente. Como se observa en la Figura 94A, no se detectó actividad de eliminación significativa a las 4-12 horas. La eliminación fuerte se detectó a las 24 horas y la eliminación aumentó con el paso del tiempo. Como se muestra en las figuras 90A, 90C y 92C, la comparación adicional de los grupos anti-CD3 del TDB HER2 hu4D5 demostró la eficacia de los diferentes clones en la mediación de la eliminación de células SKBR3 que expresan HER2. En particular, dos TDB Her2, hu4D5/38E4c y hu4D5/40G5c, fueron sorprendentemente tan o más eficaces en la mediación de la eliminación de las células dianas que el TDB HER2 hu4D5/SP34 (Figuras 90B y 90C).

Cuando se probó para ensayos de activación de células T, la Figura 89 muestra que el TDB HER2 fue capaz de inducir sólidamente la actividad de la células T *in vitro*, en comparación con el TDB HER2 que tiene variante de afinidad hu4D5 91A o Y100A como su grupo anti-HER2. Tres grupos anti-CD3 (SP34, 38E4c y 40G5c) del TDB HER2 hu4D5 ensayados mostraron diferentes afinidades de unión para el antígeno CD3 en células T

CD8+ humanas, como se observa en la Figura 91A. No obstante, los tres TDB HER2 pudieron mediar la activación de células T CD8+ (Figura 91B). En la Figura 92D, se muestra un análisis adicional de la capacidad de los grupos anti-CD3 38E4 y 38E4c del TDB HER2 hu4D5 para mediar la activación de células T CD8+. Se ensayó aún más la cinética de la activación de células T mediante TDB HER2. Aparecieron signos tempranos de activación de células T (CD69) 4 horas después del inicio del tratamiento de TDB HER2. Sin embargo, los marcadores de activación tardía (CD107a extracelular) se detectaron más tarde en el punto temporal de 24 horas (Figura 94A). Además, la activación de células T no se detectó después de 48 horas cuando las células CD8+ se incubaron con TDB HER2 o células diana que no expresan HER2 humana (células BJAB). Se observó una sólida activación de células T cuando las células HER2+ SKBR3 se utilizaron como dianas acompañadas por la liberación de gránulos citotóxicos (Figura 93A).

También probamos la capacidad de TDB HER2 para inducir la eliminación de células diana BT474 y se ensayó la activación de células T para las siguientes cinco relaciones de células T CD8+ efectoras a las células diana: 1:5, 1:2, 1:1, 3:1, y 5:1. Este experimento revela que la citotoxicidad medida por la liberación de LDH se redujo significativamente mediante la titulación de células efectoras. Sin embargo, incluso con una relación E: T de 1: 1, se detectó una señal de LDH débil y la sólida activación de las células T (Figura 94B).

En estos ensayos, las células diana y las células T CD8+ purificadas se mezclaron en presencia o ausencia de TDB y se analizó la activación de células T mediante la citometría de flujo. Al final de la incubación, las células se tiñeron con CD8-FITC (BD Bioscience, 555634) CD69-PE (BD Bioscience, 555531) y CD107a-Alexa-Fluor647 (eBioscience, 51-1079). Opcionalmente, las células se tiñeron con CD8-FITC y CD69-PE, donde la activación de células T se evaluó por el porcentaje de CD8+CD69+ en las células CD8+. Alternativamente, después de que la superficie se tiñó con CD8-FITC y CD69-PE, las células se fijaron y se permeabilizaron con una solución de Cytofix/Cytoperm (BD Bioscience, 554722) y se tiñeron de forma intracelular con anti-granzima B-Alexa-Fluor647 (BD Bioscience, 560212). La activación de células T se evaluó por el porcentaje de células CD8+CD107a+.

Otro índice para la citotoxicidad mediada por células T para TDB HER2 (UCHT1v9 / hu4D5) medido es un ensayo de exocitosis de los gránulos. La Figura 93B muestra los resultados para la perforina soluble (Cell Sciences), granzima A y granzima B (eBioscience) detectados a partir del medio de crecimiento por el método ELISA de acuerdo con los protocolos del fabricante. En este ensayo, se utilizó un TDB control (10 ng/ml), uno que comparte el mismo grupo AD3 como TDB HER2 pero que tiene un grupo para la diana irrelevante, o TDB HER2 (10 ng/ml). Los anticuerpos se incubaron de manera individual por 18 horas con células diana SKBR3 y células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés) efectoras, que se separaron de la sangre de voluntarios sanos a través del medio de separación de linfocitos (MP

Biomedicals, Solon, OH). *La citotoxicidad* in vitro se midió mediante la liberación de LDH, como se describe anteriormente. Se realizó una serie de ensayos de apoptosis con TDB HER2 (1 ng/ml), PBMC efectoras y células diana SKBR3. Después de 24 horas de tratamiento, la exocitosis de gránulos coincidió con una significativa elevación inducida de TDB HER2 de la actividad de la caspasa 3/7 (CASPASE-GLO® ensayo 3/7, Promega), apoptosis (ensayo Cell Death Detection ELISAplus, Roche) y citotoxicidad tal como se midió por la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH), como se describe anteriormente (Figura 93C).

La capacidad de TDB HER2 para inducir la eliminación de HER2 o células 3T3 transfectadas con el vector se midió mediante el ensayo de citotoxicidad de LDH antes mencionado, donde no se detectó ninguna eliminación de células 3T3 transfectadas con el vector después de 19 horas. En cambio, las células 3T3 transfectadas HER2 se eliminaron de manera muy eficiente (Figura 93D). El ensayo de eliminación se modificó para bloquear la unión del grupo HER2 mediante trastuzumab Fab (1µg/ml) o el dominio extracelular HER2 soluble (HER2 ECD) (1 mg/ml) y dio lugar a la inhibición eficaz de la actividad de eliminación después de 24 horas (Figura 93E). Para confirmar que las células T dependen de la eliminación, se mermaron las células CD3+ del OPBMC mediante microperlas CD3+ de Miltenyi (# 130-050-101). La Figura 93F muestra la disminución que resultó en la pérdida de la actividad de eliminación de células diana después de 19 horas, tal como se evaluó mediante análisis de FACS en presencia de TDB HER2.

TDB HER2 induce la proliferación de células T

Para investigar si TDB HER2 induce la proliferación de células T, se co-cultivaron células T CD8 +, células diana (SKBR3) y TDB HER2 de 0,1 µg/ml, seguido por el cultivo de células T en ausencia de células diana y TDB HER2. La proliferación de células T se midió en el día 3 mediante citometría de flujo como una dilución de CFSE en las células CD8+/PI con divisiones celulares. Después de 3 días, el 75% de las células T pulsadas con TDB HER2 y las células diana se habían sometido a una división celular como se muestra en la Figura 95A. El número de células T inducidas TDB HER2 se ensayó mediante el etiquetado de células T CD8+ purificadas con CFSE de acuerdo con el protocolo del fabricante (Invitrogen, # C34554). Las células T CD8+ marcadas con CFSE se incubaron con células dianas en presencia o ausencia de TDB por 19 horas. Las células T se recogieron, lavaron y cultivaron de 2 a 7 días (RPMI+10% FBS). El número de células CD8+ vivas (CD8+/PI-) y el porcentaje de células dim CFSE se detectaron mediante FACS. En la Figura 95B, el número de células no aumentó. Complementar aún más el medio de crecimiento con IL-2 (20 ng/ml) proporcionó una señal de supervivencia para las células CD8 + y se detectó una sólida proliferación de células T en las células T, pero sólo si estaban expuestas al TDB HER2 y a las células diana (Figura 95C). Es importante destacar que no se detectó ningún efecto espectador en las células de expresión no dianas en condiciones donde la mayoría de las células HER2+ en la misma cultura

resultaron eliminadas. TDB HER2 indujo la proliferación y la expansión policlonal de células T, lo que puede ser crítico para la amplificación de los linfocitos infiltrantes de tumor.

La actividad TDB HER2 se relaciona con el nivel de expresión HER de la célula diana

Para investigar la relación entre el número de copias de la diana y la actividad TDB, se seleccionó un panel de líneas celulares de cáncer con un número predeterminado de HER2-receptores en la membrana celular (Aguilar et al. *Oncogene*. 18:6050-62, 1999). Se detectaron niveles de expresión de proteínas HER2 en una línea celular negativa HER2 (BJAB LUC), 3 líneas de células bajas 3 HER2 (MDA435, MDA231, MCF7) y 3 líneas celulares amplificadas/de sobreexpresión HER2 (MD453, SKBR3, BT474) mediante Western blot (Figura 96A). Las líneas celulares de HER2 negativos, HER2 bajos y sobreexpresión de HER2 se incubaron con TDB HER2 y con PBMC efectoras en una relación E:T 25:1 durante 26 horas. En este punto de tiempo, la citotoxicidad se detectó a través del ensayo de liberación de LDH. La Figura 96B muestra que las células amplificadas/de sobreexpresión HER2 fueron significativamente más sensibles a la eliminación mediada por TDB (p = 0,015, t-test) y se lisaron eficientemente a femtomolar a bajas concentraciones picomolares (EC50 = 0,8-3 pM). Las líneas celulares que expresan niveles bajos de HER2 fueron significativamente menos sensibles al anticuerpo TDB HER2 (EC50=33-51 pM). Una cantidad de <1000 copias de antígeno diana fue suficiente para apoyar la eliminación de células T.

Para los estudios realizados en las Figuras 96C-96D, la línea celular MCF7 o la línea celular BJAB estaba co-dirigida con células SKBR3 en presencia de TDB HER2 en el mismo ensayo de eliminación. En este ensayo, las células MCF7 o BJAB se marcaron con CFSE y se mezclaron con SKBR3 y PBMC (E:T 20:1), seguido de 19 horas de tratamiento con TDB HER2. Las células se tiñeron con APC y PI anti-HER2. La Figura 96C muestra el porcentaje de las células vivas SKBR3 (HER2 alto, PI-) y MCF7 (CFSE+. PI-) detectado mediante FACS y normalizado a perlas fluorescentes. No se detectó la eliminación de las células MCF7 en el EC50 para la eliminación de SKBR3. Se muestra el porcentaje de células vivas de SKBR3 (HER2 elevado, PI-) y BJAB (CFSE+ PI-) detectadas por FACS y normalizadas por perlas fluorescentes. No se detectó ninguna muerte importante de células de BJAB en cualquier concentración de TDB HER2 (Figura 96D).

La ocupación objetivo baja es suficiente para la actividad de TDB

Luego, se calculó la ocupación de HER2 en EC50 para TDB HER2 mediante la utilización de la fórmula [D]/[D]+K_D (donde D = medicamento y K_D para TDB HER2 era 5,4 nM). Se informó el número de copia de HER2 (Aguilar et ál. Oncogene. 18: 6050-6062, 1999). Los valores de EC50 se calcularon de los datos de respuesta de la dosis en la Figura 97B. La Figura 96E muestra que en todas las líneas celulares probadas inferiores al 1 % de la ocupación diana era suficiente para una eliminación eficiente. En caso del

HER2 elevado que expresa líneas celulares, la ocupación requerida era incluso inferior (0,01-0,05 %). El número absoluto calculado de TBD HER2 ligado a HER2 en el EC50 era tan solo 10-150 en las líneas celulares bajas expresadas. Estos resultados muestran la extrema potencia de TDB HER2 y son coherentes con los estudios del desencadenante de TCR, que sugiere tan solo 1-15 TCR que deben involucrarse para desencadenar las respuestas a las células T (Irvine et ál. *Nature*. 419: 845-849, 2002; Purbhoo et ál. *Nature Immunology*. 5: 524-530, 2004; Sykulev et ál. *Immunity*. 4: 565-571, 1996). La potencia de TDB HER2 era coherente en el rango bajo de picomolar a femtomolar. Además, tan solo 10-500 TDB ligados a HER2 eran suficientes para inducir una citotoxicidad importante *in vitro*. Tan solo ~1000 copias de HER2 en la membrana plasmática eran suficientes para inducir la muerte. Estos estudios también demostraron una correlación entre los niveles de expresión objetivo y la sensibilidad *in vitro* a los TDB HER2.

El TDB HER2 es eficiente en la muerte de las células cancerígenas de HER2+ resistentes a los tratamientos anti-HER2.

Luego, se examinaron las líneas celulares que se han mostrado previamente para expresar niveles elevados de HER2 pero que son insensibles a los efectos celulares directos de trastuzumab y lapatinib *in vitro* (Junttila et ál., *Cancer Cell*, 15:429-40, 2009; Junttila et ál. *Breast Cancer Res Treat*, 2010). Para algunas líneas celulares, la activación de la vía de PI3K debido a las mutaciones de activación adquiridas en la subunidad catalítica de PI3K (KPL4, HCC202) o por la pérdida de PTEN (HCC1596) puede provocar resistencia. Un panel de seis líneas celulares (5 mamas, 1 pulmón) se analizó para la liberación de LDH como medición de citotoxicidad en presencia de PBMC efectores en una proporción de 10:1 y TDB HER2 durante 19 horas. El EC50 para la muerte mediada de TDB HER2 estaba en el rango femtomolar o picomolar bajo (Figura 97A). Los clones BT474-M1 resistentes a T-DMI1 y parentales se trataron con T-DMI1 durante 3 días. En este punto temporal, se midió la viabilidad celular con CELLTITERGLO® (Figura 97B). Se ha informado con anterioridad la sensibilidad de las líneas celulares a T-DM1 (Junttila et ál. *Breast Cancer Res Treat*. 2010; Lewis Phillips et ál. *Cancer Research.* 68: 9280-9290, 2008). En comparación, los clones de BT474-M1 resistentes a T-DM1 y parentales se trataron con TDB HER2 en presencia de las células CD8+ T efectoras en una proporción de 3:1 durante 24 horas. Se detectó citotoxicidad con el ensayo FACS (Figura 97C). Además, TDB HER2 era eficaz en la muerte de las células cancerígenas del pulmón HER2+. Con dos modelos de líneas celulares independientes KPL4 y BT474, (Figura 97B-97C), la resistencia adquirida a T-DM1 no afectó la sensibilidad a TDB HER2.

La identificación de la actividad de eliminación de células T con TDB HER2 depende de la expresión HER2, pero es independiente de la vía de señalización de HER2, que sugiere que TDB HER2 pueda ser eficiente en el tratamiento de tumores que son resistentes a los tratamientos actuales anti-HER2. Además, los datos demostraron actividad igual en el tratamiento de las líneas celulares resistentes a trastuzumab/lapatinib múltiples en comparación con las células sensibles. La resistencia

en estas células se genera mediante diversos mecanismos que afectan la vía de HER2. Los datos presentados aquí sugieren que el cambio al mecanismo alternativo de acción mediante la utilización de TDB HER2 puede permitir ampliamente superar la resistencia a los conjugados del medicamento del anticuerpo (p. ej., T-DM1), inhibidores de moléculas pequeñas objetivo (p. ej., lapatinib) y anticuerpos monoclonales clínicos que bloquean la señalización de la vía (p. ej. trastuzumab).

Farmacocinética de TDB HER2 en la rata

Para evaluar el perfil de la farmacocinética (PK) de TDB HER2, se utilizaron ratas Sprague Dawley. Los animales se separaron en los dos grupos mencionados a continuación: Grupo 1: TDB HER2 (10 mg/kg, IV única, n = 4); Grupo 2: trastuzumab (10 mg/kg, IV única, n = 4). Las muestras se tomaron de 4 ratas por grupo en puntos temporales durante 35 días posteriores a la dosis. Aproximadamente se recolectó 0,2 ml de sangre completa a través de la vena yugular (bajo anestesia de CO_2/O_2). Se dejaron coagular y centrifugar las muestras bajo refrigeración (5 °C durante 10 minutos a 2000 x g) a fin de obtener suero. Las muestras de suero se analizaron para IgG humano mediante ELISA, donde se utilizó un burro anti-huFc recubierto con placa de microtitulación para capturar los anticuerpos anti-HER2 humanizados en circulación y una cabra anti-huFc-HRP (adsorbida por el ratón) para la detección. Los parámetros de PK se determinaron con un método de 2 compartimientos (Modelo 7) con WINNONLIN®, versión 5.2.1 (Pharsight Corp., Mountain View, CA). El TDB HER2 no reacciona con CD3 de ratas o HER2 de ratas y mostró una disposición bifásica típica de un IgG1 con una fase de distribución corta y una fase de eliminación lenta (Figura 98). Tanto la depuración como la vida media de TDB HER2 eran similares para trastuzumab, y dentro del rango esperado de un IgG1 típico en ratas.

TDB HER2 inhibe el crecimiento del tumor *in vivo* en ratones inmunodeprimidos

La eficacia in vivo de TDB HER2 se probó en ratones NOD-SCID, que carecen de células T y B funcionales endógenas y han reducido los niveles de tipos celulares de NK, DC y macrófagos. En este experimento, los ratones NOD/SCID (NOD.CB17-*Prkdcscid*/J, Jackson Labs West) se implantaron con 0,36 mg, gránulos de estrógenos de liberación sostenida por 60 días (Innovative Research of America) 1 a 3 días antes de la inoculación celular, de manera subcutánea sobre el costado opuesto de la inoculación tumoral. En el Día 0, las células MCF7-neo/HER2 5 x 10^6 se inyectaron solas o juntas con PBMC humano no estimulado 10×10^6 de uno de dos donantes sanos (PBMC 1, 2) en HBSS-matrigel en la almohadilla de grasa mamaria derecha de 2/3. Los ratones inoculados se dividieron en los siguientes cinco grupos: Grupo 1: Vehículo (TDB de control, 0,5 mg/kg, qwk x 3, IV, comenzando el día 0, n=5-10); Grupo 2: PBMC(1) (PBMC (1) + TDB de control, 0,5 mg/kg, qwk x 3, IV, comenzando el día 0, n=5-10); Grupo 3: PBMC (1) + TDB HER2 (PBMC (1) + TDB HER2, 0,5 mg/kg, qwk x 3, IV, comenzando el día 0, n=5-10); Grupo 4: PBMC(2) (PBMC (2) + TDB de control, 0,5 mg/kg, qwk x 3, IV, comenzando el día 0, n=5-

10); Grupo 5: PBMC (2) + TDB HER2 (PBMC (2) + TDB HER2, 0,5 mg/kg, qwk x 3, IV, comenzando el día 0, n=5-10). Los primeros tratamientos se administraron 2 horas después de la inoculación. Los volúmenes de los tumores de ratones individuales y los volúmenes de los tumores adaptados de los grupos terapéuticos se presentan en la Figura 99A, donde TDB HER2 evitó el crecimiento de los tumores que expresan HER2.

La dependencia de TDB HR2 en los PBMC humanos además se probó en un modelo de ratones inmunodeprimidos similares. Nuevamente, las células MCF7-neo/HER2 5 x 10^6 se inyectaron solas o juntas con PBMC humano no estimulado 10×10^6 de un donante sano (PBMC 3) en HBSS-matrigel en la almohadilla de grasa mamaria derecha de 2/3, y los primeros tratamientos se administraron 2 horas después de la inoculación. En la Figura 100A, los ratones inoculados se dividieron en los siguientes dos grupos: Grupo 1: Sin tratar (n=7); Grupo 2: TDB HER2 (TDB HER2, 0,5 mg/kg, qwk x 3, IV, comenzando el día 0, n=7). En la Figura 100B, los ratones inoculados se dividieron en los siguientes tres grupos: Grupo 1: Sin tratar (n=7); Grupo 2: PBMC(3) (PBMC (3) + vehículo, 0,5 mg/kg, qwk x 3, IV, comenzando el día 0, n=7); Grupo 3: PBMC(3) + TDB de control (PBMC(3) + TDB-2C11 de control, 0,5 mg/kg, qwk x 3, IV, comenzando el día 0, n=7). Las mediciones del volumen del tumor resultante no revelan ningún efecto en el crecimiento del tumor en animales tratados con TDB de control.

El TDB HER2 provoca regresión de los tumores mamarios grandes en ratones transgénicos huHER2

Para modelar la actividad de TDB HER2 en ratones inmunocompetentes, se utilizaron ratones transgénicos MMTV-huHER2 humanos (Finkle et ál. *Clinical Cancer Research*. 10: 2499-2511; 2004), y un TDB HER2 sustituto que comprende un clon del anticuerpo del reactivo CD3 IgG2A murino 2C11 (Leo et ál. *Proc Natl Acad Sci USA*. 84: 1374-1378, 1987) se generó para evitar una respuesta inmunitaria hacia el TDB. Para la expresión como mulgG2a, las mutaciones equivalentes del botón en ojal (Atwell et ál. *J Mol Biol.* 270: 26-35, 1997) se introdujeron en la región Fc, así como D265A y N297G (numeración UE) para eliminar la función efectora. En TDB HER2 mulG2a el brazo "botón" es hu4D5 anti-HER2 murino y el "ojal" es CD3 2C11 anti-murino quimérico (Leo et ál. *Proc Natl Acad Sci USA*. 84: 1374-1378, 1987) (TDB 2C11/hu4D5) o CD3 SP34 anti-hu del ratón (Pessano et ál. *La Publicación de EMBO.* 4: 337-344, 1985) (TDB SP34/hu4D5). Los anticuerpos biespecíficos DE mulG2a se expresaron en células CHO y se ensamblaron mediante un ensamble *in vitro*. Los anticuerpos biespecíficos se purificaron de contaminantes mediante cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) como se describe en otro lugar (Speiss et ál. *Nat Biotechnology.* 31: 753-758, 2013). El material resultante se analizó para los niveles de endotoxinas con un sistema de prueba portátil ENDOSAFE® (Charles River, EE.UU.) y cuando sea necesario, el contenido de la endotoxina se redujo mediante el lavado de la proteína con 0,1 % de TRITON™ X-114. La actividad *in vitro* de TDB hu4D5/2C11 era similar a TDB HER2 reactivo de CD3 humano (Figura 101).

En la Figura 99B-99D, los animales transgénicos MMTV-99D con tumores mamarios establecidos se dividieron en los siguientes dos grupos: Grupo 1: Vehículo (0,5 mg/kg, qwk x 5, IV, comenzando el día 0, n=7); y el Grupo 2: TDB HER2 (TDB HER2 (2C11/hu4D5), 0,5 mg/kg, qwk x 5, IV, comenzando el día 0, n=7). La figura 99B muestra una regresión detectada en 57 % de los ratones y el 43 % de los ratones no tenían ningún tumor detectable tras el tratamiento. La figura 99C muestra que TDB HER2 (2C11/hu4D5) dio lugar a más de 50 % de regresión tumoral, salvo un tumor. Los participantes incluían tumores que eran >1000 mm^3 al comienzo del tratamiento como se observa en la Figura 99D. En un experimento similar dos TDB de control se utilizaron donde uno es un TDB de control del brazo de CD3 con el brazo de CD3 específico murino cambiado al brazo de CD3 específico humano (TDB HER2 (SP34/hu4D5)), y uno es un TDB de control, uno que comparte el mismo brazo de CD3 que el TDB HER2 (2C11/hu4D5) pero tiene un brazo diana irrelevante (CTRL TDB-2C11). En la Figura 99E, los animales transgénicos MMTV-huHER2 con tumores mamarios establecidos se dividieron en los siguientes dos grupos: Grupo 1: TDB de control del brazo de CD3 (TDB HER2 (SP34/hu4D5), 0,5 mg/kg, qwk x 5, IV, comenzando el día 0, n=5); y el Grupo 2: TDB de control (TDB-2C11 de control, 0,5 mg/kg, qwk x 5, IV, comenzando el día 0, n=5). El crecimiento de los tumores transgénicos MMTV-huHER2 no se vio afectado por los TDB de control.

El TDB HER2 además se probó para la eficacia *in vivo* en ratones transgéncios huCD3. Los ratones transgénicos humanos CD3ε se han descrito anteriormente ((huCD3 transgénico), de la Hera et ál. *J Exp Med.* 173: 7-17, 1991). En este estudio, 0,1 millones de células de CT26-HER2 se inyectaron subcutáneamente en ratones transgénicos huCD3. Una vez que se establezcan los tumores CT26-HER2, los animales se dividieron en los siguientes dos grupos: Grupo 1: Vehículo (0,5 mg/kg, qwk x 3, IV, comenzando el día 0, n=7); Grupo 2: TDB HER2 (TDB HER2 (SP34/hu4D5), 0,5 mg/kg, qwk x 3, IV, comenzando el día 0, n=7). TDB HER2 inhibió el crecimiento de los tumores establecidos, pero el efecto fue transitorio y no se observaron respuestas completas (Figura 99F). El estudio demostró la actividad *in vivo potente* de TDB HER2, incluyendo las respuestas dramáticas en ratones transgénicos MMTV-huHER2.

En un experimento similar, la eficacia *in vivo* del TDB HER2 reactivo del ratón (2C11/hu4D5) se probó en ratones Balb/c. Nuevamente, los tumores singénicos se establecieron en ratones Balb/c inyectando células CT26-HER2 $1x10^5$ subcutáneamente. Los animales que tenían tumores se dividieron en uno de los siguientes cuatro grupos: Grupo 1: Vehículo (0,5 mg/kg, qwk x 3, IV, comenzando el día 0, n=10); Grupo 2: TDB HER2 (TDB HER2 (2C11/hu4D5), 0,5 mg/kg, qwk x 3, IV, comenzando el día 0, n=10); Grupo 3: TDB de control (CTRL TDB (2C11/hu4D5), 0,5 mg/kg, qwk x 3, IV, comenzando el día 0, n=10); y el Grupo 4: TDM-1 (TDM-1, 15 mg/kg, qwk x 3, IV, comenzando el día 0, n=10). La figura 99G muestra que a pesar de las respuestas incompletas, el TDB HER2 prolongó el tiempo de manera significativa a la evolución del tumor (valor p de rango logarítmico <0,0001). Por contraste, el TDB de control con un brazo tumoral irrelevante

no tuvo efecto en el crecimiento tumoral. Además, los tumores no eran sensibles a TDM-1.

TDB HER2 inhibe el crecimiento de tumores establecidos en ratones inmunocompetentes

Los ratones transgénicos humanos CD3ε (de la Hera et ál. *J Exp Med.* 173: 7-17, 1991) se utilizaron para modelar la actividad de TDB HER2 en ratones inmunocompetentes. En este experimento, las células T transgénicas huCD3 fueron extraídas de bazos de ratones transgénicos y BALB/c huCD3 o de la sangre periférica de donantes humanos sanos. Las células se tiñeron con CD8 de ratón o humano y CD3 humano (UCHT1 clon) en la Figura 101A o el CD3 del ratón (2C11 clon) en la Figura 101B. Las células CD8+ se detectaron mediante citometría de flujo. La Figura 101A muestra el CD3 humano expreso de las células T transgénicas huCD3 a aproximadamente 50 % del nivel de las células T humanas, y la Figura 101B muestra CD3 murino expreso de las células T transgénicas huCD3 a aproximadamente 50 % del nivel de ratones BALB/c.

Luego, las células T transgénicas huCD3 se analizaron por su capacidad de matar células objetivo de CT26 que expresan HER2 *in vitro.* En este estudio, las células T fueron extraídas de bazos de ratones transgénicos huCD3, ratones BALB/c huCD3 o de sangre periférica proveniente de donantes humanos sanos. *La actividad de matar* in vitro de las células CT26-HER2 se probó con TDB HER2 específico de CD3 humano (UCHT1v9/hu4D5) en la Figura 102A o TDB HER2 específico del ratón (2C11/hu4D5) en la Figura 102B. Las células T efectoras se agregaron en una proporción de 20:1 a las células objetivo en presencia de TDB HER2 diseñado durante 40 horas. *La citotoxicidad* in vitro se controló mediante citometría de flujo. Si bien la actividad de eliminación de las células T esplénicas del ratón (EC50 = 2,4 ng/ml) fue inferior de manera coherente en comparación con las células T periféricas humanas (EC50 = 0,4 ng/ml), las células T transgénicas huCD3 eliminaron las células diana que expresan HER2 humano *in vitro* como se observa en la Figura 102A. El TDB HER2 específico del ratón (2C11/hu4D5) indujo matar las células objetivos mediante células T provenientes de ratones transgénicos huCD3 (EC50 = 11 ng/ml) y BALB/c (EC50 = 10 ng/ml) como se observa en la Figura 102B.

La dependencia de las células T de la actividad antitumoral de TDB HER2 además se analizó en un modelo tumoral singénico. Como se describe anteriormente, las células CT26-HER2 1x105 se inyectaron en ratones BALB/c. Los ratones con tumores establecidos se dividieron en uno de los siguientes dos grupos: Grupo 1: Vehículo (n=10); Grupo 2: TDB HER2 (SP34/hu4D5) (TDB HER2 (SP34/hu4D5), 0,5 mg/kg, qwx3, IV, n=10). La figura 103 muestra que la actividad de TDB HER2 dependía de las células T, dado que el TDB HER2 no tuvo efecto alguno en ratones transgénicos sin huCD3. El presente estudio demostró ratones transgénicos huCD3 que se pueden utilizar como modelo de eficacia novedosa para las moléculas objetivo de huCD3.

Ejemplo 6. Generación y caracterización de los TDB de CD3/LYPD1 ejemplares.

Además, exploramos la capacidad de anticuerpos de TDB para identificar las actividades citotóxicas de las células T en extirpar las células tumorales mediante el reconocimiento de un antígeno de superficie celular diferente, LYPD1. Para ello, generamos y caracterizamos anticuerpos anti-CD3 que tienen un brazo anti-CD3 y un brazo anti-LYPD1 (TDB de LYPD1). Como se describió anteriormente, los TBD de LYPD1 se produjeron como anticuerpos de longitud completa en el formato de botón en ojal (knob-into-hole) como IgG1 humana, como se describió previamente (Atwell et ál. *J. Mol. Biol.* 270: 26-35, 1997). La mitad de los anticuerpos se expresaron en *E. coli* o en células de ovarios de hámster chino (CHO), purificados por cromatografía de afinidad de proteínas A, y los pares adecuados de anticuerpos medios se hibridaron *in vitro* como se describió anteriormente (Spiess y otros. *Nat. Biotechnol.* 2013). Si la producción de anticuerpos TDB se llevó a cabo en células CHO, el anticuerpo incluyó una mutación de glicosilación, por ejemplo, en el residuo N297 (p. ej., N297G), de manera tal que el anticuerpo TDB era una variante sin efector e incapaz de iniciar citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés). Luego de la hibridación, los TBD LYPD1 se purificaron mediante cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC, por sus siglas en inglés) y se caracterizaron por filtración analítica en gel, espectrometría de masas y electroforesis en gel de poliacrilamida, como se describió anteriormente. Un grupo anti-LYPD1 utilizado en la generación de los TDB LYPD1 fue el del anticuerpo anti-LYPD1 YWO.49.H6, que comprende: (a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos con N.° de ID de SEC.: 272 y (b) un dominio de VL que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 273. Los brazos anti-CD3 probados en la generación de los TDB LYPD1 incluían UCHT1v9, 40G5, SP34, y 38E4v1

Los TDB HER2 específicos se examinaron para la unión de células CD8+ T (unión CD3), así como la actividad, según lo evaluado por ensayos de toxicidad *in vitro* y ensayos de activación de células T.

A. Afinidad de unión

Las afinidades de unión para cada uno de los TDB LYPD1 se examinaron mediante análisis FACS, como se describió anteriormente para los TDB CD20. Brevemente, para ensayos de unión FACS, se incubaron células T CD8+ T con distintas concentraciones de anticuerpos de TDB LYPD1 a 4 °C durante 30 minutos, luego las células se lavaron e incubaron con el segundo anticuerpo (anti-huIgG-PE, BD Bioscience; o anti-huIgG-AlexaFluor647, Southern Biotech) durante otros 15 minutos, antes de que las células se lavaran nuevamente y estuvieran listas para el análisis FACS. La figura 104 muestra los resultados de ensayos de unión FACS *in vitro* de TDB LYPD1. Los estudios de unión mostraron que los TDB LYPD1 que tienen UCHT1v9 o 38E4v1 como su brazo anti-CD3 demostraron una afinidad de unión más elevada para las células efectoras resultantes.

B. Ensayos in vitro sobre la muerte de células OVCAR3.Luc y la activación de células T

Los TDB LYPD1 también se probaron para determinar su capacidad para soportar la eliminación de las células diana OVCAR3 que expresan LYPD1 y la activación del efecto citotóxico de las células T. *La citotoxicidad* in vitro se controló mediante citometría de flujo. Las células dianas se marcaron con CFSE de acuerdo con el protocolo del fabricante (Invitrogen, # C34554). Las células diana marcadas con el éster de succinimidilo de carboxifluoresceína (CFSE) y las células T de CD8+ purificadas de PBMC humanos se mezclaron en una proporción 3:1, con o sin TDB durante 48 horas. Las células se resuspendieron en un volumen igual de PBS + 2% FBS + 1 mM EDTA + yoduro de propidio (PI). El análisis de citometría de flujo se realizó en un FACSCalibur en formato de automatización. El número de células diana vivas se contó mediante la apertura o cierre de las células negativas CFSE+/PI. El porcentaje de citotoxicidad se calculó de la siguiente manera: % de citotoxicidad (número de células diana vivas sin TDB, número de células diana vivas c/TDB) / (número de células diana vivas sin TDB) x 100. Como se representa en la Figura 105, los TDB LYPD1 con UCHT1v9, 38E4v1, o SP34 para su brazo anti-CD3 mostraron una eliminación de células diana OVCAR3.Luc *in vitro* en comparación con el TDB LYPD1 que tiene 40G5 como su brazo anti-CD3.

Cuando se prueba para los ensayos de activación de las células T, la Figura 106 muestra que los TDB LYPD1 con 38E4v1, en menor medida, UCHT1v9 y SP34, para su brazo anti-CD3 eran capaces de inducir fuertemente la actividad de las células T *in vitro*, en comparación con el TDB LYPD1 que tiene 40G5c como su brazo anti-CD3. En estos ensayos, las células diana y las células T CD8+ purificadas se mezclaron en presencia o ausencia de TDB y se analizó la activación de las células T mediante la citometría de flujo. Al final de la incubación, las células se tiñeron con CD8-FITC (BD Bioscience, 555634) CD69-PE (BD Bioscience, 555531) y CD107a-Alexa-Fluor647 (eBioscience, 51-1079). Opcionalmente, después de que la superficie se tiñó con CD8-FITC y CD69-PE, las células se fijaron y se permeabilizaron con una solución de Cytofix/Cytoperm (BD Bioscience, 554722) y se tiñeron de forma intracelular con anti-granzima B-Alexa-Fluor647 (BD Bioscience, 560212). La activación de las células T se evaluó mediante el porcentaje de las células CD8+CD69+ y CD8+CD25+.

Otras modalidades

Si bien la invención antes mencionada se ha descrito con detalle mediante la ilustración y ejemplo a efectos de mayor esclarecimiento, las descripciones y ejemplos no se deben interpretar como limitación del alcance de la invención. Las descripciones de toda la patente y la bibliografía científica citada en la presente descripción se incorporan expresamente en su integridad como referencia.

ANTICUERPOS ANTI-CD3 Y MÉTODOS DE USO

ÁREA DE LA INVENCIÓN

La presente invención se relaciona con los anticuerpos 3 (CD3) de los anti-cúmulos de diferenciación y los métodos para utilizarlos.

ANTECEDENTES

Los trastornos de proliferación celular, como el cáncer, se caracterizan por el crecimiento incontrolado de las subpoblaciones celulares. Son la causa principal de muerte en los países desarrollados y la segunda causa principal de muerte en los países en desarrollo, con más de 12 millones de nuevos casos de cáncer diagnosticados y con 7 millones de muertes por cáncer cada año. El Instituto Nacional del Cáncer estima que más de 500.000 estadounidenses morirán de cáncer en 2013, que representará casi una de cada cuatro muertes en el país. Debido a que la población de la tercera edad ha crecido, la incidencia de cáncer ha aumentado al mismo tiempo, pues la probabilidad de padecer de cáncer es más de dos veces superior luego de los setenta años. Por lo tanto, el cuidado del cáncer representa una carga social significativa y cada vez mayor.

Los enfoques de larga data para tratar el cáncer incluyen la quimioterapia, la radioterapia y la cirugía para extirpar los tumores sólidos. Recientemente, se han desarrollado inmunoterapias basadas en anticuerpos biespecíficos. Esos anticuerpos biespecíficos son capaces de unir simultáneamente los antígenos de la superficie celular con las células citotóxicas y las células cancerosas, con la intención de que la célula citotóxica unida destruya la célula cancerosa unida. Los anticuerpos biespecíficos existentes que se encuentran actualmente bajo ensayo clínico para el tratamiento contra el cáncer se ven limitados por sus vidas medias reducidas o su eficacia variable. Por lo tanto, existe una necesidad insatisfecha en el campo para el desarrollo de anticuerpos biespecíficos efectivos para utilizarlos en el tratamiento contra el cáncer.

RESUMEN

La presente invención se relaciona con los anticuerpos 3 (CD3) de los anti-cúmulos de diferenciación y los métodos para utilizarlos.

En un caso, la invención presenta un anticuerpo anti-CD3, donde el anticuerpo anti-CD3 comprende un dominio de unión que consta de las siguientes seis regiones hipervariables (RHV): (a) una RHV-H1 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 1; (b) una RHV-H2 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 2; (c) una RHV-H3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 3; (d) una RHV-L1 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 4; (e) una RHV-L2 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 5; y (f) una RHV-L3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 6. En algunas representaciones, el dominio de unión comprende (a) un dominio de cadena pesada

variable (VH) que consta de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una identidad de secuencia del 95% con la secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 184; (b) un dominio de cadena liviana variable (VL) que consta de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una identidad de secuencia del 95% con la secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 185; o (c) un dominio de VH como en (a) y un dominio de VL como en (b). En algunas representaciones, el dominio de VH comprende la secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 184. En algunas representaciones, el dominio de VL comprende la secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 185. En algunas representaciones, el dominio de unión comprende (a) un dominio de cadena pesada variable (VH) que consta de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una identidad de secuencia del 95% con la secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 186; (b) un dominio de cadena liviana variable (VL) que consta de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una identidad de secuencia del 95% con la secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 187; o (c) un dominio de VH como en (a) y un dominio de VL como en (b). En algunas representaciones, el dominio de VH comprende la secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 186. En algunas representaciones, el dominio de VL comprende la secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 187.

En otro caso, la invención presenta un anticuerpo anti-CD3, donde el anticuerpo anti-CD3 se une con un epítopo del CD3 que consta de residuos de aminoácidos Glu6 de CD3. En algunos casos, la invención presenta un anticuerpo anti-CD3, donde el epítopo además consta de uno o más residuos de aminoácidos seleccionados del grupo formado por Gln1, Asp2 y Met7 de CD3. En otro caso, la invención presenta un anticuerpo anti-CD3, donde el epítopo consta de residuos de aminoácidos Gln1, Asp2 y Glu6 de CD3. En algunos casos, la invención presenta un anticuerpo anti-CD3, donde el epítopo consta de residuos de aminoácidos Gln1, Asp2, Glu6 y Met7 de CD3. En otro caso, la invención presenta un anticuerpo anti-CD3, donde el epítopo no consta de residuos de aminoácidos Glu5 de CD3. En otro caso más, la invención presenta un anticuerpo anti-CD3, donde el epítopo no consta de residuos de aminoácidos Gly3 y Glu5 de CD3. En algunos casos, la invención presenta un anticuerpo anti-CD3, donde el epítopo consta de residuos de aminoácidos Gln1, Asp2, Glu6 y Met7 de CD3.

En casos relacionados, la invención presenta un anticuerpo anti-CD3 que une dicho epítopo y que es un anticuerpo multiespecífico. En algunas representaciones, el anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo biespecífico. En algunas representaciones, el anticuerpo biespecífico comprende un segundo dominio de unión que se une con una segunda biomolécula, donde la segunda biomolécula es un antígeno de la superficie celular. En algunas representaciones, el antígeno de la superficie celular es un antígeno tumoral. En algunas representaciones, el antígeno tumoral se selecciona de un grupo que consta de CD20; FcRH5 (5 similar al receptor de Fc); HER2; LYPD1; Ly6G6D (antígeno de linfocito 6 complejo, locus G61); Ly6-D, MEGT1); PMEL17 (homólogo de plata; SILV;

D12S53E; PMEL17; (SI); (SIL); ME20; gp100); Ly6E (antígeno de linfocito 6 complejo, locus E; Ly67, RIG-E, SCA-2, TSA-1); CD19; CD33; CD22 (isoforma CD22-B del receptor de la célula B isoform); CD79a (CD79A, CD79a, alfa asociada a la inmunoglobulina; BMPR1B (receptor de proteína morfogenética ósea de tipo IB); CD79b (CD79B, CD79β, 1 Gb (beta asociada a la inmunoglobulina), B29); EDAR (Receptor de la Ectodisplasina A); GFRA1 (GDNF-Ra1); MRP4 (Proteína 4 de Resistencia a Multidrogas); RET; STEAP1 (antígeno epitelial de seis dominios transmembrana de la próstata); TENB2 (proteoglicano transmembranal putativo); E16 (LAT1, SLC7A5); 0772P (CA125, MUC16); MPF (MPF, MSLN, SMR, factor potenciador de megacariocitos, mesotelina); Napi2b (NAPI-2B, NPTIIb, SLC34A2, transportador de soluto familia 34 (fosfato de sodio), miembro 2, transportador 3b de fosfato dependiente del sodio de tipo II); Sema 5b; PSCA hlg (2700050C12Rik, C530008O16Rik, RIKEN cDNA 2700050C12, gen RIKEN cDNA 2700050C12); ETBR (Receptor de la endotelina tipo B); MSG783 (RNF124, proteína hipotética FLJ20315); STEAP2; TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, receptor de potencial transitorio, subfamilia M, miembro 4); CRIPTO (CR, CR1, CRGF, CRIPTO, TDGF1, teratocarcinoma-derivado del factor de crecimiento); CD21 (CR2 (Receptor del complemento 2) o C3DR (C3d/Receptor del virus de Epstein-Barr) o Hs.73792); FcRH2 (IFGP4, IRTA4, SPAP1A (proteína 1a con anclaje de fosfatasa que contiene dominio SH2), SPAP1B, SPAP1C); NCA; MDP; IL20Rα; Brevican; EphB2R; ASLG659; PSCA; GEDA; BAFF-R (receptor del factor activador de la célula B, receptor BLyS 3, BR3); CXCR5 (Receptor 1 del linfoma de Burkitt; HLA-DOB (Subunidad Beta de molécula II de clase MHC); P2X5 (Receptor purinérgico P2X, canal iónico regulado por ligando 5; CD72 (Antígeno de diferenciación de célula B CD72, Lyb-2); LY64 (Antígeno de linfocito 64 (RP105), proteína de membrana de tipo 2 de la familia rica en leucina (LRR)); FcRH1 (Proteína 1 similar al receptor Fc); IRTA2 (Receptor de la superfamilia de inmunoglobulina, translocación asociada 2); TMEFF1; TMEM46 (compuesto homólogo de shisa 2 (Xenopus laevis); SHISA2); LGR5 (rica en leucina-receptor 5 acoplado a proteínas G; GPR49, GPR67); LY6K (antígeno de linfocito 6 complejo, locus K; LY6K; HSJ001348; FLJ35226); GPR19 (receptor acoplado a proteínas G 19; Mm 4787); GPR54 (receptor KISS1; KISS1R; GPR54; HOT7T175; AXOR12); ASPHD1 (dominio aspartato beta-hidroxilasa que contiene 1; LOC253982); Tirosinasa (TYR; OCAIA; OCA1A; tirosinasa; SHEP3); TMEM118 (proteína del dedo anular, transmembrana 2; RNFT2; FLJ14627); GPR172A (receptor acoplado a proteínas G 172A; GPCR41; FLJ11856; D15Ertd747e); GPC3 (Glipicano 3); CLL1 (molécula 1 tipo lectina de Tipo C); B7-H4 (B7x; B7S1); RNF43 (Proteína del dedo anular 43); CD70; CXORF61 (Cromosoma X con marco abierto de lectura 61); HAVCR1; Epirregulina; Amfirregulina; EGFR ; EGFR-L858R; EGFR-L861Q; EGFR-G719A; EGFR-G719S; EGFR-G719C; EGFR-T790M; EGFR-S768I; adipofilina; AIM-2; ALDH1A1; alfa-actinina-4; alfa-fetoproteína; ARTC1; B-RAF; BAGE-1; BCLX (L); proteína de fusión BCR-ABL (b3a2); 8; CD45; Cdc27; CDK4; CDKN2A; CEA; CLPP; COA-1; CPSF; Cw6; ciclina D1; Ciclina-A1; proteína de fusión dek-can; DKK1; DR1; DR13; EFTUD2; Factor de Elongación 2; ENAH (hMena); EpCAM; EphA3; proteína de fusión ETV6-AML1; EZH2; FLT3-ITD;

FN1; G250; MN; CAIX; GAGE-1;2;8; GAGE-3;4;5;6;7; glipicano-3; GnTVf; gp100 / Pmel17; GPNMB; HERV-K-MEL; hsp70-2; IDO1; IGF2B3; IL13Ralf2; Esterasa carboxilo intestinal; K-ras; Calicreína 4; KIF20A; KK-LC-1; KM-HN-1; LAGE-1; LDLR-fucosiltransferasa AS proteína de fusión; Lengsin; M-CSF; MAGE-A1; MAGE-A10; MAGE-A12; MAGE-A2; MAGE-A3; MAGE-A4; MAGE-A6; MAGE-A9; MAGE-C1; MAGE-C2; mamaglobina-A; MART2; MCSP; mdm-2; ME1; Melan-A / MART-1; Meloe; MMP-2; MMP-7; MUC1; MUC5AC; mucina; MUM-1f; MUM-2; MUM-3; Clase de miosina I; N-ras; NA88-A; neo-PAP; NFYC; NY-BR-1; NY-ESO-1/LAGE-2; OA1; OGT; OS-9; p53; PAP; PAX5; PBF; proteína de fusión pml-RARalfa; PRAME; PRDX5; PSMA; PTPRK; RAB38 / NY-MEL-1; RAGE-1; RBAF600; RGS5; RhoC; RNF43; RU2AS; SAGE; secernin 1; SIRT2; SNRPD1; SOX10; Sp17; SSX-2; SSX-4; STEAP1; survivina; proteína de fusión SYT-SSX1 o -SSX2; TAG-1; TAG-2; Telomerasa; TGF-betaRII; TRAG-3; Triosa fosfato isomerasa; TRP-1 / gp75; TRP-2; TRP2-INT2; tirosinasa; VEGF; WT1; XAGE-1b/GAGED2a; y SLC53SLC35D3. En algunas representaciones, el antígeno tumoral se selecciona de un grupo que consta de CD20, FcRH5, HER2, LYPD1, LY6G6D, PMEL17, LY6E, CD19, CD33, CD22, CD79A, CD79B, EDAR, GFRA1, MRP4, RET, Steap1, y TenB2. En las representaciones preferidas, el antígeno tumoral se selecciona de un grupo que consta de CD20, HER2, FcRH5 y LYPD1.

En algunas representaciones, el dominio de unión de cualquiera de los anticuerpos anti CD3 precedentes se une a un polipéptido CD3 humano o a un polipéptido CD3 de macaco cangrejero. En algunas representaciones, el polipéptido CD3 humano o el polipéptido CD3 de macaco cangrejero es un polipéptido CD3ε humano o polipéptido CD3ε de macaco cangrejero, respectivamente. En algunas representaciones, el polipéptido CD3 humano o el polipéptido CD3 de macaco cangrejero es un polipéptido CD3γ humano o polipéptido CD3γ de macaco cangrejero, respectivamente.

En algunas representaciones, cualquiera de los anticuerpos anti CD3 precedentes une el polipéptido CD3ε humano con un Kd de 250 nM o menos. En algunas representaciones, el anticuerpo anti CD3 une el polipéptido CD3ε humano con un Kd de 100 nM o menos. En algunas representaciones, el anticuerpo anti CD3 une el polipéptido CD3ε humano con un Kd de 15 nM o menos. En algunas representaciones, el anticuerpo anti CD3 une el polipéptido CD3ε humano con un Kd de 10 nM o menos. En algunas representaciones, el anticuerpo anti CD3 une el polipéptido CD3ε humano con un Kd de 5 nM o menos.

En algunas presentaciones, cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 anteriores puede comprender una mutación en el lugar de la glicosilación. En algunas representaciones, la mutación en el lugar de la glicosilación es una mutación de sustitución. En algunas representaciones, la mutación de sustitución se produce en el residuo de los aminoácidos N297, L234, L235, y/o D265 (numeración UE). En algunas representaciones, la mutación de sustitución se selecciona del grupo que consta de N297G, N297A, L234A, L235A y D265A. En algunas representaciones, la mutación de sustitución es una mutación de N297G. En algunas representaciones, la mutación en el lugar de la glicosilación reduce la función efectora del anticuerpo anti-CD3. En algunas representaciones, la mutación en el lugar de la glicosilación reduce la función efectora

del anticuerpo anti-CD3. En algunas representaciones, un anticuerpo anti-CD3 consta de una mutación de sustitución en la región Fc que reduce la función efectora.

En algunas representaciones, cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 precedentes pueden ser monoclonales, humanos, humanizados o quiméricos. En algunas representaciones, cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 precedentes puede ser un fragmento de anticuerpos que une el CD3. En algunas representaciones, el fragmento de anticuerpos se selecciona del grupo que consta de los fragmentos Fab, Fab'-SH, Fv, scFv, y $(Fab')_2$. En otras representaciones, el anticuerpo anti-CD3 es un anticuerpo de cuerpo entero. En algunas representaciones, el anticuerpo anti-CD3 es un anticuerpo IgG (por ej., un anticuerpo IgG1, IgG2 o IgG3). En algunas representaciones, el anticuerpo anti-CD3 es un anticuerpo monoespecífico. En algunas representaciones, el anticuerpo anti-CD3 es un anticuerpo captador biespecífico de células T (BITE®).

En algunas representaciones, el anticuerpo anti-CD3 es un anticuerpo multiespecífico. En algunas representaciones, el anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo biespecífico. En algunas representaciones, el anticuerpo biespecífico comprende un segundo dominio de unión que se une con una segunda biomolécula, donde la segunda biomolécula es un antígeno de la superficie celular. En algunas representaciones, el antígeno de la superficie celular es un antígeno tumoral. En algunas representaciones, el antígeno tumoral se selecciona de un grupo que consta de CD20; FcRH5 (5 similar al receptor de Fc); HER2; LYPD1; Ly6G6D (antígeno de linfocito 6 complejo, locus G61); Ly6-D, MEGT1); PMEL17 (homólogo de plata; SILV; D12S53E; PMEL17; (SI); (SIL); ME20; gp100); Ly6E (antígeno de linfocito 6 complejo, locus E; Ly67, RIG-E, SCA-2, TSA-1); CD19; CD33; CD22 (isoforma CD22-B del receptor de la célula B isoform); CD79a (CD79A, CD79a, alfa asociada a la inmunoglobulina; BMPR1B (receptor de proteína morfogenética ósea de tipo IB); CD79b (CD79B, CD79β, 1 Gb (beta asociada a la inmunoglobulina), B29); EDAR (Receptor de la Ectodisplasina A); GFRA1 (GDNF-Ra1); MRP4 (Proteína 4 de Resistencia a Multidrogas); RET; STEAP1 (antígeno epitelial de seis dominios transmembrana de la próstata); TENB2 (proteoglicano transmembranal putativo); E16 (LAT1, SLC7A5); 0772P (CA125, MUC16); MPF (MPF, MSLN, SMR, factor potenciador de megacariocitos, mesotelina); Napi2b (NAPI-2B, NPTIIb, SLC34A2, transportador de soluto familia 34 (fosfato de sodio), miembro 2, transportador 3b de fosfato dependiente del sodio de tipo II); Sema 5b; PSCA hlg (2700050C12Rik, C530008O16Rik, RIKEN cDNA 2700050C12, gen RIKEN cDNA 2700050C12); ETBR (Receptor de la endotelina tipo B); MSG783 (RNF124, proteína hipotética FLJ20315); STEAP2; TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, receptor de potencial transitorio, subfamilia M, miembro 4); CRIPTO (CR, CR1, CRGF, CRIPTO, TDGF1, teratocarcinoma-derivado del factor de crecimiento); CD21 (CR2 (Receptor del complemento 2) o C3DR (C3d/Receptor del virus de Epstein-Barr) o Hs.73792); FcRH2 (IFGP4, IRTA4, SPAP1A (proteína 1a con anclaje de fosfatasa que contiene dominio SH2), SPAP1B, SPAP1C); NCA; MDP; IL20Rα; Brevican; EphB2R; ASLG659; PSCA; GEDA; BAFF-R (receptor del factor activador de la célula B, receptor BLyS 3, BR3); CXCR5 (Receptor 1

del linfoma de Burkitt; HLA-DOB (Subunidad Beta de molécula II de clase MHC); P2X5 (Receptor purinérgico P2X, canal iónico regulado por ligando 5; CD72 (Antígeno de diferenciación de célula B CD72, Lyb-2); LY64 (Antígeno de linfocito 64 (RP105), proteína de membrana de tipo 2 de la familia rica en leucina (LRR)); FcRH1 (Proteína 1 similar al receptor Fc); IRTA2 (Receptor de la superfamilia de inmunoglobulina, translocación asociada 2); TMEFF1; TMEM46 (compuesto homólogo de shisa 2 (Xenopus laevis); SHISA2); LGR5 (rica en leucina-receptor 5 acoplado a proteínas G; GPR49, GPR67); LY6K (antígeno de linfocito 6 complejo, locus K; LY6K; HSJ001348; FLJ35226); GPR19 (receptor acoplado a proteínas G 19; Mm 4787); GPR54 (receptor KISS1; KISS1R; GPR54; HOT7T175; AXOR12); ASPHD1 (dominio aspartato beta-hidroxilasa que contiene 1; LOC253982); Tirosinasa (TYR; OCAIA; OCA1A; tirosinasa; SHEP3); TMEM118 (proteína del dedo anular, transmembrana 2; RNFT2; FLJ14627); GPR172A (receptor acoplado a proteínas G 172A; GPCR41; FLJ11856; D15Ertd747e); GPC3 (Glipicano 3); CLL1 (molécula 1 tipo lectina de Tipo C); B7-H4 (B7x; B7S1); RNF43 (Proteína del dedo anular 43); CD70; CXORF61 (Cromosoma X con marco abierto de lectura 61); HAVCR1; Epirregulina; Amfirregulina; EGFR ; EGFR-L858R; EGFR-L861Q; EGFR-G719A; EGFR-G719S; EGFR-G719C; EGFR-T790M; EGFR-S768I; adipofilina; AIM-2; ALDH1A1; alfa-actinina-4; alfa-fetoproteína; ARTC1; B-RAF; BAGE-1; BCLX (L); proteína de fusión BCR-ABL (b3a2); 8; CD45; Cdc27; CDK4; CDKN2A; CEA; CLPP; COA-1; CPSF; Cw6; ciclina D1; Ciclina-A1; proteína de fusión dek-can; DKK1; DR1; DR13; EFTUD2; Factor de Elongación 2; ENAH (hMena); EpCAM; EphA3; proteína de fusión ETV6-AML1; EZH2; FLT3-ITD; FN1; G250; MN; CAIX; GAGE-1;2;8; GAGE-3;4;5;6;7; glipicano-3; GnTVf; gp100 / Pmel17; GPNMB; HERV-K-MEL; hsp70-2; IDO1; IGF2B3; IL13Ralf2; Esterasa carboxilo intestinal; K-ras; Calicreína 4; KIF20A; KK-LC-1; KM-HN-1; LAGE-1; LDLR-fucosiltransferasa AS proteína de fusión; Lengsin; M-CSF; MAGE-A1; MAGE-A10; MAGE-A12; MAGE-A2; MAGE-A3; MAGE-A4; MAGE-A6; MAGE-A9; MAGE-C1; MAGE-C2; mamaglobina-A; MART2; MCSP; mdm-2; ME1; Melan-A / MART-1; Meloe; MMP-2; MMP-7; MUC1; MUC5AC; mucina; MUM-1f; MUM-2; MUM-3; Clase de miosina I; N-ras; NA88-A; neo-PAP; NFYC; NY-BR-1; NY-ESO-1/LAGE-2; OA1; OGT; OS-9; p53; PAP; PAX5; PBF; proteína de fusión pml-RARalfa; PRAME; PRDX5; PSMA; PTPRK; RAB38 / NY-MEL-1; RAGE-1; RBAF600; RGS5; RhoC; RNF43; RU2AS; SAGE; secernin 1; SIRT2; SNRPD1; SOX10; Sp17; SSX-2; SSX-4; STEAP1; survivina; proteína de fusión SYT-SSX1 o -SSX2; TAG-1; TAG-2; Telomerasa; TGF-betaRII; TRAG-3; Triosa fosfato isomerasa; TRP-1 / gp75; TRP-2; TRP2-INT2; tirosinasa; VEGF; WT1; XAGE-1b/GAGED2a; y SLC35D3. En algunas representaciones, el antígeno tumoral se selecciona de un grupo que consta de CD20, FcRH5, HER2, LYPD1, LY6G6D, PMEL17, LY6E, CD19, CD33, CD22, CD79A, CD79B, EDAR, GFRA1, MRP4, RET, Steap1, y TenB2.

En algunas representaciones, el antígeno tumoral es HER2 y el segundo dominio de unión comprende las siguientes seis RHV: (a) una RHV-H1 que consiste en la secuencia de aminoácidos con N.° de ID de SEC: 169; (b) una RHV-H2 que consiste en una secuencia

de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 170; (c) una RHV-H3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 171; (d) una RHV-L1 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 172; (e) una RHV-L2 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 173; y (f) una RHV-L3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.° de ID de SEC.: 174. En algunas representaciones, el segundo dominio de unión comprende (a) un dominio de VH que consta de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una identidad de secuencia del 95% con la secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 270; (b) un dominio de VL que consta de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una identidad de secuencia del 95% con la secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 271; o (c) un dominio de VH como en (a) y un dominio de VL como en (b). En algunas representaciones, el dominio de VH comprende la secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 270. En algunas representaciones, el dominio de VL comprende la secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 271.

En algunos casos, la invención presenta un anticuerpo anti-CD3, donde el anticuerpo anti-CD3 comprende un segundo dominio de unión que consta de: (a) un dominio de VH que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 270 y (b) un dominio de VL que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 271.

En otro caso, la invención presenta un anticuerpo anti-CD3, donde el anticuerpo anti-CD3 comprende un brazo anti-CD3 que contiene un primer dominio de unión, el cual consta de: (a) un dominio de VH que consiste de una secuencia de aminoácidos con N.° de ID de SEC.: 184 y (b) un dominio de VL que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 185, y un brazo anti-CD20 que comprende un segundo dominio de unión, el cual consta de: (a) un dominio de VH que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 266 y (b) un dominio de VL que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 267.

En otro caso, la invención presenta un anticuerpo anti-CD3, donde el anticuerpo anti-CD3 comprende un brazo anti-CD3 que contiene un primer dominio de unión, el cual consta de: (a) un dominio de VH que consiste de una secuencia de aminoácidos con N.° de ID de SEC.: 184 y (b) un dominio de VL que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 185, y un brazo anti-CD20 que comprende un segundo dominio de unión, el cual consta de: (a) un dominio de VH que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 266 y (b) un dominio de VL que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 267, en el cual el anticuerpo anti-CD3 contiene una mutación por sustitución de N297G.

En otro caso, la invención presenta un anticuerpo anti-CD3, donde el anticuerpo anti-CD3 comprende un brazo anti-CD3 que contiene un primer dominio de unión, el cual consta de: (a) un dominio de VH que consiste de una secuencia de aminoácidos con N.° de ID de SEC.: 184 y (b) un dominio de VL que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 185, y un brazo anti-CD20 que comprende un segundo dominio de unión,

el cual consta de: (a) un dominio de VH que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 266 y (b) un dominio de VL que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 267, donde (a) el brazo anti-CD3 comprende mutaciones por sustitución de T366S, L368A, Y407V y N297G y (b) el brazo anti-CD20 comprende mutaciones por sustitución de T366W y N297G.

En algunas versiones, cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 antes mencionados puede comprender uno o más dominios constantes de cadenas pesadas, donde el o los dominios constantes de cadenas pesadas son seleccionados de un primer dominio CH1 ($CH1_1$), un primer dominio CH2 ($CH2_1$), un primer dominio CH3 ($CH3_1$), un segundo dominio CH1 ($CH1_2$), un segundo dominio CH2 ($_2$) y un segundo dominio CH3 ($CH3_2$). En algunas versiones, al menos uno de los dominios constantes de cadenas pesadas está emparejado con otro dominio constante de cadenas pesadas. En algunas versiones, los dominios $CH3_1$ y $CH3_2$ comprenden una protuberancia o una cavidad, donde la protuberancia o cavidad en el dominio $CH3_1$ puede posicionarse en la cavidad o la protuberancia respectiva del dominio $CH3_2$. En algunas versiones, los dominios $CH3_1$ y $CH3_2$ se encuentran en una interfaz entre las mencionadas protuberancia y cavidad. En algunas versiones, los dominios $CH2_1$ y $CH2_2$ comprenden una protuberancia o una cavidad, donde la protuberancia o cavidad en el dominio $CH2_1$ puede posicionarse en la cavidad o la protuberancia respectiva del dominio $CH2_2$. En algunas versiones, los dominios $CH2_1$ y $CH2_2$ se encuentran en una interfaz entre las mencionadas protuberancia y cavidad.

En algunas versiones, la vida media de cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 antes mencionados puede ser de aproximadamente 7 días.

En algunas versiones, la invención presenta un inmunoconjugado que comprende cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 antes mencionados conjugado a un agente citotóxico. También se proporciona una composición que comprende cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 antes mencionados. En algunas versiones, la composición también comprende un portador, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptado. En algunas versiones, la composición es de carácter farmacéutico. En algunas versiones, la composición también comprende un antagonista de unión al eje PD-1 o un agente clínico adicional. En otro caso, la invención presenta un ácido nucleico aislado que codifica cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 que se revelan en el presente, y que comprende un vector (p. ej. un vector de expresión) para expresar el anticuerpo.

En otro caso, la invención presenta células anfitrionas que comprenden los ácidos nucleicos o vectores antes mencionados. En algunas versiones, la célula anfitriona es una célula mamífera (p. ej. una célula (CHO) del ovario de un hámster chino). En otras versiones, la célula anfitriona es una célula procariota (p. ej. una célula de *E. coli*). También se proporciona un método para producir cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 antes mencionados, cual método implica cultivar las células anfitrionas que producen el anticuerpo anti-CD3 y recuperar el anticuerpo anti-CD3 de la célula anfitriona o el medio de cultivo.

En algunos casos, cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 antes mencionados puede

utilizarse como medicamento. En algunas versiones, cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 puede utilizarse para tratar o dilatar la progresión de un trastorno proliferativo de células o de un trastorno autoinmunológico en un sujeto que requiera tal tratamiento. En algunas versiones, cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 puede utilizarse para mejorar la función inmunitaria de un sujeto que padezca un trastorno proliferativo de células o un trastorno autoinmunológico.

En algunos casos, la invención presenta el uso de cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 antes mencionados para fabricar un medicamento para tratar o dilatar la progresión de un trastorno proliferativo de células o un trastorno autoinmunológico. En algunos casos, la invención presenta el uso de cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 antes mencionados para fabricar un medicamento para mejorar la función inmunitaria de un sujeto que padece un trastorno proliferativo de células o un trastorno autoinmunológico.

Otro aspecto de la invención es un método para tratar o dilatar la progresión de un trastorno proliferativo de células o de un trastorno autoinmunológico en un paciente que requiera tal tratamiento. El método consiste en administrar al sujeto una cantidad efectiva de cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 antes mencionados. En otro caso, la invención presenta un método para mejorar la función inmunológica de un sujeto que padece un trastorno proliferativo de células o un trastorno autoinmunológico. El método consiste en administrar al sujeto cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 antes mencionados. En algunas versiones, el anticuerpo anti-CD3 se une a (a) una molécula CD3 ubicada en una célula efectora inmune Y (b) una segunda molécula biológica ubicada en una célula diana distinta de la célula efectora inmune. En algunas versiones, el anticuerpo anti-CD3 activa la célula efectora inmune luego de unirse a (a) y (b). En algunas versiones, la célula efectora inmune activada puede provocar un efecto citotóxico o un efecto apoptótico en la célula diana. En algunas versiones, el anticuerpo anti-CD3 se administra al sujeto en una dosis de entre 0,01 MG/KG y 10 mg/kg, aproximadamente. En algunas versiones, el anticuerpo anti-CD3 se administra al sujeto en una dosis de entre 0,1 mg/kg y 10 mg/kg, aproximadamente. En algunas versiones, el anticuerpo anti-CD3 se administra al sujeto en una dosis de alrededor de 1 mg/kg. En algunas versiones, el anticuerpo anti-CD3 es administrado por vía subcutánea, intravenosa, intramuscular, tópica, oral, transdérmica o intraperitoneal; por órbita, por implantación, por inhalación o por vía intratecal, intraventricular o intranasal. En algunas versiones, el anticuerpo anti-CD3 se administra por vía subcutánea. En algunas versiones, el anticuerpo anti-CD3 se administra por vía intravenosa.

En algunas versiones, el anticuerpo anti-CD3 comprende un brazo anti-HER2 que contiene una mutación por sustitución de N297G. En algunas versiones, el anticuerpo anti-CD3 comprende un brazo anti-CD3 que contiene una o varias mutaciones por sustitución de T366S, L368A, Y407V o N297G y un brazo anti-HER2 que contiene una o varias mutaciones por sustitución de N297G, N297A, L234A, L235A o D265A. En algunas representaciones, el anticuerpo comprende un brazo anti-CD3 que contiene una

mutación por sustitución de N297G. En algunas representaciones, el anticuerpo anti-CD3 comprende un brazo anti-HER2 que contiene mutacion(es) por sustitución de T366S, L368A, Y407V y/o N297G y un brazo anti-CD3 que contiene mutacion(es) por sustitución de N297G, N297A, L234A, L235A y/o D265A.

En algunas versiones, el método también implica administrar al paciente un glucocorticoide. En algunas versiones, el glucocorticoide es seleccionado de un grupo compuesto por dexametasona, hidrocortisona, cortisona, prednisolona, prednisona, metilprednisolona, triamcinolona, parametasona, betametasona, fludrocortisona y ésteres, sales y complejos de esos compuestos. En algunas versiones, el glucocorticoide es dexametasona. En algunas versiones, el glucocorticoide es un éster, una sal o un complejo de dexametasona farmacéuticamente aceptado.

En algunas versiones, el método también implica administrar rituximab al paciente.

En algunas versiones, el método también implica administrar obinutuzumab al paciente.

En algunas versiones, el método también implica administrar al paciente un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC por sus siglas en inglés).

En cualquiera de los usos o métodos mencionados anteriormente, el trastorno proliferativo de células puede ser cáncer. En algunas versiones, el cáncer es seleccionado del grupo que comprende cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón no microcítico, linfoma no Hodgkin (NHL por sus siglas en inglés), linfoma de células B, leucemia de células B, mieloma múltiple, cáncer renal, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer de cabeza y cuello, melanoma, cáncer de ovario, mesotelioma, gliobastoma, linfoma difuso de células B grandes, linfoma de células semejantes a la célula B activada, linfoma folicular, linfoma de células de manto, leucemia mieloide aguda, leucemia linfoide crónica, linfoma de zona marginal, leucemia linfocítica de célula pequeña, linfoma linfoplasmacítico, macroglobulinemia de Waldenstrom, linfoma del sistema nervioso central, linfoma de Burkitt, linfoma prolinfocítico de células B, linfoma esplénico de zona marginal, leucemia de células vellosas, linfoma o leucemia esplénico, linfoma esplénico difuso de linfocitos pequeños de pulpa roja, variante de leucemia de células vellosas, macroglobulinemia de waldenstrom, enfermedades de cadenas pesadas, enfermedad de cadenas alfa, enfermedad de cadenas gamma, enfermedad de cadenas mu, mieloma de células plasmáticas, plasmocitoma óseo solitario, plasmocitoma extraóseo, linfoma de tejido linfoide asociado a mucosa, linfoma de zona marginal nodal, linfoma de zona marginal nodal pediátrico, linfoma folicular pediátrico, linfoma primario cutáneo de células del centro folicular, linfoma de células grandes B rico en células T/ histiocitos, linfoma primario del sistema nervioso central, linfoma cutáneo primario, linfoma difuso de células B grandes positivo al virus de Epstein-Barr del anciano, linfoma difuso de células grandes asociado con inflamación crónica, granulomatosis linfomatoide, linfoma primario mediastinal de células B grandes, linfoma intravascular de células B grandes, linfoma anaplásico ALK positivo, linfoma plasmablástico, linfoma de células grandes B originado en enfermedad de Castleman asociado a HHV-8, linfoma de efusion primaria: linfoma de células B, inclasificable, con características intermedias entre

linfoma difuso de células B grandes y linfoma de Burkitt, y linfoma de células B, inclasificable, con características intermedias entre linfoma difuso de células B grandes y linfoma clásico de Hodgkin. En algunas versiones, el cáncer preferente es el linfoma de células B semejantes a las del centro germinal (GCB), linfoma de células semejantes a la célula B activada (ABC), linfoma folicular (FL), linfoma de células de manto (MCL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfoide crónica (CLL), linfoma de zona marginal (MZL), leucemia linfocítica de célula pequeña (SLL), linfoma linfoplasmacítico (LL), macroglobulinemia de Waldenstrom (WM), linfoma del sistema nervioso central (CNSL) o linfoma de Burkitt (BL).

En cualquiera de los usos o métodos mencionados anteriormente, el trastorno autoinmunológico puede ser seleccionado de un grupo compuesto por artritis reumatoide, artritis juvenil reumatoide, lupus sistémico eritomatoso (SLE), granulomatosis de Wegener, enfermedad inflamatoria intestinal, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), púrpura trombocitopénica trombótica (TTP), trombocitopenia autoinmune, esclerosis múltiple, psoriasis, nefropatía por IgA, polineuropatía asociada a IgM, miastenia gravis, vasculitis, diabetes mellitus, síndrome de Raynaud, síndrome de Sjögren, glomerulonefritis, neuromielitis óptica (NMO) y neuropatía igG.

En otro caso, la invención presenta un kit que contiene: (a) una composición que consta de cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 antes mencionados y (b) un paquete inserto que contiene instrucciones para administrar la composición a un paciente para tratar o dilatar la progresión de un trastorno proliferativo de células.

En cualquiera de los usos o métodos antes mencionados, el paciente puede ser un humano.

Descripción breve de los dibujos

La FIGURA 1 muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena simple de CD3EG humano con una secuencia enlace 26mero utilizado en experimentos de mapeo de epítopos de CD3 (N.° de ID de Sec.: 282).

La FIGURA 2A es una tabla que resume la caracterización de clones hibridoma selectos. La tabla resume los resultados del método ELISA de unión CD3 utilizando CD3ε^{1-27}-Fc de humano y de macaco; ensayos de unión de FACS utilizando células T jurkat humanas, PBMCs humanas y de macacos; experimentos de activación de células T utilizando análisis FACS, y experimentos de determinación de isotipos.

La FIGURA 2B es una tabla que resume las afinidades de unión (valores Kd) de clones hibridoma seleccionados para antígenos humanos CD3εγ comerciales.

La FIGURA 3A es una tabla que resume la caracterización de hibridomas selectos. La tabla resume los resultados del método ELISA de unión CD3 utilizando CD3ε^{1-27}-Fc de humano y de macaco; ensayos de unión de FACS utilizando células T jurkat humanas, PBMCs humanas y de macacos; experimentos de activación de células T utilizando

análisis FACS, y experimentos de determinación de isoptipos.

Las FIGURAS 3B y 3C son tablas que reducen las afinidades de unión (valores Kd) de clones hibridoma seleccionados.

La FIGURA 4A muestra las secuencias de aminoácidos de dominios variables de cadena ligera de los anticuerpos anti-CD3. Las secuencias HVR están delimitadas para las casillas designadas para cada anticuerpo.

La FIGURA 4B muestra las secuencias de aminoácidos de dominios variables de cadena ligera de los anticuerpos anti-CD3.

La FIGURA 4C muestra las secuencias de aminoácidos de dominios variables de cadena pesada de los anticuerpos anti-CD3.

La FIGURA 5A muestra las secuencias de aminoácidos de dominios variables de cadena ligera de los anticuerpos anti-CD3.

La FIGURA 5B muestra las secuencias de aminoácidos de dominios variables de cadena pesada de los anticuerpos anti-CD3.

La FIGURA 6A muestra las secuencias de aminoácidos de dominios variables de cadena ligera de los anticuerpos anti-CD3 21A9 y Rab17.

La FIGURA 6B muestra las secuencias de aminoácidos de dominios variables de cadena pesada de los anticuerpos anti-CD3 21A9 y Rab17.

La FIGURA 7 es una alineación de secuencias de dominios variables de cadena ligera (parte superior) y dominios variables de cadena pesada (parte inferior) de secuencias de aminoácidos de anticuerpos anti-CD3 que muestran la secuencia de consenso, 40G5c, derivada de los anticuerpos clónicos relacionados.

La FIGURA 8A es una alineación de secuencias de dominios variables de cadena ligera (parte superior) y dominios variables de cadena pesada (parte inferior) de secuencias de aminoácidos de anticuerpos anti-CD3 13A3 y una variante humanizada (hu13A3).

La FIGURA 8B es una alineación de secuencias de dominios variables de cadena ligera (parte superior) y dominios variables de cadena pesada (parte inferior) de secuencias de aminoácidos de anticuerpos anti-CD3 30A1 y una variante humanizada (hu30A1).

La FIGURA 8C es una alineación de secuencias de dominios variables de cadena ligera (parte superior) y dominios variables de cadena pesada (parte inferior) de secuencias de aminoácidos de anticuerpos anti-CD3 41D9a y una variante humanizada (hu41D9a).

La FIGURA 8D es una alineación de secuencias de dominios variables de cadena ligera (parte superior) y dominios variables de cadena pesada (parte inferior) de secuencias de aminoácidos de anticuerpos anti-CD3 SP34 y una variante humanizada (huSP34).

La FIGURA 8E es una alineación de secuencias de dominios variables de cadena ligera (parte superior) y dominios variables de cadena pesada (parte inferior) de secuencias de aminoácidos de anticuerpos anti-CD3 38E4 y una variante humanizada (hu38E4).

La FIGURA 8F es una alineación de secuencias de dominios variables de cadena ligera (parte superior) y dominios variables de cadena pesada (parte inferior) de secuencias de aminoácidos de anticuerpos anti-CD3 40G5 y una variante humanizada (hu40G5).

La FIGURA 9A es una tabla que resume las variantes humanizadas seleccionadas del

anticuerpo anti-CD3 13A3 y sus afinidades de unión, determinadas mediante el uso de CD3ε comercial (Creative Biomart, Shirley, NY; N.° de catálogo CD3E-2194H).

La FIGURA 9B es una tabla que resume las variantes humanizadas seleccionadas del anticuerpo anti-CD3 30A1 y sus afinidades de unión, determinadas mediante el uso de CD3ε comercial (Creative Biomart, Shirley, NY; N.° de catálogo CD3E-2194H).

La FIGURA 9C es una tabla que resume las variantes humanizadas seleccionadas del anticuerpo anti-CD3 41D9a y sus afinidades de unión, determinadas mediante el uso de CD3ε comercial (Creative Biomart, Shirley, NY; N.° de catálogo CD3E-2194H).

La FIGURA 9D es una tabla que resume las variantes humanizadas del anticuerpo anti-CD3 SP34 y sus afinidades de unión, determinadas mediante el uso de CD3ε comercial (Creative Biomart, Shirley, NY; N.° de catálogo CD3E-2194H).

La FIGURA 9E es una tabla que resume las variantes humanizadas seleccionadas del anticuerpo anti-CD3 38E4 y sus afinidades de unión, determinadas mediante el uso de CD3ε comercial (Creative Biomart, Shirley, NY; N.° de catálogo CD3E-2194H).

La FIGURA 9F es una tabla que resume las variantes humanizadas seleccionadas del anticuerpo anti-CD3 40G5c y sus afinidades de unión, determinadas mediante el uso de CD3ε comercial (Creative Biomart, Shirley, NY; N.° de catálogo CD3E-2194H).

La FIGURA 10 es una tabla que resume la afinidad de unión de los anticuerpos anti-CD3 humanizados para varios antígenos CD3ε.

La FIGURA 11 es una tabla que resume la afinidad de los anticuerpos anti-CD3 humanizados 38E4v1 a 38E4v9 y 40G5C, según mediciones Biacore con CD3εγ humano en chip y anticuerpos anti-CD3 en flujo continuo.

La FIGURA 12A es una tabla que resume las afinidades de unión relativas para mutaciones de alanina, serina, treonina o glutamato de los anticuerpos anti-CD3 38E4v1humanizados con una sola mutación en HVR-L3 o en HV3-H3, en comparación con 38E4v1 utilizando análisis kinético Biacore de siglo único o el convencional de ciclo múltiple.

La FIGURA 12B muestra las secuencias de aminoácidos HVR-L3 (parte superior) y HVR-H3 (parte inferior) del anticuerpo anti-CD3 humanizado 38E4v1.

La FIGURA 13A consiste en una serie de gráficos que muestran la unión relativa del anticuerpo anti-CD3 señalado con las variantes de alanina de $CD3\varepsilon^{1-27}$-Fc.

La FIGURA 13B es un gráfico que muestra la fracción relativa de mutantes fagémidos por barrido de alanina unidos a anticuerpos anti-CD3 38E4.v1, 40G5c y SP34.v52, en comparación con la unión de fago CD3εγ de tipo salvaje.

La FIGURA 13C consiste en una serie de gráficos que muestran la relativa afinidad de los anticuerpos anti-CD3 38E4.v1, 40G5c y SP34.v52 con mutantes fagémidos por barrido de alanina CD3εγ seleccionados como función de la concentración de fago.

La FIGURA 13D consiste en una serie de tablas que muestran las afinidades de unión relativas de los anticuerpos anti-CD3 SP34.v52 y 38E4v1 con mutantes CD3εγ por barrido de alanina, según las mediciones Biacore. NB = Unión no detectable.

La FIGURA 14A muestra la secuencia del polipéptido CD3ε 16mero utilizado en pruebas

de cocristalización con 38E4.v1 Fab.

Las FIGURAS 14B A 14F consisten en una serie de representaciones de la estructura cristalina que muestran diferentes panoramas respecto del complejo péptido hu38E4.v1 Fab/CD3ε.

La FIGURA 14G es una alineación de secuencias de dominios variables de cadena ligera (parte superior) y dominios variables de cadena pesada (parte inferior) de secuencias de aminoácidos de anticuerpos anti-CD3 hu40G5c y hu38E4.v1, con residuos de cada anticuerpo que son importantes para unir CD3 (residuos de contacto) en la alineación. Dichos residuos se encuentran dentro de 5 Å del péptido CD3, conforme se determinó por medio de análisis cristalográficos. Δ denota posiciones de vernier (como referencia consultar, p. ej. Foote and Winter. *JMB.* 224: 487, 1992); * denota intracciones FW-HVR (como referencia consultar, p. ej., Padlan et al. *Mol. Immunol*. 31: 169, 1994); * denota intracciones VH-VL (como referencia consultar, p. ej., Padlan et al. *Mol. Immunol*. 31: 169, 1994).

La FIGURA 14H es una representación de la estructura de cristal del polipéptido CD3ε unido por hu38E4.v1 Fab. Todos los residuos de contacto antígenos se muestran en amarillo. Todos los residuos de contacto son iguales entre hu38E4.v1 y hu40G5, excepto que G96 (marcado en naranja) es S96 en hu40G5.

Las FIGURAS 14I y 14J son representaciones de diagramas de Richardson de la estructura de cristal de hu38E4.v1 Fab y SP34v52 Fab, respectivamente, en la misma orientación, superpuestas con la región VL con un RMS = 2,24.

La FIGURA 14K es un modelo de relleno que representa el hu38E4.v1 Fab complejado con el péptido CD3ε N-terminal unido en la grieta entre las cadenas pesadas (cian) y ligeras (violeta).

La FIGURA 14L es un modelo de relleno que representa el SP34v52 con el péptido CD3ε N-terminal, superpuesto en la misma orientación que en el complejo CD3ε/hu38E4.v1 Fab descripto en la Figura 14K. Los residuos R50 Y R52 (en naranja) de HVR-H2 de SP34v52 Fab son importantes para la unión de CD3. Los choques claros del péptido CD3 con SP34v52 Fab se indican mediante flechas.

La FIGURA 14M es una representación de la estructura de cristal de hu38E4.v1 complejado con el péptido N-terminal de CD3εγ e ilustra las principales interacciones intermoleculares que intervienen en el primer residuo piroglutamina y el sexto residuo (E6) en CD3εγ. Las potenciales uniones de hidrógeno se muestran como líneas discontinuas.

La FIGURA 14N es un modelo de relleno que representa el hu38E4.v1 Fab complejado con el péptido CD3εγ N-terminal unido en la grieta entre las cadenas pesadas (cian) y ligeras (violeta). El quinto residuo (E5), como se ilustra, apunta al lado contrario del sitio interactivo que contiene el secto residuo (E6) del complejo péptido CD3εγ N-terminal y Fab.

La FIGURA 15 describe una generalización esquemática de la formación del anticuerpo TDB. El TDB particular que se describe se muestra como un TDB en toda su extensión en

formato botón en ojal, que puede tener una mutación por glicosilación si es producido por una célula eucariota (p. ej. una célula CHO). En un formato alternativo, es posible que el botón esté presente en el brazo anti-CD3, y es posible que el ojal esté presente en el brazo del antígeno anti-tumoral. También es posible que este formato posea una mutación por glicosilación, si se produjera por una célula eucariota (p. ej. una célula CHO).

La FIGURA 16 consta de gráficos que muestran los resultados FACS de ensayos de unión *in vitro* de distintos TDBs CD3/CD20 con diferentes combinaciones de brazos anti-CD3 de series UCHT1 y brazos anti-CD20 de series 2H7. A la izquierda, unión de línea celular Bjab (unión CD20). A la derecha, unión con células Jurkat (unión CD3).

La FIGURA 17 consta de un conjunto de tablas que resumen las afinidades de unión monovalentes (parte superior) y bivalentes como valores Kd para varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones brazos anti-CD3 de series UCHT1 y brazos anti-CD20 de series 2H7.

La FIGURA 18 consta de un gráfico que muestra los resultados de los ensayos de FACS de unión de células Jurkat *in vitro* (unión CD3) de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16.

La FIGURA 19 consta de un gráfico que muestra los resultados de los ensayos de FACS de unión de células Jurkat *in vitro* (unión CD3) de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16.

La FIGURA 20 consta de un gráfico que muestra los resultados de los ensayos de FACS de unión de células Bjab *in vitro* (unión CD20) de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16.

Las FIGURAS 21A y 21B constan de gráficos que muestran los resultados de los ensayos de FACS de unión de células Jurkat *in vitro* (unión CD3) de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16.

La FIGURA 21C es una tabla que resume la CE50 (µg/ml) para cada TDB CD3/CD20 probado en las Figuras 21A y 21B.

Las FIGURAS 22A y 22B constan de gráficos que muestran los resultados de los ensayos de FACS de unión de células Bjab *in vitro* (unión CD20) de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16.

La FIGURA 23 consta de un gráfico que muestra los resultados de los ensayos de FACS de unión de células Jurkat *in vitro* (unión CD3) de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16.

La FIGURA 24 es una tabla que resume las afinidades de unión de varios TDBs y Fabs CD3/CD20, según las mediciones realizadas mediante análisis Biacore con CD3εγ humano en chip y TDB o Fab CD3/CD20 en flujo constante.

La FIGURA 25A es un gráfico que muestra el porcentaje de activación de células T, según las mediciones de expresión de superficie de CD69 y CD25, luego de 24 de incubación de TDBs CD3/CD20 específicos (serie 2H7) con 20.000 células Bjab y células hu CD8+ T purificadas 5 veces.

La FIGURA 25B es un gráfico que muestra el porcentaje de destrucción de Bjab relativo al control sin tratamiento TDB, luego de 24 horas de incubación de TDBs CD3/CD20 específicos (serie 2H7) con 20.000 células Bjab y células hu CD8+ T purificadas 5 veces, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 26A es un gráfico que muestra el porcentaje de activación de células T, según las mediciones de expresión de superficie de CD69 y CD25, luego de 24 horas de incubación de TDBs CD3/CD20 específicos (serie 2H7) con 200.000 células PBMC humanas por pozo.

La FIGURA 26B es un gráfico que muestra el porcentaje de eliminación de células B endógenas relativo al control sin tratamiento TDB, luego de 24 horas de incubación de TDBs CD3/CD20 específicos (serie 2H7) con 200.000 células PBMC humanas por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 27A es un gráfico que muestra el porcentaje de activación de células T, según las mediciones de expresión de superficie de CD69 y CD25, luego de 24 horas de incubación de TDBs CD3/CD20 específicos (serie UCHT1) con 20.000 células Bjab y células hu CD8+ T purificadas 5 veces.

La FIGURA 27B es un gráfico que muestra el porcentaje de destrucción de Bjab relativo al control sin tratamiento TDB, luego de 24 horas de incubación de TDBs CD3/CD20 específicos (serie UCHT1) con 20.000 células Bjab y células hu CD8+ T purificadas 5 veces, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 28A es un gráfico que muestra el porcentaje de activación de células T, según las mediciones de expresión de superficie de CD69 y CD25, luego de 24 horas de incubación de TDBs CD3/CD20 específicos (serie UCHT1) con 200.000 células PBMC humanas por pozo.

La FIGURA 28B es un gráfico que muestra el porcentaje de eliminación de células B endógenas relativo al control sin tratamiento TDB, luego de 24 horas de incubación de TDBs CD3/CD20 específicos (serie UCHT1) con 200.000 células PBMC humanas por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 29A es un gráfico que muestra el porcentaje de eliminación de células B endógenas relativo al control sin tratamiento TDB, luego de 24 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #3) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 29B es un gráfico que muestra el porcentaje de eliminación de células B endógenas, según las mediciones de expresión de superficie de CD69 y CD25, luego de 24 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2h7V16, con 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #3) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 30A es un gráfico que muestra el porcentaje de eliminación de células B endógenas relativo al control sin tratamiento TDB, luego de 24 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo

anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #4) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 30B es un gráfico que muestra el porcentaje de eliminación de células B endógenas, según las mediciones de expresión de superficie de CD69 y CD25, luego de 24 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #4) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 31A es un gráfico que muestra el porcentaje de eliminación de células B endógenas relativo al control sin tratamiento TDB, luego de 24 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #2) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 31B es un gráfico que muestra el porcentaje de activación de células T, según las mediciones de expresión de superficie de CD69 y CD25, luego de 24 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC de macaco (aisladas del Donante #2) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 32A es un gráfico que muestra el porcentaje de eliminación de células B endógenas relativo al control sin tratamiento TDB, luego de 24 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC de macaco (aisladas del Donante #3) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 32B es un gráfico que muestra el porcentaje de activación de células T, según las mediciones de expresión de superficie de CD69 y CD25, luego de 24 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC de macaco (aisladas del Donante #3) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 33A es un gráfico que muestra el porcentaje de destrucción de Bjab relativo al control sin tratamiento TDB, luego de 24 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC de macaco por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 33B es un gráfico que muestra el porcentaje de activación de células T, según las mediciones de expresión de superficie de CD69 y CD25, luego de 24 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC de macaco por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 34A es un gráfico que muestra el porcentaje de eliminación de células B endógenas relativo al control sin tratamiento TDB, luego de 24 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #2) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 34B es un gráfico que muestra el porcentaje de activación de células T, según las mediciones de expresión de superficie de CD69 y CD25, luego de 24 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #2) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 35A es un gráfico que muestra el porcentaje de eliminación de células B endógenas relativo al control sin tratamiento TDB, luego de 24 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #3) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 35B es un gráfico que muestra el porcentaje de activación de células T, según las mediciones de expresión de superficie de CD69 y CD25, luego de 24 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #3) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 36A es un gráfico que muestra el porcentaje de eliminación de células B endógenas relativo al control sin tratamiento TDB, luego de 24 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #4) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 36B es un gráfico que muestra el porcentaje de activación de células T, según las mediciones de expresión de superficie de CD69 y CD25, luego de 24 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #4) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

Las FIGURAS 37A y 37B son gráficos que muestran el porcentaje de activación de células T, según las mediciones de expresión de superficie de CD69 y CD25, luego de 24 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #1) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 37C es una tabla que resume la activación CE50 (ng/ml) de células CD8+ T para cada TDB CD3/CD20 probado en las Figuras 37A y 37B.

Las FIGURAS 38A y 38B son gráficos que muestran el porcentaje de eliminación de células B endógenas relativo al control sin tratamiento TDB, luego de 24 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #1) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 38C es una tabla que resume la eliminación CE50 (ng/ml) de células B endógenas para cada TDB CD3/CD20 probado en las Figuras 38A y 38B.

Las FIGURAS 39A y 39B son gráficos que muestran el porcentaje de activación de células T, según las mediciones de expresión de superficie de CD69 y CD25, luego de 48 horas de

incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #1) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 39C es una tabla que resume la activación CE50 (ng/ml) de células CD8+ T para cada TDB CD3/CD20 probado en las Figuras 39A y 39B.

Las FIGURAS 40A y 40B son gráficos que muestran el porcentaje de eliminación de células B endógenas relativo al control sin tratamiento TDB, luego de 48 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #1) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 40C es una tabla que resume la eliminación CE50 (ng/ml) de células B endógenas para cada TDB CD3/CD20 probado en las Figuras 40A y 40B.

Las FIGURAS 41A y 41B son gráficos que muestran el porcentaje de activación de células T, según las mediciones de expresión de superficie de CD69 y CD25, luego de 24 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #2) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 41C es una tabla que resume la activación CE50 (ng/ml) de células CD8+ T para cada TDB CD3/CD20 probado en las Figuras 41A y 41B.

Las FIGURAS 42A y 42B son gráficos que muestran el porcentaje de eliminación de células B endógenas relativo al control sin tratamiento TDB, luego de 24 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #2) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 42C es una tabla que resume la eliminación CE50 (ng/ml) de células B endógenas para cada TDB CD3/CD20 probado en las Figuras 42A y 42B.

Las FIGURAS 43A y 43B son gráficos que muestran el porcentaje de activación de células T, según las mediciones de expresión de superficie de CD69 y CD25, luego de 48 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #2) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 43C es una tabla que resume la activación CE50 (ng/ml) de células CD8+ T para cada TDB CD3/CD20 probado en las Figuras 43A y 43B.

Las FIGURAS 44A y 44B son gráficos que muestran el porcentaje de eliminación de células B endógenas relativo al control sin tratamiento TDB, luego de 48 horas de incubación de varios TDBs CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #2) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 44C es una tabla que resume la eliminación CE50 (ng/ml) de células B endógenas para cada TDB CD3/CD20 probado en las Figuras 44A y 44B.

La FIGURA 45A es un gráfico que muestra que ciertos TDB CD3/CD20, como por ejemplo

uno que tiene un brazo anti-CD20 de 2H7v16 y un brazo anti-CD3 de 72H6, no presentan potencia *in vitro*, conforme a los ensayos de destrucción de Bjab.

Las FIGURA 45B y 45C son gráficos que muestran que ciertos TDB CD3/CD20, como por ejemplo uno que tiene un brazo anti-CD20 de 2H7v16 y un brazo anti-CD3 de 72H6, no presentan potencia *in vitro*, conforme a los ensayos de eliminación de células B endógenas (B) y a los ensayos de activación de células T (C).

La FIGURA 46A es un gráfico que muestra que ciertos TDB CD3/CD20, como por ejemplo uno que tiene un brazo anti-CD20 de 2H7v16 y un brazo anti-CD3 de 13A3, no presentan baja potencia *in vitro*, conforme a los ensayos de destrucción de Bjab.

La FIGURA 46B es un gráfico que muestra que ciertos TDB CD3/CD20, como por ejemplo uno que tiene un brazo anti-CD20 de 2H7v16 y un brazo anti-CD3 de 30A1, presentan baja potencia *in vitro*, conforme a los ensayos de destrucción de Bjab.

La FIGURA 46C es un gráfico que muestra que ciertos TDB CD3/CD20, como por ejemplo uno que tiene un brazo anti-CD20 de 2H7v16 y un brazo anti-CD3 de 41D9a, presentan baja potencia *in vitro*, conforme a los ensayos de destrucción de Bjab. Se muestran los valores de destrucción CE50 (ng/ml) de Bjab para cada TDB CD3/CD20 probado.

La FIGURA 46D es un gráfico que muestra que ciertos TDB CD3/CD20, como por ejemplo uno que tiene un brazo anti-CD20 de 2H7v16 y un brazo anti-CD3 de 41D9a, presentan baja potencia *in vitro*, conforme a los ensayos de eliminación de células B endógenas. Se muestran los valores de eliminación CE50 (ng/ml) de células B endógenas para cada TDB CD3/CD20 probado.

La FIGURA 46E es un gráfico que muestra que ciertos TDB CD3/CD20, como por ejemplo uno que tiene un brazo anti-CD20 de 2H7v16 y un brazo anti-CD3 de 41D9a, presentan baja potencia *in vitro*, conforme a los ensayos de activación de células T.

La FIGURA 47A es un gráfico que muestra que ciertos TDB CD3/CD20, como por ejemplo aquellos que tienen un brazo anti-CD20 de 2H7v16 y un brazo anti-CD3 de UCHT1v9, 21A9 y 40G5c, presentan gran potencia *in vitro*, conforme a los ensayos de eliminación de células B endógenas que utilizan 200.000 células PBMC (aisladas del Donante #1) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 47B es un gráfico que muestra que ciertos TDB CD3/CD20, como por ejemplo aquellos que tienen un brazo anti-CD20 de 2H7v16 y un brazo anti-CD3 de UCHT1v9, 21A9 y 40G5c, presentan gran potencia *in vitro*, conforme a los ensayos de activación de células T que utilizan 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #1) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 48A es un gráfico que muestra que ciertos TDB CD3/CD20, como por ejemplo aquellos que tienen un brazo anti-CD20 de 2H7v16 y un brazo anti-CD3 de UCHT1v9, 21A9 y 40G5c, presentan gran potencia *in vitro*, conforme a los ensayos de eliminación de células B endógenas que utilizan 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #2) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 48B es un gráfico que muestra que ciertos TDB CD3/CD20, como por ejemplo aquellos que tienen un brazo anti-CD20 de 2H7v16 y un brazo anti-CD3 de UCHT1v9,

21A9 y 40G5c, presentan gran potencia *in vitro*, conforme a los ensayos de activación de células T que utilizan 200.000 células PBMC humanas (aisladas del Donante #2) por pozo, según las mediciones del análisis FACS.

La FIGURA 49 es una tabla que resume las potencias *in vitro* para distintos TDB CD3/CD20 con distintas combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16.

La FIGURA 50 muestra los dominios variables de cadena ligera (parte superior) y dominios variables de cadena pesada (parte inferior) de secuencias de aminoácidos de anticuerpos anti-CD20 2H7.v16.

La FIGURA 51 muestra los dominios variables de cadena ligera (parte superior) y dominios variables de cadena pesada (parte inferior) de secuencias de aminoácidos de anticuerpos anti-CD3 hu40G5c.

Las IMÁGENES 52A y 52B muestran que los TDB CD3/CD20 (40G5c/2H7v16) purificados no tienen una formación perceptible de agregados según lo determinado por la cromatografía de exclusión de tamaños (SEC) (A) y ninguna formación de homodímeros perceptibles (es decir, formación de anticuerpos CD3/CD3 o CD20/CD20) según lo evaluado por la espectometría de masas.

La FIGURA 53A es un gráfico que muestra la farmacocinética de las concentraciones séricas de los TDB CD3/CD20 en dosis variables en ratas Sprague Dawley (SD) a través del tiempo (en días), según la evaluación de farmacocinética genérica de inmunoglobulina (GRIP) o un ensayo específico.

LA FIGURA 53B es una tabla que resume los valores del margen cuantificado (ml/día/kg) de los anticuerpos TDB CD3/CD20 probados en cada dosis probada en la Figura 53A.

La FIGURA 54A es un gráfico que muestra que la sección F $(ab')_2$ de TDB CD20 retuvo la misma potencia que el TDB CD20 IgG de longitud completa en la destrucción de células B (muerte Bjab) *in vitro*. 20.000 células Bjab y 200.000 PBMC aislados de donantes sanos fueron incubados con varias concentraciones de TDB CD20 de longitud completa o TDB CD20 F (ab')2 durante 24 horas.

La FIGURA 54B es un gráfico que muestra que la actividad de la destrucción celular B de TDB CD20 es dependiente de células T, dado que no se detectó una matanza de células B con PBMC agotados de células T CD3+. 20.000 células Bjab y 200.000 PBMC aislados de donantes sanos o 200.000 PBMC agotados de células T CD3+ fueron incubadas con varias concentraciones de TDB CD20 durante 24 horas.

LA FIGURA 54C es un gráfico que muestra que la destrucción de células B comparable se puede lograr ya sea con células T CD4+ o CD8+ como efectores. 20.000 células Bjab y 100.000 células T CD8+ purificadas o células T CD4+ se incubaron con diversas concentraciones de TDB CD20 durante 24 horas. La destrucción celular y la activación de células marcadas como T CD69+CD25+ se midieron y calcularon como se describe a continuación.

La FIGURA 54D es un gráfico que muestra que TDB CD20 es capaz de activar células T CD4+ y CD8+. 20.000 células Bjab y 100.000 células T CD8+ purificadas o células T CD4+

se incubaron con diversas concentraciones de TDB CD20 durante 24 horas. La destrucción celular y la activación de células marcadas como T CD69+CD25+ se midieron y calcularon como se describe a continuación.

La FIGURA 54E es un gráfico que muestra que la sobrerregulación de granzima es más frecuente dentro de las células T CD8+ tras la adición de TDB CD20. 20.000 células Bjab y 100.000 células T CD8+ purificadas o células T CD4+ se incubaron con diversas concentraciones de TDB CD20 durante 24 horas. La inducción de la granzima B también se detectó por medio de FACS.

La FIGURA 54F es un gráfico que muestra que un mayor nivel de liberación de perforina está asociado con las células T CD8+ tras la adición de TDB CD20. 20.000 células Bjab y 100.000 células T CD8+ purificadas o células T CD4+ se incubaron con diversas concentraciones de TDB CD20 durante 24 horas. La concentración de perforina en los medios se midió con ELISA.

La FIGURA 55 es una serie de gráficos de citometría de flujo que muestran que las células T activadas son capaces de proliferar en la presencia de células TDB CD20 y Bjab.

La FIGURA 56A es una serie de gráficos que muestran las curvas de destrucción de células B con respuesta a dosis de líneas celulares de tumores/linfomas 8 B (izquierda) y los niveles de expresión de CD20 para líneas de células B dadas con un control de isotipo en gris, medido por FACS. Las células B se cultivaron en medios RPMI 1640 suplementados con FBS al 10 %. Para el ensayo de destrucción, 20.000 células B se incubaron con 200.000 PBMC aisladas de donantes saludables con varias concentraciones de TDB CD20 durante 24 horas.

La FIGURA 56B es un gráfico que muestra una amplia gama en la expresión media de CD20 en las líneas celulares 8 B probadas en la Figura 56A. Las células T CD4+ o T CD8+ purificadas a partir de sangre entera de donantes sanos y etiquetadas con CFSE se incubaron solas y únicamente con Bjab, con TDB CD20 solamente o con Bjab y TDB CD20 durante 24 horas primero y, a continuación, se lavaron las células y se pusieron en medios frescos durante otras 48 horas. La intensidad CFSE de las células T se detectó por FACS, al mostrar la proliferación de las células T sólo en presencia de Bjab y TDB CD20.

La FIGURA 56C es un conjunto de gráficos que muestran que TDB CD20 es potente en destruir todas las 8 líneas de una manera que depende de la dosis, con valores de EC50 de la destrucción de células B (ng/ml) (superior) y el porcentaje de destrucción de células B (parte inferior) representada como una función de la expresión de CD20 sobre la célula diana B.

La FIGURA 56D es un gráfico que muestra que TDB dirigidas a 5 antígenos de células B diferentes son comparables en la mediación de la destrucción de células T de las células Bjab. Las células B se cultivaron en medios RPMI 1640 suplementados con FBS al 10 %. Para el ensayo de destrucción, se incubaron 20.000 células con 100.000 células T CD8+ purificadas a partir de un donante sano con TDB CD20 (TDB A: 2H7v16/UCHT1v9) o una TDB orientada a un antígeno diferente de células B (es decir, TDB B-E, cada una dirigida a un antígeno de células B diferente) en una concentración de 1000 ng/ml durante 24

horas.

La FIGURA 56E es un gráfico que muestra la extensión de destrucción de células B para líneas de células tumorales de leucemia/linfomas 10 B. Las células B se cultivaron en medios RPMI 1640 suplementados con FBS al 10 %. Para el ensayo de destrucción, se incubaron 20.000 células B con 100.000 células T CD8+ purificadas de un donante sano con TDB CD20 de 1000 ng/ml (2H7v16/UCHT1v9) durante 24 horas.

La FIGURA 56F es un gráfico que muestra las curvas de destrucción de respuesta a la dosis para 8 donantes aleatorios.

La FIGURA 56G es un gráfico del resumen del trazado para EC50 (izquierda) y el alcance de la destrucción de células B (derecha) con anticuerpos de 1000 ng/ml en un ensayo de 24 horas para 30 donantes.

La FIGURA 56H es un conjunto de gráficos que muestran que el grado de destrucción de células B en 24 horas por TDB CD20 es muy comparable o mayor que la destrucción de células B por scFv CD19. Para la eliminación de células B autólogas, 200.000 PBMC aisladas de donantes sanos fueron incubadas durante 24 horas con TDB CD20 en la concentración indicada. La muerte celular notificada se calculó como se describe a continuación.

La FIGURA 56I es un conjunto de gráficos que muestran que el grado de destrucción de células B en 24 horas por TDB CD20 es muy comparable o mayor que la destrucción de células B por CD19-TDB o CD22-TDB (panel superior) o CD79a o CD79b (panel inferior). Para la destrucción de células B autólogas, 200.000 PBMC aisladas de donantes sanos fueron incubadas con 40.000 células BJAB durante 24 horas con TDB CD20, CD19, CD22, CD79a o CD 79b en la concentración indicada. La muerte celular notificada se calculó como se describe a continuación.

La FIGURA 57A es una serie de gráficos que muestran los valores relativos de expresión para $CD3_{\varepsilon}$ humano detectado en células T CD4+ (panel izquierdo) y células T CD8+ (panel central); y CD20 humano en células B CD19+ (panel derecho) detectado en un ratón (mu) o PBMC humanos (hu) medido por FACS. Los PBMC de ratones se obtuvieron de la sangre de ratones transgénicos dobles huCD3/huCD20; se obtuvieron PBMC humanos a partir de sangre de donantes sanos.

La FIGURA 57B es un gráfico que muestra que TDB CD20 no puede captar células T murinas para disminuir las células B sin expresión de CD3 humano en ratones transgénicos con CD20 humano. Los ratones transgénicos huCD20 o ratones transgénicos dobles huCD20/CD3 se trataron una vez por vía intravenosa con anticuerpos como se indica (10 mg/kg para rituximab, 0,5 mg/kg para TDB CD20 y TDB HER2). Se recogieron bazos de ratón en D7 (7 días después del tratamiento con anticuerpos). El anticuerpo rituximab CD20 antihumano se utilizó como un control positivo. TDB CD3/HER2 se utiliza como un control de isotipo negativo.

La FIGURA 57C es un gráfico que muestra que TDB CD20 no puede captar células T murinas que expresan huCD3 en ratones transgénicos doble con CD3/CD20 humanos para disminuir potencialmente las células B con expresión de huCD20. Los ratones

transgénicos CD20 o ratones transgénicos dobles huCD20/huCD20 se trataron una vez por vía intravenosa con anticuerpos como se indica (10 mg/kg para rituximab, 0,5 mg/kg para TDB CD3 y TDB HER2). Se recogieron bazos de ratón en D7 (7 días después del tratamiento con anticuerpos). TDB CD3/HER2 se utiliza como un control de isotipo negativo.

La FIGURA 58A es una serie de gráficos de un estudio de curso temporal que muestran que el tratamiento con TDB CD20 resultó en la disminución sostenida de células B hasta D15 (15 días después de la dosificación). Se trataron una vez ratones transgénicos dobles huCD20/huCD3 por vía intravenosa con varias dosis de TDB CD20. Se recolectó sangre de ratón (D1, D8 y D15).

La FIGURA 58B es un gráfico que muestra que la disminución de células B en el bazo de ratón casi completa sólo se logró en D7 después de una sola dosis de 0,5 mg/kg, mientras que una dosis más baja de 0,05 mg/kg sólo dio lugar a la disminución parcial de células B del bazo. Los ratones doble transgénicos huCD20/CD3 fueron tratados una vez por vía intravenosa con diversas dosis de TDB CD20. Se recolectaron bazos (D7).

La FIGURA 58C es un gráfico que muestra que la disminución de células B robusta en D7 se observa en la circulación de los ratones transgénicos dobles huCD3/huCD20 tratados con TDB CD20. Los ratones doble transgénicos huCD20/huCD3 se trataron una vez por vía intravenosa con 0,5 mg/kg de TDB CD20. Se recolectó sangre en D0-5 min. (5 minutos después del tratamiento), D0-2h, D0-8h, D1, D2, D3, y D7. Las células B que expresan huCD20 se midieron con FACS.

La FIGURA 58D es una serie de gráficos que muestran la activación de células T en los ratones doble transgénicos huCD3/huCD20 tratados con un TDB CD20. Los ratones doble transgénicos huCD3/huCD20 tratados exhibieron hasta un aumento del 80 % en $CD3_{\varepsilon}$ humano que expresa el recuento de células T CD8+ a las 2 horas de posteriores al tratamiento con TDB CD20, lo que regresó a nivel básico de D2 y D7 (panel superior). Del mismo modo, $CD3_{\varepsilon}$ humano que expresa las células T CD4+ se incrementó en un 80 % 2 horas después del tratamiento con TDB CD20 y posteriormente regresó al nivel base de D2. Los ratones doble transgénicos huCD3/huCD20 se trataron una vez por vía intravenosa con 0,5 mg/kg de TDB CD20. Se recolectó sangre en D0-5 min. (5 minutos después del tratamiento), D0-2h, D0-8h, D1, D2, D3, y D7. Las células T CD4+ y CD8+ que expresan $CD3_{\varepsilon}$ se midieron con FACS.

La FIGURA 59A es una serie de gráficos de citometría de flujo que muestran que TDB CD20 reduce las células B de la zona marginal (MZB) tan eficientemente como las células B foliculares (FOB) después de la administración de TDB a los ratones doble transgénicos huCD3/huCD20. Dos animales doble transgénicos (paneles de la izquierda y derecha, respectivamente) se trataron con vehículos (paneles superiores) o una dosis intravenosa única de TDB de 0,5 mg/kg (paneles inferiores). Se recolectaron vasos de ratones en D7 y se analizaron con FACS.

La FIGURA 59B-59E es una serie de gráficos que muestran que TDB CD20 reduce células B de la zona marginal (MZB) (B) de forma tan eficiente como las células B foliculares

(FOB) (C) después de una dosis intravenosa única de TDB de 0,5 mg/kg, junto con la activación de las células T CD8+ (D) y la proliferación de las células T CD8+ (E) en el bazo en los momentos indicados. Se recolectaron bazos de ratones en D1, D2, D3, D5, D7 y D14.

La FIGURA 60A es un gráfico que muestra que los ratones humanizados NSG tratados con 3 dosis semanales de TDB CD20 en 0,5 m/kg (ajuste de dosis repetidas) exhibieron niveles escasos de células B en la sangre en D7, con células B casi no detectadas en D21. Los ratones humanizados NSG se trataron con 3 dosis semanales de TDB CD20 de 0,5 mg/kg por vía intravenosa. Se recolectó sangre en D-5 (5 días antes del tratamiento), D7, D14 y D21. Los recuentos de células B murinas en sangre se midieron con FACS.

La FIGURA 60B es un gráfico que muestra que la disminución robusta de células B en D21 se observó en el bazo de ratones humanizados NSG tratados con TDB CD20. Los ratones humanizados NSG se trataron con 3 dosis semanales de 0,5 mg/kg de TDB CD20 por vía intravenosa. Se recolectaron bazos en D21. Los recuentos de células B murinas en el bazo se midieron con FACS.

La FIGURA 60C es una serie de gráficos de citometría de flujo que muestran que las células T huCD8 + proliferan y que las células B huCD19+ disminuyen 7 días después del tratamiento (D7) de ratones humanizados NSG con TDB CD20. Los ratones humanizados NSG se trataron con vehículos o TDB CD20 de 0,5mg/kg (2H7v16/UCHT1v9). Los bazos de control y los ratones humanizados NSG tratados con TDB CD20 se recogieron en D7. Las células B que expresan huCD19 y células T que expresan huCD19 y huCD8 se midieron con FACS.

La FIGURA 60D es un gráfico que muestra que los ratones humanizados NSG tratados con 3 dosis semanales de TDB CD20 en 0,5 mg/kg (ajuste de dosis repetida) mostraron un aumento de hasta 10 veces el recuento de células T CD8+ en D7, que regresó al nivel básico o inferior en D14 y D21. Los ratones humanizados NSG se trataron con 3 dosis semanales de 0,5 mg/kg de TDB CD20 por vía intravenosa. Se recolectó sangre en D-5 (5 días antes del tratamiento), D7, D14 y D21. Los recuentos de células T murinas CD8+ en sangre y la activación de células T se midieron con FACS.

La FIGURA 60E es una serie de gráficos de citometría de flujo que muestra los niveles basales de células B huCD20+ (paneles centrales) y células T huCD8+ y huCD4+ (paneles de la derecha) de 2 ratones humanizados NSG, según se mide con FACS.

La FIGURA 60F es una serie de gráficos que muestran los niveles de expresión en la superficie celular de huCD3$_{\varepsilon}$ y la expresión de CD20 en las células B CD19+ (izquierda), las células T CD8+ (centro) y las células T CD4+ (derecha) detectadas por FACS. La FIGURA 61A es un gráfico que muestra que TDB CD20 es potente en la eliminación de las células B de la CLL con células T autólogas. Se incubaron 200.000 PBMC con diversas concentraciones de TDB CD20 durante 48 horas en medios RPMI suplementados con FBS al 10 %.

Figura 61B es un gráfico que muestra que TDB CD20 es potente en la inducción de la activación de células T autólogas en presencia de las células B de CLL. Se incubaron

200.000 PBMC con diversas concentraciones de TDB CD20 durante 48 horas en medios RPMI suplementados con FBS al 10 %.

La FIGURA 61C es un conjunto de gráficos que muestran que el recuento de células T es altamente correlativo con la destrucción de células B de CLL *ex vivo*. Se incubaron 200.000 PBMC con TDB CD20 de 1000 ng/ml durante 48 horas, ya sea solos o con células T CD8+ agregadas purificadas de donantes sanos. El porcentaje de células B CD19+CD5+ y células T CD8+ en los PBMC de LLC son de 90/0,55 para la muestra A1645, 76/3,5 para A1957, 87/0,63 para A1978, 69/1,3 para A1980. La destrucción celular, la inducción de granzima B y la activación de células T se midieron con FACS como se describe a continuación.

La FIGURA 62A es un conjunto de gráficos que muestran que la activación de células T (izquierda) después de posologías de TDB CD20 de 0,1 mg/kg o 0,5 mg/kg a los ratones NSG con células de leucemia de CLL injertadas correlacionadas con la disminución notable de células B de CLL injertadas (derecha).

La FIGURA 62B es un conjunto de imágenes de inmunohistoquímica de secciones del bazo de ratones NSG con células de leucemia de CLL injertadas que muestra que pueden detectarse pocas células B después del tratamiento con TDB CD20. Se injertaron células B y células T en ratones NSG como se describe a continuación. Los ratones se trataron una vez por vía intravenosa con TDB HER2 y rituximab en 0,5 mg/kg, TDB CD20 en 0,1 y 0,5 mg/kg y los bazos se recogieron para el análisis con FACS 14 días después del tratamiento.

La FIGURA 63 es un gráfico que muestra el volumen del tumor adaptado con el paso del tiempo de tumores injertados de Bjab de ratones SCID para el Grupo 1 (vehículo: 20 mM de histidina/acetato a pH 5,5, 240 mM de sacarosa, Tween 20 al 0,02 %); Grupo 2 (TDB CD20: 2H7v114/UCHT1.v9; 0,5 mg/kg); Grupo 3 (vehículo: 20 mM de histidina/acetato a pH 5,5, 240 mM de sacarosa, Tween 20 al 0,02 %, PBMC); y Grupo 4 (TDB CD20: CD20 2H7v114/CD3 UCHT1.v9; 0,5 mg/kg, PBMC). Las células efectoras derivaban del PBMC de un donante humano sano. Los ratones se trataron una vez por semana durante dos semanas.

La FIGURA 64A es un gráfico que muestra el nivel relativo de expresión de CD20 en células BJAB, NALM-6, SC-1 y OCI-LY 19. Se injertaron células B y células T en ratones NSG como se describe a continuación. Los ratones se trataron una vez por vía intravenosa con TDB HER2 y rituximab en 0,5 mg/kg, TDB CD20 en 0,1 y 0,5 mg/kg y los bazos se recogieron para el análisis con IHC 14 días después del tratamiento.

La FIGURA 64B es un gráfico que muestra que rituximab y TDB CD20 son comparables en su eficacia para destruir células BJAB *in vitro*, que expresan un alto nivel de CD20 en su superficie celular. Se agotaron las células B en los PBMC aislados de donantes sanos y se utilizaron como células efectoras en el ensayo de destrucción celular in vitro. 20.000 células B y 200.000 células efectoras se incubaron con diversas concentraciones de TDB CD20 durante 24 horas. La expresión TDB CD20 se detectó con FACS.

La FIGURA 64C es un gráfico que muestra que TDB CD20, pero no rituximab, es capaz de

destruir las células NALM-6, SC-1 y OCI-LY 19 que tienen niveles relativamente bajos de CD20 en su superficie celular. Se agotaron las células B en los PBMC aislados de donantes sanos y se utilizaron como células efectoras en el ensayo de destrucción celular in vitro. 20.000 células B y 200.000 células efectoras se incubaron con diversas concentraciones de TDB CD20 durante 24 horas. La expresión TDB CD20 se detectó con FACS.

La FIGURA 64D es un gráfico que muestra los niveles de expresión de la superficie de las células B del antígeno CD20 desbloqueado como una función de la concentración de Rituximab-DANA, según se mide con FACS. Los ratones CD20/CD3 doble transgénicos se trataron con una dosis única de vehículo o Rituximab-DANA (10mg/kg). Los bazos se cultivaron 5 días después del tratamiento.

Las FIGURAS 65A y 65B son gráficos que muestran que TDB CD20 está activo en la eliminación de células B *in vitro* en presencia de altos niveles de rituximab (A) o dexametasona (B). Los 200.000 PBMC aislados de donantes sanos se incubaron primero con rituximab-DANA en la concentración indicada durante 1 hora y luego se añadió TDB CD20 y se incubó durante 24 horas. Para el ensayo con dexametasona, las células se trataron previamente con 1μM de dexametasona durante la noche antes de añadir TDB CD20. La destrucción celular notificada se calculó como se describe a continuación.

La FIGURA 66 es un conjunto de gráficos que muestran que TDB CD20 está activo en células B en agotamiento en la sangre (izquierda) y el bazo (derecha) en ratones pretratados con rituximab-DANA. Para el tratamiento con un agente único, los ratones doble transgénicos huCD20/CD3 se trataron una vez por vía intravenosa con la dosis indicada; para el tratamiento de combinación, los ratones se trataron primero por vía intravenosa con rituximab-DANA y se inyectó TDB CD20 por vía intravenosa 30 minutos más tarde. Se recolectó sangre en D-7, D0-2h (2 horas después del tratamiento con TDB) y D7; se recogieron los bazos en D7. Los recuentos de células B se midieron con FACS como se describe a continuación.

La FIGURA 67A es un conjunto de gráficos que muestran el recuento de células B (izquierda), células T CD4+ (medio) y células T CD8+ (derecha) en muestras de sangre de 3 monos cynomolgus antes y 7 días después del tratamiento con una sola dosis intravenosa de TDB CD20 de 1 mg/kg. Se trataron tres monos cynomolgus una vez por vía intravenosa con TDB CD20 de 1mg/kg. La sangre se recogió en D-7 (7 días antes de la dosis), D0-4hr (4 horas después de la dosis) y D7.

La FIGURA 67B es un conjunto de gráficos que muestran las células B, células T CD4+ y los niveles de células T CD8+ en el bazo (izquierda), los ganglios linfáticos mandibulares (medio) y los ganglios linfáticos mesentéricos (derecha) de 3 monos cynomolgus 7 días después del tratamiento con una sola dosis intravenosa de TDB CD20 de 1 mg/kg. Se trataron tres monos cynomolgus una vez por vía intravenosa con TDB CD20 de 1mg/kg. La sangre se recogió en D-7 (7 días antes de la dosis), D0-4hr (4 horas después de la dosis) y D7.

La FIGURA 67C es un conjunto de gráficos que muestran las células B, células T CD4+ y los niveles de células T CD8+ en el bazo (izquierda), los ganglios linfáticos mandibulares

(medio) y los ganglios linfáticos mesentéricos (derecha) de 3 monos cynomolgus antes del tratamiento con una sola dosis intravenosa de TDB CD20 de 1 mg/kg. Se trataron tres monos cynomolgus una vez por vía intravenosa con TDB CD20 de 1mg/kg. La sangre se recogió en D-7 (7 días antes de la dosis), D0-4hr (4 horas después de la dosis) y D7.

La FIGURA 67D es un conjunto de gráficos que muestran los niveles basales de las células B y las células T CD4+ y CD8+ como un porcentaje de linfocitos totales detectados en el bazo (izquierda) y los ganglios linfáticos mandibulares (derecha) en animales tratados con control de vehículo.

La FIGURA 68A es un conjunto de gráficos que muestran la concentración sérica de TDB CD20 a partir de muestras de sangre y de suero recogidas de cuatro monos cynomolgus que se trataron 4 veces por semana con TDB CD20 de 1mg/kg por vía intravenosa.

La FIGURA 68B es un conjunto de gráficos que muestran la concentración de TDB CD20 a partir de muestras de suero tomadas de animales descritos en las Figuras 65 y 66A. Se graficó el s.d. ± medio.

La FIGURA 69A es un histograma que muestra la expresión de la expresión de PD-L1 en células A20-huCD20 de ratones singénicos A20-huCD20 Balb/C, según lo evaluado por una citometría de flujo.

La FIGURA 69B es un gráfico que muestra el volumen del tumor en relación con el tiempo para el Grupo 1 (vehículo); Grupo 2 (TDB CD20 a 0,5 mg/kg); Grupo 3 (anticuerpo anti-PD-L1 en 10 mg/kg); y el Grupo 4 (TDB CD20 en 0,5 mg/kg + anticuerpo anti-PD-L1).

La FIGURA 70 es un gráfico que muestra las curvas de unión para cada una de las tres TBD FcRH5 evaluadas para la unión *in vitro* a células T que CD8+ con expresión CD3.

La FIGURA 71A es un gráfico que muestra el porcentaje de la destrucción de células diana MOLP-2 como una función de la concentración de TDB FcRH5 con células T CD8+ purificadas a partir de PBMC humanos desde el Donante N. ° 1.

La FIGURA 71B es un gráfico que muestra el porcentaje de la destrucción de células diana MOLP-2 como una función de la concentración de TDB FcRH5 con células T CD8+ purificadas a partir de PBMC humanos desde el Donante N. ° 2.

La FIGURA 72A es un gráfico que muestra el porcentaje de células CD8+CD69+T como función de concentración TDB de FcRH5, como se evalúa con un análisis FACS. Las células eran MOLP-2, y las células CD8+T se purificaron del Donante N. ° 1.

La FIGURA 72B es un gráfico que muestra el porcentaje de células CD8+CD107a+T como función de concentración TDB de FcRH5, como se evalúa con un análisis FACS. Las células eran MOLP-2, y las células CD8+T se purificaron del Donante N. ° 1.

La FIGURA 72C es un gráfico que muestra el porcentaje de células CD8+CD69+T como función de concentración TDB de FcRH5, como se evalúa con un análisis FACS. Las células eran MOLP-2, y las células CD8+T se purificaron del Donante N. ° 2.

La FIGURA 72D es un gráfico que muestra el porcentaje de células CD8+CD107a+T como una función de concentración TDB de FcRH5, como se evalúa con una análisis FACS. Las

células diana eran MOLP-2, y las células CD8+T se purificaron del Donante n.° 2.

La FIGURA 73 es un grupo de gráficos que muestran las curvas de unión para cada uno de los tres TDB de HER2 que se analizaron para la unión *in vitro* con células SKBR3 que expresan Her2 (superior) y las células T que expresan CD8+ CD3 (inferior).

La FIGURA 74A es un gráfico que indica las curvas de unión para trastuzumab (bivalente), trastuzumab (Fab) y TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5) (biespecífico) para unión *in vitro* con células SKBR3 que expresan HER2.

La FIGURA 74B es un gráfico que indica el porcentaje de células SKBR3 viables como una función para la concentración de trastuzumab (bivalente), trastuzumab (Fab) y TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5) (biespecífico), como se evalúa con el Ensayo de viabilidad celular luminiscente CELLTITERGLO®.

La FIGURA 74C es un gráfico que indica el porcentaje de muertes de células diana SKBR mediado por citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC) en presencia de trastuzumab (T-mab), trastuzumab producido en *E. coli* (T-mab *E. coli*), y TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5), como se evalúa con la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) de las células lisadas.

La FIGURA 75 es un gráfico que indica el porcentaje de muertes de células diana SKBR3 como una función de la concentración de TDB de HER2 (hu4D5-TDB, hu4D5.91A-TDB y hu4D5.Y100A-TDB).

La FIGURA 76A es una serie de paneles. El panel superior es un modelo de la estructura de cristal de la unión de dominio extracelular de HER2 (ECD, por su sigla en inglés) por hu4D5 Fab (Trastuzumab), 2C4 Fab (Pertuzumab) y 7C2. El panel inferior es una estructura de lazo de la unión de $CD3_{\varepsilon}$ por 2C11, 38E4v1 y 40G5c.

La FIGURA 76B es una tabla que indica las afinidades de unión y se representan con la constante de disociación K_D (nM), de TDB de HER2 para tres grupos HER2 diferentes: hu4D5, 2C4 y 7C2. El panel inferior derecho es una tabla que indica las afinidades de unión y se representan con la constante de disociación K_D (nM), de TDB de HER2 para tres grupos $CD3_{\varepsilon}$ diferentes: 38E4v1, 40G5c, y 2C11.

La FIGURA 76C es un gráfico que indica el porcentaje de muertes de células diana MCF7 que expresan HER2 como una función de la concentración TDB de HER2 (hu4D5-TDB, 2C4-TDB y 7C2-TDB). Se midió la citotoxicidad con la liberación del lactato deshidrogenasa (LDH).

La FIGURA 77 es un gráfico que indica que los grupos HER2 hu4D5 y 2C4 son fuertes mediadores de la muerte celular como expone el porcentaje máximo de muerte de células diana SKBR3 logrado con el tratamiento con las siguientes variedades TDB de HER2: hu4D5-38E4v1, hu4D5-40G5c, 2C4-38E4v1, 2C4-40G5c, 7C2-38E4v1, y 7C2-40G5c.

La FIGURA 78 es una serie de gráficos que indican la potencia de las variantes TDB de HER2 para matar líneas celulares SKBR3 que expresan HER2 (izquierda) y MCF7 que expresan HER2 (derecha) de forma dosis dependiente, con valores CE50 de muerte de células diana (pM). La FIGURA 79 es una serie de gráficos que indican el porcentaje de

muerte de células diana SKBR3 que expresan HER2 para varios TDB con grupos HER2 (hu4D5, 2C4 y 7C2) emparejados con grupos CD3 con afinidad alta (38E4v1) o baja (40G5c) como una función de la concentración TDB (ng/ml).

La FIGURA 80 es una serie de paneles. El panel de la izquierda indica la potencia de las variantes TDB de HER2 (hu4D5-38E4v1, 2C4-38E4v1, 7C2-38E4v1; hu4D5-40G5c, 2C4-40G5c, 7C2-40G5c) para matar líneas celulares SKBR3 que expresan HER2 y MCF7 que expresan HER2 de forma dosis dependiente, con valores CE50 de muerte de células diana (pM). El panel de la derecha es una tabla con la proporción de CE50 de las variantes TDB de HER2 dadas en células diana MCF7 en comparación con SKBR3 para tres experimentos.

La FIGURA 81 es una serie de paneles. El panel superior muestra una tabla que enumera las variantes del grupo HER2 hu4D5 (hu4D5v7, hu4D5v5, hu4D5v10, hu4D5v31, hu4D5.Y100A) para TDB de HER2 (grupo CD3 40G5c) y el correspondiente CE50 (ng/ml) para la muerte de células diana SKBR3, afinidad de unión HER2 (K_D, nM) además de la proporción de la afinidad de unión K_D de HER2 y el CE50 de muerte de células diana SKBR3 para las variantes hu4D5 relativas a hu4D5. El panel inferior es un gráfico que indica la correlación entre la proporción CE50 SKBR3 para las variantes TDB de hu4D5 HER2 (hu4D5, hu4D5v7, hu4D5v5, hu4D5v10 y hu4D5v31) y la proporción K_D relativa para las variantes TDB de HER2 hu4D5.

La FIGURA 82 es una serie de gráficos que indican el porcentaje de muerte de células diana SKBR3 y MCF7 como una función de la concentración de las siguientes variantes TDB de HER2: hu4D5-40G5c (superior izquierda), hu4D5v7-40G5c (superior centro), hu4D5v5-40G5c (superior derecha), hu4D5v10-40G5c (inferior izquierda), hu4D5v31-40G5c (inferior centro), hu4D5.Y100A-40G5c (inferior derecha).

La FIGURA 83 es una serie de gráficos. El gráfico a la izquierda indica el porcentaje de muerte de células diana como una función de la concentración (µg/ml) de los anticuerpos monoespecíficos bivalentes bloqueantes de HER2 específicos para el grupo designado HER2 del TDB de HER2. (Anticuerpos bloqueantes de HER2: anticuerpos monoespecíficos bivalentes para hu4D5, 2C4 y 7C2. TDB de HER2: hu4D5-40G5c, 2C4-40G5c y 7C2-38E4v1 con concentraciones fijas: 10 ng/ml). El gráfico de la derecha muestra el porcentaje de células viables como una función de la concentración de anticuerpo HER2 (hu4D5) trastuzumab en presencia y ausencia de TDB de HER2 hu4D5-40G5c.

La FIGURA 84 es una serie de paneles. El panel superior es una tabla que muestra la reactividad de las variantes del grupo HER2 con HER2 como se midió con varios ensayos de unión junto con la reactividad de los clones HER2 con el anticuerpo hu4D5 trastuzumab. El panel inferior es un gráfico que muestra el porcentaje de muerte de células diana como una función de la concentración (pM) de Fab biespecífico HER2 para ciertos clones (hu4D5, 3H4 y 2H11). Se incluyen los valores CE50 para cada clon en pM.

La FIGURA 85 es una tabla que indica la información de afinidad y reactividad para las variantes del grupo CD3 TDB de HER2 (38E4v1, 38E4, SP34, 40G5c y 2C11).

La FIGURA 86 es un gráfico que indica la muerte de células diana CT26 que expresan HER2 como una función de concentración (ng/ml) de variantes TDB de HER2 (hu4D5-2C11, hu4D5-SP34, 7C2-2C11 y 2C4-2C11). Células efectoras: Células T derivadas de TG CD3

La FIGURA 87A es un gráfico que indica el volumen del tumor (mm^3) medido con el paso del tiempo (0 a 5 días) en animales administrados con vehículo o TDB de HER2 (0,5 mg/kg).

La FIGURA 87B es una serie de gráficos. El gráfico superior izquierdo muestra el porcentaje de las células CD45+ periféricas por 5 células detectadas el día 6 después del tratamiento con vehículo o TDB de HER2 (0,5 mg/kg). El gráfico superior derecho muestra el porcentaje de las células CD45+ periféricas que son células CD8+ detectadas el día 6 después del tratamiento con vehículo o TDB de HER2 (0,5 mg/kg). El gráfico inferior izquierdo muestra el porcentaje de las células CD45+ periféricas que son células CD4+ detectadas el día 6 después del tratamiento con vehículo o TDB de HER2 (0,5 mg/kg). El gráfico inferior derecho muestra el porcentaje de las células CD8+ periféricas que son células IFN+ detectadas el día 6 después del tratamiento con vehículo o TDB de HER2 (0,5 mg/kg).

La FIGURA 88A es una serie de gráficos. El gráfico superior muestra un gráfico de cascada del cambio porcentual en el volumen del tumor en animales administrados con variante del vehículo o TDB de HER2 (hu4D5-SP34 o hu4D5-2C11; 0,5 mg/kg; IV, semanal, 5 semanas). El gráfico inferior muestra un gráfico de cascada del cambio porcentual en el volumen del tumor en animales administrados con variante de TDB de HER2 (2C4-38E4; 0,5 mg/kg; IV, semanal, 5 semanas).

La FIGURA 88B es una serie de gráficos. El gráfico superior muestra el volumen del tumor como un porcentaje del volumen basal en función del tiempo (días) para animales administrados con vehículo o TDB de HER2 (hu4D5-SP34). El gráfico inferior muestra el volumen del tumor como un porcentaje del volumen basal en función del tiempo (días) para animales administrados con vehículo o TDB de HER2 (hu4D5-2C11). (TDB de HER2: 0,5 mg/kg; IV, semanal, 5 semanas).

La FIGURA 89 es un gráfico que indica el porcentaje de células CD8+CD107a+ T como una función de la concentración TDB de HER2 (hu4D5-TDB, hu4D5.91A-TDB y hu4D5.Y100A-TDB) hu4D5, como se evalúa en el análisis FACS. Las células diana eran células SKBR3; las células efectoras eran células CD8+ T; proporción de células efectoras: células diana = 3:1.

La FIGURA 90A es un gráfico que indica el porcentaje de muertes de células diana SKBR3 como una función de la concentración TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5 y SP34/hu4D5).

La FIGURA 90B es un gráfico que indica el porcentaje de muertes de células diana SKBR3 como una función de la concentración TDB de HER2 (SP34/hu4D5, 38E4c/hu4D5 y 40G5c/hu4D5).

La FIGURA 90C es un gráfico que indica el porcentaje de muertes de células diana SKBR3 como una función de la concentración TDB de HER2 (SP34/hu4D5, 38E4c/hu4D5 y

40G5c/hu4D5).

La FIGURA 91A es un gráfico que indica la curva de unión para cada una de las tres TDB de HER2 (SP34/hu4D5, 38E4c/hu4D5 y 40G5c/hu4D5) que se analizaron para unión *in vitro* con células T que expresan CD8+ CD3, como se evaluó con el análisis FACS.

La FIGURA 91B es un gráfico que indica el porcentaje de células CD8+CD69+ T como una función de la concentración TDB de HER2 (SP34/hu4D5, 38E4c/hu4D5 y 40G5c/hu4D5).

La FIGURA 92A es un gráfico que indica la curva de unión para las dos TDB de HER2 (38E4c/hu4D5 y 38E4/hu4D5) que se analizaron para unión *in vitro* con células T que expresan CD8+ CD3, como se evaluó con el análisis FACS.

La FIGURA 92B es un gráfico que indica la curva de unión para las dos TDB de HER2 (38E4c/hu4D5 y 38E4/hu4D5) que se analizaron para unión *in vitro* con células SKBR3 que expresan HER2, como se evaluó con el análisis FACS.

La FIGURA 92C es un gráfico que indica el porcentaje de muertes de células diana SKBR3 como una función de la concentración TDB de HER2 (38E4c/hu4D5 y 38E4/hu4D5), como se evaluó con el análisis FACS. Las células efectoras eran células CD8+ T humanas; proporción de células efectoras: células diana = 3:1.

La FIGURA 92D es un gráfico que indica el porcentaje de células CD8+CD69+ T como una función de la concentración TDB de HER2 (38E4c/hu4D5 y 38E4/hu4D5).

La FIGURA 93A es un gráfico que muestra el porcentaje de células CD8+CD69+Granzima B+ T como una función de concentración TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5), como se evalúa con una análisis FACS. Las células diana eran células SKBR3; las células efectoras eran células CD8+ T; proporción de células efectoras: células diana = 3:1.

La FIGURA 93B es una serie de gráficos que indican la exocitosis de los gránulos de células diana mediada por células T TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5) que se detecta con ELISA para perforina y granzimas A y B, y el porcentaje de muerte de células diana como se evalúa por la liberación de LDH. Las células diana eran células SKBR3; las células efectoras eran células PBMC; proporción de células efectoras: células diana = 30:1.

La FIGURA 93C es una serie de gráficos que indican la apoptosis de las células diana medida por células T TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5) como se mide con las actividades caspasa 3 y 7 en el Ensayo CASPASE-GLO® 3/7, apoptosis en un Ensayo de detección de muerte celular con ELISA^{plus} y liberación de LDH. Las células diana eran células SKBR3; las células efectoras eran células PBMC; proporción células efectoras: células diana = 10:1.

La FIGURA 93D es una imagen de Western blot (superior) que indica la expresión de HER2 en células 3T3 transfectadas y un gráfico (inferior) que indica el porcentaje de muerte de células diana por células T activadas como una función de concentración TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5), como se mide por la liberación de LDH. Las células diana eran Vector 3T3 y HER2 3T3; las células efectoras eran células PBMC; proporción de células efectoras: células diana = 10:1.

La FIGURA 93E es una gráfico que indica el porcentaje de muerte de células diana BT474 como una función de concentración TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5) en presencia de

trastuzumab Fab (T-Fab) o dominio extracelular HER2 soluble (ECD), como se evalúa por la liberación de LDH. Las células efectoras eran células CD8+ T; proporción de células efectoras: células diana = 5:1.

La FIGURA 93F es un gráfico que indica el porcentaje de muerte de células diana SKBR3 como una función de concentración TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5) después del agotamiento de las células CD3+ de la población celular efectora PBMC. Proporción de células efectoras: células diana = 20:1.

La FIGURA 94A es una serie de gráficos que indican el porcentaje de células CD8+CD69+ T (izquierda) y células CD8+CD107a+ T (centro) como una función de concentración TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5), como se evalúa con un análisis FACS, y el porcentaje de muerte de células diana SKBR3 como una función de concentración TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5) (derecha). Las células diana eran células SKBR3; las células efectoras eran células CD8+ T; proporción de células efectoras: células diana = 3:1.

La FIGURA 94B es una serie de gráficos que indican el porcentaje de muerte de células diana BT474 como una función de concentración TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5) (izquierda) y el porcentaje de células CD8+CD69+granzimasB+ T como una función de concentración TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5) (derecha), como se evalúa con un análisis FACS. Las células diana eran células BT474; las células efectoras eran células CD8+ T; proporción de células efectoras: células diana como se indica.

La FIGURA 95A es una serie de histogramas que muestra la expresión de CFSE en células CD8+ T en presencia de células diana SKBR3 o TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5).

La FIGURA 95B es un gráfico que muestra el cambio en veces del número de células CD8+ como una función sobre el tiempo posterior a la incubación con células diana SKBR3 y TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5), como se evalúa en un análisis FACS.

La FIGURA 95C es una serie de gráficos que muestra el cambio en veces del número de células CD8+ como una función sobre el tiempo posterior a la incubación con células diana SKBR3, TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5), y 20 ng/ml de IL-2, como se evalúa en un análisis FACS.

La FIGURA 96A es una imagen de Western blot que indica el nivel de expresión de HER2 en un panel de líneas celulares tumorales humanas.

La FIGURA 96B es un gráfico que muestra el porcentaje de muerte de células diana como una función de concentración TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5), como se evalúa por la liberación de LDH. Las células diana eran células BJAB, MDA435, MDA231, MCF7, MDA453, SKBR3 y BT474; las células efectoras eran células PBMC; proporción de células efectoras: células diana = 25:1.

La FIGURA 96C es un gráfico que muestra el porcentaje de muerte de células diana como una función de concentración TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5), como se evalúa con un análisis FACS. Las células diana eran células MCF7 y SKBR3; las células efectoras eran células PBMC; proporción de células efectoras: células diana = 20:1.

La FIGURA 96D es un gráfico que muestra el porcentaje de muerte de células diana como una función de concentración TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5), como se evalúa con un

análisis FACS. Las células diana eran células BJAB y SKBR3; las células efectoras eran células PBMC; proporción de células efectoras: células diana = 20:1.

La FIGURA 96E es un tabla que presenta el número de copia de HER2 para un panel de células diana y para cada una, el CE50 TDB de HER2 y porcentaje de ocupación de HER2 en esa concentración. Las células diana son MDA435, MDA231, MCF7, MDA453, BT474, y SKBR3.

La FIGURA 97A es un gráfico que muestra el porcentaje de muerte de células diana como una función de concentración TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5), como se evalúa por la liberación de LDH. Las células diana eran células SKBR3, HCC1569, KPL4, HCC202, JIMT1 y CALU3; las células efectoras eran células PBMC; proporción de células efectoras: células diana = 10:1.

La FIGURA 97B es un gráfico que indica el porcentaje de células diana viables como una función para la concentración de trastuzumab emtansina (T-DM1), como se evalúa con el Ensayo de viabilidad celular luminiscente CELLTITERGLO®. Las células diana eran BT474-M1 parenterales y BT474-M1 T-DM1 resistentes; las células efectoras eran células CD8+ T; proporción de células efectoras: células diana = 3:1.

La FIGURA 97C es un gráfico que muestra el porcentaje de células diana viables como concentración TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5), como se evalúa con una análisis FACS. Las células diana eran BT474-M1 parenterales y BT474-M1 T-DM1 resistentes; las células efectoras eran células CD8+ T; proporción de células efectoras: células diana = 3:1.

La FIGURA 98 es un gráfico y una tabla que muestran la farmacocinética (PK) TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5) en ratas Sprague-Dawley, como se evalúa con ELISA.

La FIGURA 99A es un gráfico que indica el volumen relativo del tumor con el paso del tiempo para el Grupo 1 (Vehículo a 0,5 mg/kg); Grupo 2 (PBMC(1) + vehículo a 0,5 mg/kg); Grupo 3 (PBMC(1) + TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5) a 0;5 mg/kg); Grupo 4 (PBMC(2) + vehículo a 0,5 mg/kg); y Grupo 5 (PBMC(2) + TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5) a 0,5 mg/kg).

La FIGURA 99B es un gráfico que indica el porcentaje de cambio en el volumen del tumor con el paso del tiempo para el Grupo 1 (Vehículo a 0,5 mg/kg); y Grupo 2 (TDB de HER2 (hu4D5/2C11) a 0,5 mg/kg).

La FIGURA 99C es un gráfico que indica el porcentaje de cambio relativo en el volumen del tumor con el paso del tiempo para el Grupo 1 (Vehículo a 0,5 mg/kg); y Grupo 2 (TDB de HER2 (hu4D5/2C11) a 0,5 mg/kg).

La FIGURA 99D es un gráfico que indica el volumen relativo del tumor con el paso del tiempo para el Grupo 1 (Vehículo a 0,5 mg/kg); y Grupo 2 (TDB de HER2 (hu4D5/2C11) a 0,5 mg/kg). Los participantes incluían tumores que eran >1000 mm^3 al comienzo del tratamiento.

La FIGURA 99E es un gráfico que indica el porcentaje de cambio en el volumen del tumor con el paso del tiempo para el Grupo 1 (TDB de HER2 controlado por el grupo CD3 (hu4D5/SP34) a 0,5 mg/kg); y el Grupo 2 (TDB de control (2C11) a 0,5 mg/kg).

La FIGURA 99F es un gráfico que indica el volumen relativo del tumor con el paso del tiempo para el Grupo 1 (Vehículo a 0,5 mg/kg); y Grupo 2 (TDB de HER2 (hu4D5/SP34) a 0,5 mg/kg).

La FIGURA 99G es un gráfico que indica el volumen relativo del tumor con el paso del tiempo para el Grupo 1 (Vehículo a 0,5 mg/kg); Grupo 2 (TDB de HER2 (hu4D5/2C11) a 0,5 mg/kg); Grupo 3 (TDB de control (2C11) a 0,5 mg/kg); y Grupo 4 (T-DM1 a 15 mg/kg).

La FIGURA 100A es un gráfico que indica el volumen relativo del tumor con el paso del tiempo para el Grupo 1 (Sin tratamiento); Grupo 2 (TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5) a 0,5 mg/kg).

La FIGURA 100B es un gráfico que indica el volumen relativo del tumor con el paso del tiempo para el Grupo 1 (Vehículo a 0,5 mg/kg); Grupo 2 (PBMC(3) + Vehículo a 0,5 mg/kg); y Grupo 3 (PBMC(3) + TDB de control (2C11) a 0,5 mg/kg).

La FIGURA 101A es un gráfico que indica la afinidad de unión para el anticuerpo CD3-UCHT1 evaluado para unión *in vitro* al CD3 humano en células T humanas, células T TG CD3 y células T BALB/c, como se evalúa en el análisis FACS.

La FIGURA 101B es un gráfico que indica la afinidad de unión para el anticuerpo CD3-2C11 evaluado para unión *in vitro* al CD3 de ratones en células T TG CD3 y células T BALB/c, como se evalúa en el análisis FACS.

La FIGURA 102A es un gráfico que muestra el porcentaje de muerte de células diana CT26-HER2 como una función de concentración TDB de HER2 (UCHT1v9/hu4D5), como se evalúa con una análisis FACS. Las células efectoras eran células T aisladas de sangre humana periférica, células esplénicas transgénicas huCD3 y células T esplénicas BALB/c.

La FIGURA 102B es un gráfico que muestra el porcentaje de muerte de células diana CT26-HER2 como una función de concentración TDB de HER2 (hu4D5/2C11), como se evalúa con una análisis FACS. Las células efectoras eran células T aisladas de sangre humana periférica, células esplénicas transgénicas huCD3 y células T esplénicas BALB/c.

La FIGURA 103 es un gráfico que indica el volumen relativo del tumor con el paso del tiempo para el Grupo 1 (Vehículo a 0,5 mg/kg); y Grupo 2 (TDB de HER2 (hu4D5/SP34) a 0,5 mg/kg).

La FIGURA 104 es un gráfico que muestra las curvas de unión para cada una de las tres TBD de LYPD1 evaluadas para unión *in vitro* a células T que expresan CD8+ CD3.

La FIGURA 105 es un gráfico que indica el porcentaje de muerte de células diana OVCAR3.Luc como una función de la concentración TDB de LYPD1.

La FIGURA 106 es un gráfico que muestra el porcentaje de células CD8+CD69+ (izquierda) y CD8+CD25+ (derecha) T como una función de concentración TDB de LYPD1, como se evalúa con un análisis FACS. Las células diana eran células OVCAR3.Luc; proporción de células efectoras: células diana = 3:1.

La FIGURA 107 muestra las secuencias de aminoácidos del dominio variable (superior) de la cadena liviana y el dominio variable (inferior) de la cadena pesada del anticuerpo anti RET 41205.v6.

La FIGURA 108A es un gráfico que muestra el volumen del tumor (mm^3) como una función del tiempo (días) para el Grupo 1 (vehículo, qwx3, IV; n=9); el Grupo 2 (CD20 TDB (2H7-mu2C11), 0,5 mg/kg, qwx3, IV; n=9); el Grupo 3 (anti-PD1 (mu8F11 DANA), 10 mg/kg, tiwx3, IP; n=9) y el Grupo 4 (anti-PD1 (mu8F11 DANA), 10 mg/kg, tiwx3, IP; CD20 TDB (2H7-mu2C11), 0,5 mg/kg, qwx3, IV; n=9).

La FIGURA 108B es un gráfico que muestra el volumen del tumor (mm^3) como una función del tiempo (días) para el Grupo 1 (vehículo, qwx3, IV; n=9); el Grupo 2 (CD20 TDB (2H7-mu2C11), 0,5 mg/kg, qwx3, IV; n=9); el Grupo 3 (anti-PD1 (mu8F11 DANA), 10 mg/kg, tiwx3, IP; n=9) y el Grupo 4 (anti-PD1 (mu8F11 DANA), 10 mg/kg, tiwx3, IP+ CD20 TDB (2H7-mu2C11), 0,5 mg/kg, qwx3, IV; n=9). La línea sólida en negrita representa el volumen ajustado del tumor para el grupo especificado.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS VERSIONES DE LA INVENCIÓN

I. DEFINICIONES

El término “alrededor de” a partir del presente se refiere al rango de error normal para el valor respectivo de fácil conocimiento para las personas entrenadas en el campo técnico. La referencia a “alrededor de” para un valor o parámetro a partir del presente incluye (y describe) las versiones que se relacionan directamente a ese valor o parámetro en sí.

Para los propósitos del presente, un “marco humano de selector” es un marco que comprende la secuencia de aminoácidos de un marco de dominio variable (VL) de una cadena ligera o un marco de dominio variable (VH) de una cadena pesada que se deriva del marco de inmunoglobulina humana o un marco de consenso humano, como se define a continuación. Un marco humano de selector “que se deriva” de un marco de inmunoglobuna humana o un marco de consenso humano incluye la misma secuencia de aminoácidos que estos, o puede contener cambios en la secuencia de aminoácidos. En algunas versiones, el número de cambios en los aminoácidos es de 10 o menos, 9 o menos, 8 o menos, 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos, o 2 o menos. En algunas versiones, el marco humano de selector VL tiene una secuencia idéntica al marco de inmunoglubina humana VL o al marco de consenso humano VL.

La afinidad se refiere a la concentración de la suma total de las interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de la molécula (p. ej., un anticuerpo) y su par de unión (p. ej., un antígeno). A menos que se indique lo contrario, a partir del presente, “afinidad de unión” hace referencia a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre los miembros de un par de unión (p. ej. anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su par Y puede representarse generalmente con la constante de disociación (Kd). La afinidad puede medirse mediante métodos comunes conocidos en la materia, incluidos aquellos que se describen en el presente. Las representaciones ilustrativas y ejemplares específicas para medir la afinidad de la unión se describen a continuación.

Un anticuerpo “madurado por afinidad” hace referencia a un anticuerpo con una o más alteraciones en una o más regiones hipervariables (HVR), en comparación con un anticuerpo principal que no posee dichas alteraciones, alteraciones que generan una mejora en la afinidad del anticuerpo para el antígeno.

Los términos “anticuerpo contra CD3” y “un anticuerpo que se une a CD3” hacen referencia a un anticuerpo que es capaz de unirse a CD3 con la afinidad suficiente para que el anticuerpo resulte útil como agente de diagnóstico o terapéutico a la hora de dirigirse a CD3. En una representación, el grado de unión de un anticuerpo contra CD3 a una proteína no relacionada distinta de CD3 es menos de aproximadamente el 10% de la unión del anticuerpo a CD3 según la medición, p. ej.: mediante un ensayo de radioinmunología (RIA). En determinadas representaciones, un anticuerpo que se une a CD3 tiene una constante de disociación (Kd) de ≤1μM, ≤100 nM, ≤10 nM, ≤1 nM, ≤0.1 nM, ≤0.01 nM, o ≤0.001 nM (p. ej.: 10^{-8} M o menos, p. ej.: de 10^{-8} M a 10^{-13} M, p. ej.: de 10^{-9} M a 10^{-13} M). En determinadas representaciones, un anticuerpo contra CD3 se une a un epítopo de CD3 que se conserva entre CD3 de distintas especies.

El término “anticuerpo” se utiliza en el presente en el sentido más amplio y abarca varias estructuras de anticuerpos, incluidos entre otros los anticuerpos monoclonales, los anticuerpos policlonales, los anticuerpos multiespecíficos (p. ej.: anticuerpos biespecíficos) y los fragmentos de anticuerpos siempre y cuando exhiban la actividad deseada de unión al antígeno.

Un “fragmento de anticuerpo” hace referencia a una molécula distinta a un anticuerpo intacto que abarca una porción de un anticuerpo intacto que se une al antígeno al cual se une el anticuerpo intacto. Algunos ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen entre otros a los siguientes: Fv, Fab, Fab’, Fab’-SH, $F(ab')_2$; diacuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpos de cadena única (p. ej.: scFv) y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

Por “dominio de unión” se implica una parte de un compuesto o una molécula que se une de manera específica a un epítopo, antígeno, ligando o receptor objetivo. Los dominios de unión incluyen entre otros a anticuerpos (p. ej.: monoclonales, policlonales, recombinantes, humanizados y quiméricos), fragmentos de anticuerpos o porciones de ellos (p. ej.: fragmentos de Fab, Fab’2, anticuerpos scFv, SMIP, anticuerpos de dominio, diacuerpos, minicuerpos, scFv-Fc, aficuerpos, nanocuerpos y dominios de anticuerpos VH o VL), receptores, ligandos, aptámeros y otras moléculas que tengan un colaborador de unión identificado.

Un “agente quimioterapéutico” es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen a los agentes alquilantes como la tiotepa y la ciclosfosfamida (CYTOXAN®); los sulfonatos de alquilo como el busulfán, el improsulfán y el piposulfán; las aziridinas como la benzodopa, la carboquona, la meturedopa y la uredopa; las etileniminas y metilamelaminas incluida la altretamina, la trietilenomelamina, la trietilenofosforamida, la trietilenotiofosforamida y la trimetilomelamina; las acetogeninas (especialmente la bullatacina y la bullatacinona); el

delta-9-tetrahidrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); la beta-lapachona; el lapachol; las colchicinas; el ácido betulínico; una camptotecina (incluido el análogo sintético topotecán (HYCAMTIN®), la CPT-11 (irinotecán, CAMPTOSAR®), la acetilcamptotecina, escopolectina y 9-aminocamptotecina); la brioestatina; la caliestatina; CC-1065 (incluidos sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); la podofilotoxina; el ácido podofilínico; la teniposida; las criptoficinas (especialmente la criptoficina 1 y la criptoficina 8); la dolastatina; la duocarmicina (incluidos los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); la eleuterobina; la pancratiestatina; una sarcodictina; la espongiestatina; las mostazas de nitrógeno como el clorambucil, la clornafazina, la clorofosfamida, la estramustina, la ifosfamida, la mecloretamina, el clorhidrato de óxido de mecloretamina, el melfalán, la novembicina, la fenesterina, la prednimustina, la trofosfamida, la mostaza de uracilo; las nitroso úreas como la carmustina, la clorozotocina, la fotemustina, la lomustina, la nimustina y la ranimnustina; los antibióticos como los antibióticos de enedina (p. ej.: la calicheamicina, especialmente la calicheamicina gamma 1I y la calicheamicina omega Il (consulte, p. ej.: Nicolaou y otros, *Angew. Chem Intl. Ed. Engl.*, 33: 183-186 (1994)); el CDP323, un inhibidor oral de la integrina alfa-4, la dinemicina, incluida la dinemicina A; una espiramicina, como también el cromóforo de neocarzinoestatina y los cromóforos de antibióticos de la cromoproteína enediína relacionados), las aclacinomisinas, la actinomicina, la autramicina, la azaserina, las bleomicinas, la cactinomicina, la carabacina, la caminomicina, la carzinofilina, las cromomicinas, la dactinomicina, la daunorubicina, la detorubicina, la 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, la doxorubicina (incluidas ADRIAMYCIN®, morfolino-doxorubicina, cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina, inyección de liposoma de clorhidrato de doxorubicina (DOXIL®), doxorubicina liposomal TLC D-99 (MYOCET®), doxorubicina liposomal peglilada (CAELYX®) y deoxidoxorubicina), la epirubicina, la esorubicina, la idarubicina, la marcelomicina, las mitomicinas como la mitomicina C, el ácido micofenólico, la nogalamicina, las olivomicinas, la peplomicina, la porfiromicina, la puromicina, la quelamicina, la rodorubicina, la estreptonigrina, la estreptozocina, la turbecidina, el ubenimex, la zinoestatina, la zorubicina; los antimetabolitos como el metotrexato, la gemcitabina (GEMZAR®), el tegafur (UFTORAL®), la capecitabina (XELODA®), una epotilona y el 5-fluorouracilo (5-FU); la combrestatina; los análogos de ácido fólico como la denopterina, el metotrexato, la pteropterina, el trimetrexato; los análogos de purina como la fludarabina, la 6-mercaptopurina, la tiamiprina, la tioguanina; los análogos de pirimidina como la ancitabina, la azacitidina, la 6-azauridina, el carmofuro, la citarabina, la dideoxiuridina, la doxifluridina, la enocitabina, la fluxoridina; los andrógenos como la calusterona, el propionato de dromostanolona, el epitiostanol, el mepitiostano, la testolactona; los antiadrenales como la aminoglutetimida, el mitotano, el trilostano; el reabastecedor de ácido fólico como el ácido frolínico, la aceglatona; el glicósido de aldofosfamida; el ácido aminolevulínico; el eniluracilo; la amsacrina; el bestrabucilo, el bisantreno; el edatraxato; la defofamina; la demecolcina; la diaziquona; el elformitina; el acetato de eliptinio; una epotilona; el

etoglúcido; el nitrato de galio; la hidroxiúrea; el lentinano; la lonidainina; los maitansinoides como la maitansina y las ansamitocinas; la mitoguazona; la mitoxantrona; el mopidanmol; la nitraerina; la pentoestatina; el fenamet, la pirarubicina; la losoxantrona; la 2-etilhidrazida; la procarbazina; el complejo de polisacáridos PSK® (JHS Natural Products, Eugene, Oreg.); el razoxano; la rizoxina; el sizofurano; el espirogermanio; el ácido tenuazónico; la triaziquona; la 2,2",2"-triclorotrietilamina; los tricotecenos (especialmente la toxina T-2, la verracurina A, la roridina A y la anguidina); el uretano; la vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®); la dacarbazina; la manomustina; el mitobronitol; el mitolactol; el pipobromán; la gacitosina; la arabinosida ("Ara-C"); la tiotepa; el taxoide, p. ej: el paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), la fórmula de nanopartículas de paclitaxel diseñadas a partir de la albúmina (ABRAXANE™) y el docetaxel (TAXOTERE®, Rhome-Poulene Rorer, Antony, Francia); el cloranbucilo; la 6-tioguanina; la mercaptopurina; el metotrexato; los agentes del platino como el cisplatino, el oxaliplatino (p. ej.: ELOXATIN®) y el carboplatino; las vincas, que evitan la polimerización de la tubulina de los microtúbulos en formación, incluida la vinblastina (VELBAN®), la vincristina (ONCOVIN®), la vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®) y la vinorelbina (NAVELBINE®); el etopósido (VP-16); la ifosfamida; la mitoxantrona; la leucovorina; la novantrona; el edatrexato; la daunomicina; la aminopterina; el ibandronato; el inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; la difluorometilornitina (DMFO); los retinoides como el ácido retinóico, incluido el bexaroteno (TARGRETIN®); los bisfosfonatos como el clodronato (por ejemplo, BONEFOS® u OSTAC®), el etidronato (DIDROCAL®), el NE-58095, el ácido zoledrónico/zoledronato (ZOMETA®), el alendronato (FOSAMAX®), el pamidronato (AREDIA®), el tiludronato (SKELID®) o el risedronato (ACTONEL®); la troxacitabina (un análogo de la citosina nucleósida 1,3-dioxolano); los oligonucleótidos antisentido, especialmente aquellos que inhiben la expresión de los genes que se encuentran en las rutas de señalización, implicados en la proliferación de células aberrantes, como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R) (p. ej.: el erlotinib (Tarceva™)); y el VEGF-A que reduce la proliferación celular; las vacunas como la vacuna THERATOPE® y las vacunas de terapias genéticas, por ejemplo, la vacuna ALLOVECTIN®, la vacuna LEUVECTIN® y la vacuna VAXID®; el inhibidor de la topoisomerasa 1 (p. ej.: LURTOTECAN®); el rmRH (p. ej.: ABARELIX®); el BAY439006 (sorafenib; Bayer); el SU-11248 (sunitinib, SUTENT®, Pfizer); la perifosina, el inhibidor de COX-2 (p. ej.: celecoxib o etoricoxib), el inhibidor del proteosoma (p. ej.: PS341); el bortezomib (VELCADE®); el CCI-779; el tipifarnib (R11577); el orafenib, el ABT510; el inhibidor de Bcl-2, como el sodio oblimersen (GENASENSE®); la pixantrona; los inhibidores de EGFR; los inhibidores de la tirosina quinasa; los inhibidores de la serina-treonina quinasa como la rapamicina (sirolimus, RAPAMUNE®); los inhibidores de la farnesiltransferasa como el lonafarnib (SCH 6636, SARASAR™) y las sales, los ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores que sean farmacéuticamente aceptables; como también las combinaciones de dos o más de los anteriores como el CHOP, una

abreviatura para un tratamiento combinado de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisolona; y FOLFOX, una abreviatura para un régimen de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATIN™) combinado con 5-FU y leucovorina, y las sales, los ácidos o los derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores, como también las combinaciones de dos o más de los anteriores.

Los agentes quimioterapéuticos como se definen en el presente incluyen a los "agentes antihormonales" o "terapéuticos endocrinos" que actúan para regular, reducir, bloquear o inhibir los efectos de las hormonas que pueden fomentar el crecimiento del cáncer. Puede tratarse de hormonas en sí mismas, incluidas entre otras: antiestrógenos y moduladores selectivos del receptor del estrógeno (SERM), incluidos, por ejemplo, el tamoxifeno (incluido el tamoxifeno NOLVADEX®), el raloxifeno, el droloxifeno, el 4-hidroxitamoxifeno, el trioxifeno, el keoxifeno, el LY117018, la onapristona y el FARESTON.cndot.toremifeno; los inhibidores de la aromatasa que inhiben la enzima aromatasa, que regula la producción de estrógeno en las glándulas de adrenalina, como, por ejemplo, los 4(5)-imidazoles, la aminoglutetimida, el acetato de megestrol MEGASE®, el exemestano AROMASIN®, el formestanio, el fadrozol, el vorozol RIVISOR®, el letrozol FEMARA® y el anastrozol ARIMIDEX®; y los antiandrógenos como la flutamida, la nilutamida, la bicalutamida, la leuprolida y la goserelina; como también la troxacitabina (un análogo de la citosina 1,3-dioxolano nucleósida); los oligonucleósidos antisentido, especialmente aquellos que inhiben la expresión de genes en las rutas de señalización implicadas en la proliferación de células aberrantes, como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf y H-Ras; las ribozimas como un inhibidor de la expresión de VEGF (p. ej.: ribozima ANGIOZYME®) y un inhibidor de la expresión de HER2; las vacunas como las vacunas de terapia genética, por ejemplo, la vacuna ALLOVECTIN®, la vacuna LEUVECTIN® y la vacuna VAXID®; PROLEUKIN® rIL-2; el inhibidor de la topoisomerasa 1 LURTOTECAN®; ABARELIX® rmRH; la vinorelbina y las espiramicinas (consulte la Pat. de los EE. UU. N.° 4,675,187), y las sales, los ácidos y los derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores; como también las combinaciones de dos o más de los anteriores.

El término anticuerpo "quimérico" hace referencia a un anticuerpo en el cual una porción de la cadena pesada o liviana se deriva de una fuente o especie en particular, mientras que el resto de la cadena pesada o liviana se deriva de una fuente o especie diferente.

El término "grupo de diferenciación 3" o "CD3", como se utiliza en el presente, hace referencia a cualquier CD3 nativo de cualquier fuente vertebrada, incluidos los mamíferos como los primates (p. ej.: humanos) y los roedores (p. ej.: ratones y ratas), a menos que se indique lo contrario, incluidas, por ejemplo, las cadenas CD3ε, CD3γ, CD3α y CD3β. El término abarca CD3 no procesados, de "longitud completa" (p. ej.: CD3ε o CD3γ no procesados o no modificados), como también cualquier forma de CD3 que surge como resultado del procesamiento en la célula. El término también abarca las variantes de CD3 de ocurrencia natural, incluidas, por ejemplo, las variantes de unión o las variantes alélicas. El CD3 incluye, por ejemplo, la proteína CD3ε humana (NCBI RefSeq

No. NP_000724), que tiene 207 aminoácidos de longitud y la proteína CD3γ humana (NCBI RefSeq No. NP_000064), que tiene 182 aminoácidos de longitud.

La "clase" de un anticuerpo hace referencia al tipo de dominio constante o región constante que posee su cadena pesada. Existen cinco clases principales de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), p. ej.: IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4, IgA_1 e IgA_2. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan α, δ, ε, γ y μ, respectivamente.

Se comprende que los aspectos y las representaciones de la invención descritos en el presente incluyen el "abarcamiento", "la consistencia", y la "consistencia esencialmente de" aspectos y representaciones.

El término "agente citotóxico" como se utiliza en el presente hace referencia a una sustancia que inhibe o evita la función celular o bien causa la muerte o destrucción celular. Los agentes citotóxicos incluyen, entre otros, a los isotopos radioactivos (p. ej.: At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32}, Pb^{212} y a los isotopos radioactivos de Lu); agentes o medicamentos quimioterapéuticos (p. ej.: metotrexato, adriamicina, alcaloides de vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorubicina, melfalán, mitomicina C, clorambucilo, daunorubicina u otros agentes interalantes); agentes inhibitorios del crecimiento; enzimas y fragmentos de los anteriores como enzimas nucleolíticas; antibióticos; toxinas como toxinas de moléculas pequeñas o toxinas enzimáticamente activas de origen bacterial, fúngico, vegetal o animal, incluidos fragmentos o variantes de las anteriores; y los varios agentes antitumorales o anticancerígenos divulgados a continuación.

Un "trastorno" es cualquier afección que se beneficiaría con el tratamiento, incluidos, entre otros, los trastornos o las enfermedades crónicas y agudas que incluyen a aquellas afecciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión.

Los términos "trastorno proliferativo celular" y "trastorno proliferativo" hacen referencia a trastornos que están relacionados con algún grado de proliferación celular anormal. En una representación, el trastorno proliferativo celular es cáncer. En una representación, el trastorno proliferativo celular es un tumor.

Los términos "cáncer" y "cancerígeno" hacen referencia a, o describen la afección fisiológica de los mamíferos que suele estar caracterizada por un crecimiento celular incontrolado. Algunos ejemplos de cánceres incluyen entre otros, al carcinoma, al linfoma, al blastoma, al sarcoma y a la leucemia o las malignidades linfáticas. Ejemplos más concretos de dichos cánceres incluyen, entre otros, al cáncer de células escamosas (*p. ej.:* cáncer de células escamosas epiteliales), al cáncer de pulmón, incluido el cáncer de pulmón de células pequeñas, al cáncer de pulmon de células no pequeñas, al adenocarcinoma de pulmón y al carcinoma escamoso de pulmón, al cáncer peritoneal, al cáncer hepatocelular, al cáncer gástrico o de estómago, que incluye al cáncer gastrointestinal y al cáncer estromal gastrointestinal, al cáncer pancreático, al glioblastoma, al cáncer cervical, al cáncer de ovarios, al cáncer de hígado, al cáncer de

vejiga, al cáncer de vías urinarias, al hepatoma, al cáncer de mama, al cáncer de colon, al cáncer rectal, al cáncer colorectal, al cáncer endometrial o carcinoma uterino, al carcinoma de glándulas salivares, al cáncer de riñón o renal, al cáncer de próstata, al cáncer de vulva, al cáncer de tiroides, al carcinoma hepático, al carcinoma anal, al carcinoma peneano, al melanoma, al melanoma de esparcimiento superficial, al melanoma de léntigo maligno, a los melanomas lentiginoso acral, a los melanomas nodulares, al mieloma múltiple y al linfoma de células B (incluido el linfoma de bajo grado/no Hodgkin folicular (NHL); NHL linfocítico pequeño (SL); de grado intermedio/NHL folicular; NHL difuso de grado intermedio; NHL inmunoblástico de alto grado; NHL linfoblástico de alto grado; NHL de células no adheridas pequeñas de alto grado; NHL de enfermedad voluminosa; linfoma de células del manto; linfoma relacionado con el SIDA; y Macroglobulinemia de Waldenstrom); leucemia linfocítico crónico (CLL); leucemia linfoblástica aguda (ALL); leucemia de células capilares; leucemia mieloblástica crónica; y trastorno linfoproliferativo posterior a transplantes (PTLD), como también proliferación vascular anormal asociada con facomatosis, edema (como los que están asociados con tumores cerebrales), síndrome de Meigs, cáncer de cerebro, como también cáncer de cabeza y cuello, como también las metástasis asociadas. En determinadas representaciones, los cánceres que son sensibles al tratamiento con los anticuerpos de la invención incluyen al cáncer de mama, al cáncer colorectal, al cáncer rectal, al cáncer de pulmón de células no pequeñas, al glioblastoma, al linfoma no Hodgkins (NHL), al cáncer de células renales, al cáncer de próstata, al cáncer de hígado, al cáncer pancreático, al carcinoma de tejidos blandos, al sarcoma de Kaposi, al carcinoma carcinoide, al cáncer de cabeza y cuello, al cáncer de ovarios, al mesotelioma y al mieloma múltiple. En algunas representaciones, el cáncer se selecciona entre: cáncer de pulmón de células pequeñas, gliblastoma, neuroblastoma, melanoma, carcinoma de mama, cáncer gástrico, cáncer colorectal (CRC) y carcinoma hepatocelular. De todos modos, en algunas representaciones, el cáncer se selecciona entre: cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer colorectal, glioblastoma y carcinoma de mama, incluidas las formas metastásicas de dichos cánceres. En otras representaciones, el cáncer se seleccionó de una clase de cánceres de células B maduras excluido el Linfoma de Hodgkin pero incluido el linfoma de células B semejantes a las del centro germinal (GCB) DLBCL, linfoma de células semejantes a la célula B activada (ABC) DLBCL, linfoma folicular (FL), linfoma de células de manto (MCL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfoide crónica (CLL), linfoma de zona marginal (MZL), leucemia linfocítica de célula pequeña (SLL), linfoma linfoplasmocítico (LL), macroglobulinemia de Waldenstrom (WM), linfoma del sistema nervioso central (CNSL), linfoma de Burkitt (BL), leucemia prolinfocítica de células B, linfoma esplénico de zona marginal, leucemia de células capilares, linfoma o leucemia esplénico, inclasificable, linfoma esplénico difuso de linfocitos pequeños de pulpa roja, variante de leucemia de células capilares, macroglobulinemia de Waldenström, enfermedades de cadenas pesadas, enfermedad de cadenas alfa, enfermedad de cadenas gamma, enfermedad de cadenas μ, mieloma de

células plasmáticas, plasmocitoma óseo solitario, plasmocitoma extraóseo, linfoma de zona marginal extranodal de tejido linfoide asociado a mucosa (linfoma MALT), linfoma de zona marginal nodal, linfoma de zona marginal nodal pediátrico, linfoma folicular pediátrico, linfoma primario cutáneo de células del centro folicular, linfoma de células grandes B rico en células T/ histiocitos, linfoma DLBCL primario del sistema nervioso central, linfoma DLBCL cutáneo primario, linfoma tipo pierna, linfoma DLCBCL difuso de células B grandes positivo al virus de Epstein-Barr del anciano, DLBCL asociado con la inflamación crónica, granulomatosis linfomatoide, linfoma primario mediastinal de células B grandes (tímico), linfoma de células B grandes intravascular, linfoma de células B grandes positivo al ALK, linfoma plasmoblástico, linfoma de células B grandes tras enfermedad de Castleman multicéntrica asociada a infección por virus HHV8, linfoma primario de efusión: linfoma de células B, inclasificable, con características intermedias entre linfoma difuso de células B grandes y linfoma de Burkitt, y linfoma de células B, inclasificable, con características intermedias entre linfoma difuso de células B grandes y linfoma clásico de Hodgkin.

El término “tumor”, como se utiliza en el presente, hace referencia a todo crecimiento y proliferación de células neoplásicas, ya sea maligno o benigno, y a todas las células y los tejidos precancerosos y cancerosos. Los términos “cáncer”, “cancerígeno”, “trastorno proliferativo celular”, “trastorno proliferativo” y “tumor” no se excluyen el uno al otro según la referencia del presente.

El término “antígeno del tumor”, como se utiliza en el presente, puede comprenderse como aquellos antígenos que se presentan en las células tumorales. Estos antígenos pueden presentarse en la superficie celular con una parte extracelular, que con frecuencia se combina con una parte transmembranosa y citoplasmática de la molécula. Estos antígenos en ocasiones pueden presentarse solo mediante células tumorales y nunca mediante las células normales. Los antígenos del tumor pueden expresarse exclusivamente en las células tumorales o pueden representar una mutación específica del tumor en comparación con las células normales. En este caso, se denominan antígenos específicos del tumor. Son más comunes los antígenos del tumor que se presentan mediante células tumorales y células normales, y estos se denominan antígenos asociados con el tumor. Estos antígenos asociados con el tumor pueden sobreexpresarse en comparación con las células normales o son accesibles para unirse a anticuerpos en células tumorales debido a la estructura menos compacta del tejido del tumor en comparación con el tejido normal. En un aspecto, el antígeno del tumor se selecciona entre aquellos expuestos en la Tabla 1 a continuación.

Las “funciones del efector” hacen referencia a las actividades biológicas atribuíbles a la región Fc de un anticuerpo, que varían según el isotipo del anticuerpo. Algunos ejemplos de funciones del efector del anticuerpo incluyen: Unión a C1q y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC); unión al receptor de Fc; citotoxicidad mediada por célula dependiente del anticuerpo (ADCC); fagocitosis; regulación descendente de los receptores de la superficie celular (p. ej.: receptor de células B); y activación de células B.

Una “cantidad efectiva” de un compuesto, por ejemplo, un anticuerpo contra CD3 de la invención o un compuesto (p. ej.: compuesto farmacéutico) de este, es al menos la cantidad mínima necesaria para lograr el resultado terapéutico o profiláctico deseado, como una mejora o prevención medible de un trastorno en particular (p. ej.: un trastorno proliferativo celular, p. ej.: el cáncer). Una cantidad efectiva en el presente puede variar según factores como la etapa de la enfermedad, la edad, el sexo, el peso del paciente y la capacidad del anticuerpo para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad efectiva también es una cantidad en la cual cualquier efecto tóxico o perjudicial del tratamiento sea superado por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Con fines profilácticos, los resultados beneficiosos o deseados incluyen resultados como la eliminación o reducción del riesgo, la disminución de la gravedad o el retraso en la aparición de la enfermedad, incluidos los síntomas bioquímicos, histológicos o conductuales de la enfermedad, sus complicaciones y los fenotipos patológicos intermedios que se presentan durante el desarrollo de la enfermedad. Con fines terapéuticos, los resultados beneficiosos o deseados incluyen los resultados clínicos como la reducción de uno o más síntomas causados por la enfermedad, el aumento de la calidad de vida de quienes sufren la enfermedad, la disminución en la dosis de otros medicamentos necesarios para tratar la enfermedad, la mejora en el efecto de otro medicamento como en la selección de ruta, el retraso en el progreso de la enfermedad o la prolongación de la supervivencia. En el caso del cáncer o el tumor, una cantidad efectiva del medicamento puede tener efecto a la hora de reducir la cantidad de células cancerígenas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (es decir, lentificar en alguna medida o deseablemente detener) la infiltración de células cancerígenas en los órganos periféricos; inhibir (es decir, lentificar en alguna medida y deseablemente detener) la metástasis tumoral; inhibiendo en alguna medida el crecimiento del tumor; o aliviar en alguna medida uno o más de los síntomas relacionados con el trastorno. Una cantidad efectiva puede administrarse en una o más administraciones. Para los fines de esta invención, una cantidad efectiva del medicamento, compuesto o compuesto farmacéutico es una cantidad suficiente para lograr el tratamiento profiláctico o terapéutico ya sea de manera directa o indirecta. Como se comprende en el contexto clínico, una cantidad efectiva de un medicamento, compuesto o compuesto farmacéutico puede o no lograrse en conjunto con otro medicamento, compuesto o compuesto farmacéutico. De esta manera, una “cantidad efectiva” puede considerarse en el contexto de la administración de un agente terapéutico o más, y un agente solo puede considerarse como administrado en una cantidad efectiva si, en conjunto con uno o más agentes, es posible o se logra obtener un resultado deseable.

El término “región Fc” en el presente se utiliza para definir una región del punto terminal C de una cadena pesada de inmunoglobulina que contiene al menos una porción de la región constante. El término incluye las regiones Fc de secuencia nativa y las regiones Fc variantes. En una representación, una región Fc de una cadena pesada de IgG humana se extiende desde Cys226 o bien desde Pro230, hasta el miembro carboxilo

terminal de la cadena pesada. No obstante, la lisina del punto terminal C (Lys447) de la región Fc puede o no estar presente. A menos que se especifique lo contrario en el presente, la numeración de los residuos de aminoácidos en la región Fc o la región constante se realiza según el sistema de numeración de la UE, también denominado índice de la UE, como se describe en Kabat y otros, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (Secuencias de proteínas de interés inmunológico), 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health (5.ta edición, Servicio de Salud Pública, Institutos Nacionales de Salud), Bethesda, MD, 1991.

El "marco" o "FR" hace referencia a los residuos de dominio variable distintos a los residuos de la región hipervariable (HVR). El FR de un dominio variable por lo general consta de cuatro dominios FR: FR1, FR2, FR3 y FR4. Por consiguiente, las secuencias HVR y FR por lo general aparecen en la siguiente secuencia en VH (o VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

Los términos "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto" y "anticuerpo entero" se utilizan en el presente de manera intercambiable para hacer referencia a un anticuerpo que tiene una estructura sustancialmente similar a la estructura de un anticuerpo nativo o que tiene cadenas pesadas que contienen una región Fc como la definida en el presente.

Cuando se utiliza en el presente, un "agente inhibidor del crecimiento" hace referencia a un compuesto o una composición que inhibe el crecimiento de una célula, ya sea *in vitro* o *in vivo*. En una representación, el agente inhibidor del crecimiento es un anticuerpo inhibidor del crecimiento que evita o reduce la proliferación de una célula que expresa un antígeno al cual se une el anticuerpo. En otra representación, el agente inhibidor del crecimento puede ser uno que reduzca significativamente el porcentaje de células que se encuentran en la etapa S. Los ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen a agentes que bloquean el progreso del ciclo celular (en un lugar distinto a la etapa S), como los agentes que inducen la detención de G1 y la detención de la etapa M. Algunos bloqueadores clásicos de la etapa M incluyen a las vincas (vincristina y vinblastina), los taxanos y los inhibidores de la topoisomerasa II como la doxorubicina, la epirubicina, la daunorubicina, el etopósido y la bleomicina. Aquellos agentes que detienen G1 también se derraman hacia la detención de la etapa S, por ejemplo, los agentes alkilantes del ADN como el tamoxifeno, la prednisona, la dacarbazina, la mecloretamina, el cisplatino, el metotrexato, el 5-fluorouracilo y la ara-C. Puede encontrar más información en Mendelsohn e Israel, eds., The Molecular Basis of Cancer (La base molecular del cáncer), Chapter 1, entitled "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" (Capítulo 1, titulado "Regulación del ciclo celular, oncogenes y medicamentos antineoplásicos) de Murakami y otros. (W.B. Saunders, Filadelfia, 1995), p. ej.: pág. 13. Los taxanos (paclitaxel y docetaxel) son medicamentos contra el cáncer que se derivan del árbol de tejo. El docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), derivado del tejo europeo, es un análogo semisintético del paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). El paclitaxel y el docetaxel fomentan la formación de microtúbulos desde los dímeros de tubulina y

estabilizan los microtúbulos al evitar la depolimerización, que provoca la inhibidición de la mitosis celular.

El término cáncer "positivo para HER2" abarca las células de cáncer que tienen niveles de HER2 superiores a los normales. Los ejemplos de cáncer positivo para HER2 incluyen al cáncer de mama positivo para HER2 y al cáncer gástrico positivo para HER2. Opcionalmente, el cáncer positivo para HER2 tiene un puntaje inmunohistoquímico (IHC) de 2+ o 3+ o una hibridización in situ (ISH) con un cociente de amplificación 2.0.

Los términos "célula huésped", "línea celular huésped" y "cultivo celular huésped" se utilizan de manera intercambiable y hacen referencia a las células en las cuales se ha introducido ácido nucléico exógeno, incluida la progenie de dichas células. Las células huésped incluyen a "transformantes" y "células transformadas", que incluyen a la célula transformada principal y a la progenie derivada de allí sin importar la cantidad de pasajes. Es posible que la progenie no sea completamente idéntica en cuanto al contenido de ácido nucléico con respecto a una célula progenitora, sino que puede contener mutaciones. Una progenie mutante que tiene la misma función o actividad biológica que la cribada o seleccionada en la célula transformada originalmente se incluye en el presente.

Un "anticuerpo humano" es un anticuerpo que posee una secuencia de aminoácidos que se corresponde a aquella de un anticuerpo producido por un humano o una célula humana o derivada de una fuente no humana que utiliza repertorios de anticuerpos humanos u otras secuencias de codificación de anticuerpos humanos. Esta definición de un anticuerpo humano excluye de manera específica a un anticuerpo humanizado que consta de residuos de uniones antigénicas no humanas. Los anticuerpos humanos pueden producirse mediante el uso de varias técnicas conocidas en la materia, incluidas las genotecas de exposición en fagos. Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks *y otros.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991). También disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos se encuentran los métodos descritos en Cole *y otros*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy (Anticuerpos monoclonales y tratamiento del cáncer)*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner *y otros*, *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991). Consulte también van Dijk y van de Winkel, *Curr. Opin. Farmacol.*, 5: 368-74 (2001). Los anticuerpos humanos pueden prepararse mediante la administración de un antígeno a un animal transgénico que ha sido modificado para producir dichos anticuerpos en respuesta a un desafío antigénico, pero cuyos loci endógenos han sido desactivados, p. ej.: xenoratones inmunizados (consulte, p. ej.: las Patentes de los EE. UU. N.° 6.075.181 y 6.150.584 con respecto a la tecnología XENOMOUSE™). Consulte también, por ejemplo, Li *y otros*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006) con respecto a los anticuerpos humanos generados mediante tecnología de hibridoma de células B humanas.

Un "marco de consenso humano" es un marco que representa los residuos de aminoácidos de ocurrencia más común en una selección de secuencias marco VL o VH de inmunoglobulina humana. Por lo general, la selección de secuencias VL o VH de

inmunoglobulina humana proviene de un subgrupo de secuencias de dominio variable. Por lo general, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como en Kabat y otros, *Sequences of Proteins of Immunological Interest (Secuencias de proteínas de interés inmunológico)*, Fifth Edition, NIH Publication (Quinta edición, Publicación del NIH) 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3. En una representación, para el VL, el subgrupo es el subgrupo kappa I como en Kabat y otros, *supra.* En una representación, para el VH, el subgrupo es el subgrupo III como en Kabat y otros, *supra*.

Un anticuerpo "humanizado" hace referencia a un anticuerpo quimérico que abarca residuos de aminoácidos de HVR no humanos y residuos de aminoácidos de FR humanos. En determinadas representaciones, un anticuerpo humanizado abarcará sustancialmente la totalidad de al menos uno y típicamente dos dominios variables, en los cuales todos o sustancialmente todos los HVR (p. ej. CDR) corresponden a aquellos de un anticuerpo no humano, y todos o sustancialmente todos los FR corresponden a aquellos de un anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado opcionalmente puede abarcar al menos una porcion de una región constante de anticuerpo derivada de un anticuerpo humano. Una "forma humanizada" de un anticuerpo, p. ej.: un anticuerpo no humano, hace referencia a un anticuerpo que fue sometido a la humanización.

El término "región hipervariable" o "HVR" como se utiliza en el presente hace referencia a cada una de las regiones de un dominio variable de anticuerpo que resulta hipervariable en secuencia ("regiones determinantes de complementaridad" o "CDR") o contiene los residuos que establecen contacto con el antígeno ("contactos de antígeno"). Por lo general, los anticuerpos abarcan seis HVR: tres en VH (H1, H2, H3) y tres en VL (L1, L2, L3). Los HVR ejemplares en el presente incluyen:

(a) bucles hipervariables que ocurren en los residuos de aminoácidos 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) (Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987));

(b) CDR que ocurren en los residuos de aminoácidos 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35b (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) (Kabat y otros*., Sequences of Proteins of Immunological Interest (Secuencias de proteínas de interés inmunológico)*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health (5.ta edición, Servicio de Salud Pública, Institutos Nacionales de Salud), Bethesda, MD (1991));

(c) contactos con antígenos que ocurren en los residuos de aminoácidos 27c-36 (L1), 46-55 (L2), 89-96 (L3), 30-35b (H1), 47-58 (H2) y 93-101 (H3) (MacCallum y otros. *J. Mol. Biol.* 262: 732-745 (1996)) y

(d) combinaciones de (a), (b), o (c), que incluyen los residuos de aminoácidos HVR 46-56 (L2), 47-56 (L2), 48-56 (L2), 49-56 (L2), 26-35 (H1), 26-35b (H1), 49-65 (H2), 93-102 (H3) y 94-102 (H3).

A menos que se indique lo contrario, los residuos de HVR y otros residuos del dominio variable (p. ej.: residuos FR) están numerados en el presente según Kabat y otros, *supra*.

Un "inmunoconjugado" es un anticuerpo conjugado en una o más moléculas heterólogas,

incluido entre otros, un agente citotóxico.

Un "sujeto" o un "individuo" es un mamífero. Los mamíferos incluyen, entre otros, a los animales domésticos (p. ej.: vacas, ovejas, gatos, perros y caballos), primates (p. ej.: primates humanos y no humanos, como los monos), conejos y roedores (p. ej.: ratones y ratas). En determinadas representaciones, el sujeto o individuo es un humano.

Un anticuerpo "aislado" es uno que ha sido separado de un componente de su entorno natural. En algunas representaciones, un anticuerpo es purificado a más del 95% o del 99% de pureza según lo determinado por, por ejemplo, métodos electroforéticos (p. ej.: SDS-PAGE, concentración isoeléctrica (IEF), electroforesis capilar) o cromatográficos (p. ej.: intercambio de iones o HPLC de fase inversa). Para revisar los métodos de evaluación de la pureza de los anticuerpos, consulte, p. ej.: Flatman y otros, *J. Chromatogr. B* 848:79-87 (2007).

Un ácido nucléico "aislado" hace referencia a una molécula de ácido nucléico que fue separada de un componente de su entorno natural. Un ácido nucléico aislado incluye a una molécula de ácido nucléico contenida en células que comúnmente contienen a la molécula de ácido nucléico, pero la molécula de ácido nucléico se encuentra presente de manera extracromosómica o en una ubicación cromosómica que es diferente a su ubicación cromosómica natural.

La "codificación del ácido nucléico aislado de un anticuerpo contra CD3" hace referencia a una o más moléculas de ácido nucléico que codifican cadenas pesadas y livianas de anticuerpos (o fragmentos de ellas), incluidas dichas moléculas de ácido nucléico de un solo vector o de vectores separados, y dichas moléculas de ácido nucléico presentes en una o más ubicaciones en una célula huésped.

El término "anticuerpo monoclonal" como se utiliza en el presente, hace referencia a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que abarcan la población son idénticos o se unen al mismo epítopo, excepto en el caso de los anticuerpos con posibles variantes, p. ej.: que contienen mutaciones de ocurrencia natural o surgen durante la producción de una preparación de anticuerpos monoclonales, dichas variantes por lo general están presentes en cantidades menores. En contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales, que típicamente incluyen anticuerpos diferentes dirigidos contra determinantes diferentes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales se dirige contra un solo determinante en un antígeno. De esta manera, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea y no debe interpretarse como que es necesaria la producción del anticuerpo mediante ningún método en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se utilizarán en conformidad con la presente inversión pueden fabricarse mediante una variedad de técnicas, incluidas entre otras, el método de hibridoma, los métodos de ADN recombinante, los métodos de exposición de fagos y los métodos que y los métodos que utilizan animales transgénicos que contienen todos o parte de los loci de la inmunoglobulina humana, dichos métodos y

otros métodos ejemplares para fabricar anticuerpos monoclonales se describen en el presente.

Un “anticuerpo desnudo” hace referencia a un anticuerpo que no está conjugado en una fracción heteróloga (p. ej.: una fracción citotóxica) o radioetiqueta. El anticuerpo desnudo puede estar presente en una formulación farmacéutica.

Los “anticuerpos nativos” hacen referencia a moléculas de inmunoglobulina de ocurrencia natural con estructuras variantes. Por ejemplo, los anticuerpos nativos de IgG son glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150,000 dáltones, compuestas de dos cadenas livianas idénticas y dos cadenas pesadas idénticas que están unidas por un bisulfuro. Desde N- hasta C-terminal, cada cadena pesada tiene una región variable (VH), también denominada dominio pesado variable o un dominio variable de cadena pesada, seguido por tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3). Similarmente, desde N- hasta C-terminal, cada cadena liviana tiene una región variable (VL), también denominada dominio liviano variable o un dominio variable de cadena liviana, seguido por un dominio liviano constante (CL). La cadena liviana de un anticuerpo puede estar asignada a uno de dos tipos, denominados kappa (κ) y lambda (λ), según la secuencia de aminoácidos de su dominio constante.

El término “prospecto” se utiliza para hacer referencia a las instrucciones que habitualmente se incluyen en los paquetes comerciales de los productos terapéuticos, que contienen información sobre las indicaciones, el uso, la dosis, la administración, los tratamientos combinados, las contraindicaciones o las advertencias con respecto al uso de dichos productos terapéuticos.

El término “antagonista de unión del eje de PD-1” hace referencia a una molécula que inhibe la interacción de un colaboración de unión al eje de PD-1 con uno o más de sus colaboradores de unión, para eliminar la disfunción de la célula T que surge como resultado de señalizar el eje de señalización de PD-1; con el resultado que es la restauración o mejora de la función de la célula T (p. ej.: proliferación, producción de citocinas, muerte de células objetivo). Como se lo utiliza en el presente, el antagonista de unión al eje PD-1 incluye un antagonista de unión a PD-1, un antagonista de unión a PD-L1 y un antagonista de unión a PD-L2.

El término “antagonista de unión a PD-1” se refiere a una molécula que disminuye, bloquea, inhibe, anula o interfiere en la transducción de señal resultante de la interacción de PD-1 con una o varias de sus moléculas de enlace, tales como PD-L1, PD-L2. En algunas representaciones, un antagonista de unión a PD-1 es una molécula que inhibe la unión de PD-1 a una o varias de sus moléculas de enlace. En un aspecto específico, el antagonista de unión a PD-1 inhibe la unión de PD-1 a PD-L1 o PD-L2. Por ejemplo, los antagonistas de PD-1 incluyen anticuerpos contra PD-1, fragmentos de unión a antígenos del mismo, inmunoadhesinas, proteínas de fusión, oligopéptidos y otras moléculas que disminuyen, bloquean, inhiben, anulan o interfieren con la transducción de señal resultante de la interacción de PD-1 con PD-L1 o PD-L2. En una representación, un antagonista de unión de PD-1 reduce la señal coestimulante negativa mediada por o a

través de proteínas de la superficie celular expresadas en linfocitos T, mediando la señal a través del PD-1 para representar una célula T disfuncional como menos disfuncional (p. ej.: realzando las respuestas del efector ante el reconocimiento del antígeno). En algunas representaciones, un antagonista de unión a PD-1 es un anticuerpo contra PD-1. En un aspecto específico, un antagonista de unión a PD-1 es MDX-1106 (nivolumab) descrito en el presente. En otro aspecto específico, un antagonista de unión a PD-1 es MK-3475 (lambrolizumab) descrito en el presente. En otro aspecto específico, un antagonista de unión a PD-1 es CT-011 (pidilizumab) descrito en el presente. En otro aspecto específico, un antagonista de unión a PD-1 es AMP-224 descrito en el presente.

El término "antagonista de unión a PD-L1" se refiere a una molécula que disminuye, bloquea, inhibe, anula o interfiere en la transducción de señal resultante de la interacción de PD-L1 con una o más de sus moléculas de enlace, tales como PD-1, B7-1. En algunas representaciones, un antagonista de unión a PD-L1 es una molécula que inhibe la unión de PD-L1 a sus colaboradores de enlace. En un aspecto específico, el antagonista de unión a PD-L1 inhibe la unión de PD-L1 a PD-1 o B7-1. En algunas representaciones, los antagonistas de unión a PD-L1 incluyen anticuerpos contra PD-L1, fragmentos de unión a antígenos del mismo, inmunoadhesinas, proteínas de fusión, oligopéptidos y otras moléculas que disminuyen, bloquean, inhiben, anulan o interfieren con la transducción de señal resultante de la interacción de PD-L1 con una o más de sus moléculas de enlace, tales como PD-1, B7-1. En una representación, un antagonista de unión a PD-L1 reduce la señal coestimulante negativa mediada por o a través de proteínas de la superficie celular expresadas en linfocitos T, mediando la señal a través del PD-L1 para representar una célula T disfuncional como menos disfuncional (p.ej.: realzando las respuestas del efector ante el reconocimiento del antígeno). En algunas representaciones, un antagonista de unión de la PD-L1 es un anticuerpo anti-PD-L1. En un aspecto específico, un anticuerpo anti-PD-L1 es el YW243.55.S70 descrito en el presente. En otro aspecto específico, un anticuerpo anti-PD-L1 es el MDX-1105 descrito en el presente. Otro aspecto específico especifica que un anticuerpo anti-PD-L1 es el MPDL3280A descrito en el presente. Otro aspecto específico especifica que un anticuerpo anti-PD-L1 es el MEDI4736 descrito en el presente.

El término "antagonista de unión de PD-L2" se refiere a una molécula que disminuye, bloquea, inhibe, anula o interfiere en la transducción de señal resultante de la interacción de PD-L2 con una o varias de sus moléculas de enlace, tal como la PD-1. En algunas representaciones, un antagonista de unión de PD-L2 es una molécula que inhibe la unión de PD-L2 y una o varias de sus moléculas de enlace. En un aspecto específico, el antagonista de unión de PD-L2 inhibe la unión del PD-L2 al PD-1. En algunas representaciones, los antagonistas de PD-L2 incluyen anticuerpos anti-PD-L2, fragmentos unificadores de antígenos del mismo, inmunoadhesinas, proteínas de fusión, oligopéptidos y otras moléculas que disminuyen, bloquean, inhiben, anulan o interfieren con la transducción de señal resultante de la interacción de PD-L2 con una o más de sus moléculas de enlace, tal como la PD-1. En una representación, un antagonista de unión de

PD-L2 reduce la señal coestimulante negativa mediada por o a través de proteínas de la superficie celular expresadas en linfocitos T, mediando la señal a través del PD-L2 para representar una célula T disfuncional como menos disfuncional (p.ej: realzando las respuestas de efector a un reconocimiento antígeno). En algunas representaciones, un antagonista de unión de PD-L2 es una inmunoadhesina.

A menos que se indique lo contrario, el término "proteína" aquí utilizado se refiere a cualquier proteína nativa de cualquier fuente vertebrada, incluyendo mamíferos tales como primates (p.ej humanos) y roedores (p.ej ratones y ratas). El término abarca proteínas "completas" sin procesar, así como también cualquier forma de proteína que resulte del procesamiento en la célula. El término también incluye variables naturales de la proteína, como por ejemplo variantes de empalme o alélicas. Las proteínas respectivas a la invención incluyen, por ejemplo, cualquier proteína enumerada en la Tabla 1.

"El porcentaje (%) de identidad de secuencias de aminoácidos" con respecto a una secuencia de polipéptido de referencia se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidato que es idéntica a los residuos de aminoácidos en la secuencia de polipéptidos de referencia, luego de alinear las secuencias e introducir espacios, si fuera necesario, para conseguir el porcentaje máximo de la identidad de secuencia, sin considerar cualquier sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. El proceso de alineación con el fin de determinar el porcentaje de la identidad de secuencia de aminoácidos puede lograrse de distintas maneras por expertos en la materia, por ejemplo, utilizando software informático de acceso público, tal como BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Aquellas personas expertas en la materia pueden determinar los parámetros adecuados para alinear secuencias, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir una alineación máxima sobre el largo completo de las secuencias en comparación. Sin embargo, los valores (%) de identidad de secuencia de aminoácidos se generan utilizando el programa informático de comparación de secuencias, ALIGN-2, para los fines aquí establecidos. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 fue creado por Genentech, Inc, mientras que el código fuente ha sido presentado con documentación del usuario en la Oficina de Derechos de Autor de E.E.U.U., Washington D.C., 20559, donde se inscribió bajo el N° de Registro de Derechos de Autor de E.E.U.U. TXU510087. El programa ALIGN-2 es de dominio público en Genentech, Inc., Sur de San Francisco, California, o puede recopilarse a partir del código fuente. El programa ALIGN-2 debe recopilarse para usar en un sistema operativo UNIX, incluyendo UNIX V4.OD digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias son establecidos por el programa ALIGN-2 y no varían.

En situaciones en las que se utiliza ALIGN-2 para comparar secuencias de aminoácidos, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos A dada con o contra una secuencia de aminoácidos B dada (que de manera alternativa puede plantearse como una secuencia de aminoácidos A dada que tiene o incluye un % de identidad de secuencia particular de aminoácidos con o contra una secuencia de aminoácidos B dada) se calcula de la siguiente manera:

100 veces la fracción X/Y

donde X es la cantidad de residuos de aminoácidos calificados como idénticamente compatibles por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en la alineación del programa de A y B, y donde Y es la cantidad total de residuos de aminoácidos en B. Ha de reconocerse que donde la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A a B no será igual al % de identidad de secuencia de aminoácidos de B a A. A menos que se establezca lo contrario, todos los valores de porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos utilizados en el presente se obtienen mediante el proceso descripto en el párrafo inmediatamente anterior utilizando el programa informático ALIGN-2.

El término "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación hecha de una manera que permita la actividad biológica de un ingrediente activo que ahí se contiene para ser eficaz, la cual no contiene componentes adicionales considerados inaceptablemente tóxicos para el sujeto para el cual se administraría dicha formulación.

Un "portador aceptable farmacéuticamente" es un ingrediente en una formulación farmacéutica, distinto de un ingrediente activo, que no se considera tóxico para un sujeto. Un portador aceptable farmacéuticamente incluye, aunque no exclusivamente, un tampón, excipiente, estabilizador o conservante.

Como se utiliza en el presente, la palabra "tratamiento" (y sus variaciones gramaticales tales como "tratar") alude a la intervención clínica en un intento de alterar el curso natural del individuo que se encuentra bajo tratamiento, lo cual puede realizarse por profilaxis o durante el curso de la patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen, pero no se limitan a, prevenir la ocurrencia o recurrencia de una enfermedad, aliviar los síntomas, disminuir cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, prevenir la metástasis, disminuir la tasa de evolución de la enfermedad, mejorar o paliar el estado de la enfermedad, y una remisión o un mejor pronóstico. En algunas representaciones, los anticuerpos de la invención son utilizados para retrasar el desarrollo de una enfermedad o disminuir su progreso.

El término "progresión retrasada" de un trastorno o enfermedad aquí utilizado implica postergar, dificultar, retrasar, estabilizar y/o posponer el desarrollo de la enfermedad o trastorno (p.ej: un trastorno proliferativo de células, p.ej: cáncer). Este retraso puede durar por variados lapsos de tiempo, dependiendo de la historia de la enfermedad y/o del individuo bajo tratamiento. Como es obvio para los expertos en la materia, un retraso suficiente o importante de hecho puede abarcar la prevención, ya que el individuo no desarrolla la enfermedad. Por ejemplo, se puede retrasar un cáncer en estado avanzado, como en el desarrollo de la metástasis.

"Disminuir" o "inhibir" implica la capacidad de causar un descenso global, por ejemplo, de un 20% o mayor, de un 50% o mayor, de un 75%, 85%, 90%, 95% o mayor. En ciertas representaciones, disminuir o inhibir puede referirse a la función efectora de un anticuerpo que se media por un anticuerpo de la región de fragmento cristalizable. Dicho

efector funciona específicamente, incluyendo citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA), y fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP).

El término "región variable" o "dominio variable" se refiere al dominio de un anticuerpo de cadena liviana o pesada que está involucrado en la unión del anticuerpo y el antígeno. Por lo general, los dominios variables de cadena pesada y cadena liviana (VH y VL, respectivamente) de un anticuerpo nativo tienen estructuras similares. Cada dominio comprende cuatro regiones altamente conservadas (FRs) y tres regiones hipervariables (RHVs). (Ver, p.ek, Kindt et ál. *Kuby Immunology*, 6ta Ed., W.H. Freeman and Co., página 91 (2007).) Un dominio VH o VL único puede ser suficiente para otorgar especificidad de unión al antígeno. Además, los anticuerpos que unen un antígeno particular pueden aislarse utilizando un dominio VH o VL de un anticuerpo que une el antígeno para tamizar una genoteca de dominios VH o VL complementarios, respectivamente. Ver, p.ej. Portolano et ál, *J. Immunol* 150:880-887 (1993); Clarkson et ál., *Nature* 352:624-628 (1991).

El término "vector" utilizado en el presente documento se refiere a la molécula nucleica ácida capaz de propagar otro ácido nucleico al cual está unida. El término incluye el vector como una estructura ácido nucleica autorreproductora, así como también el vector incorporado al genoma de una célula hospedadora en el cual ha sido introducido. Ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de los ácidos nucleicos a los que están unidos operativamente. En el presente documento nos referimos a dichos vectores como "vectores de expresión".

Como se usa en el presente, "administrar" implica un método de dar una dosis de un compuesto (p. ej. un anticuerpo de anti-CD3 de la invención o un ácido nucleico codificando un anticuerpo anti-CD3 de la invención) o una composición (p.ej, una composición farmacéutica. p.ej. una composición farmacéutica incluyendo un anticuerpo anti-CD3 de la invención) a un sujeto. Las composiciones utilizadas en los métodos descritos en el presente pueden administrarse, por ejemplo por vía intramuscular, intravenosa, intradermal, por vía percutánea, intraarterial, intraperitonal, intralesional, intracraneal, intraarticular, intraprostática, intrapleural, intratraqueal, intranasal, intravítrea, intravaginal, intrarectal, de forma tópica, por vía intratumoral, peritoneal, subcutánea, subconjuntival, intravesicular, mucosa, intrapericárdica, intraumbilical, intraocular, oral, tópica, local, por inhalación, por inyección, por infusión, por infusión contínua, por perfusión localizada lavando células diana directamente, por catéter, por lavado, en cremas o en composiciones lipídicas. El método de administración puede variar según diversos factores (p. ej. el compuesto o composición a administrar y la gravedad de la condición, enfermedad o trastorno bajo tratamiento).

II. COMPOSICIONES Y MÉTODOS

En parte, la invención se basa en anticuerpos anti-CD3. En ciertas representaciones, los anticuerpos anti-CD3 son multiespecíficos (es decir, biespecíficos) y, además de un CD3 o

un fragmento del mismo, unen una segunda molécula biológica (es decir, un antígeno de la superficie celular, p.ej: un antígeno tumoral). Los anticuerpos de la invención son útiles, por ejemplo, para tratar o retrasar el avance de un trastorno proliferativo de células (p.ej: cáncer) o un trastorno autoinmune, o para aumentar la función inmunológica en un sujeto que sufre dicho trastorno.

A. Anticuerpos anti-CD-3 modelo

En un aspecto, la invención produce anticuerpos aislados que se unen a CD3 (p.ej: CD3ε y/o CD3γ).

Por ejemplo, en algunas situaciones, un anticuerpo anti CD3 que tiene un primer dominio de unión puede comprender al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis regiones hipervariables (RHV) que se seleccionan de (a) una RHV-H1 que consta en una secuencia de aminoácidos con N°. de ID de SEC.: 1; (b) una RHV-H2 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.° de ID de SEC.: 2; (c) una RHV-H3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 3; (d) una RHV-L1 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 4; (e) una RHV-L2 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 5; y (f) una RHV-L3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 6. En algunos casos, el anticuerpo anti-CD3 contiene al menos una (por ejemplo, 1, 2, 3, o 4) de las regiones del marco de las cadenas pesadas FR-H1, FR-H2, FR-H3, y FR-H4 que consiste en las secuencias de N.º de ID de SEC.: 301-304, respectivamente, y/o al menos una (por ejemplo, 1, 2, 3, o 4) de las regiones del marco de la cadena liviana FR-L1, FR-L2, FR-L3, y FR-L4 que consiste en las secuencias de N.º de ID de SEC.: 305-308, respectivamente. En algunos casos, el anticuerpo anti-CD3 puede constar de un dominio de VH incluyendo una secuencia de aminoácidos con al menos una identidad de secuencia del 90% (p. ej., con una identidad de secuencia de al menos el 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%) con, o la secuencia de, N.° de ID de SEC.: 184 y/o un dominio de VL que consta de una secuencia de aminoácidos con al menos una identidad de secuencia del 90% (p. ej., con una identidad de secuencia de al menos el 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%) con, o la secuencia de, N.° de ID de SEC.: 185. En otros casos, el anticuerpo de anti-CD3 contiene al menos una (por ejemplo, 1, 2, 3, o 4) de las regiones del marco de las cadenas pesadas FR-H1, FR-H2, FR-H3, y FR-H4 que consiste en las secuencias de N.º de ID de SEC.: 293-296, respectivamente, y/o al menos una (por ejemplo, 1, 2, 3, o 4) de las regiones del marco de la cadena liviana FR-L1, FR-L2, FR-L3, y FR-L4 que consiste en las secuencias de N.º de ID de SEC.: 297-300, respectivamente. En algunos casos, el anticuerpo anti-CD3 puede constar de un dominio de VH incluyendo una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una identidad de secuencia del 90% (p. ej., con una identidad de secuencia de al menos el 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%) con, o la secuencia de, N.° de ID de SEC.: 186 y/o un dominio de VL que consta de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una identidad de secuencia del 90% (p. ej., con una identidad de secuencia de al menos el 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%,

98% o 99%) con, o la secuencia de, N.° de ID de SEC.: 187. En una situación particular, el anticuerpo anti-CD3 puede ser 40G5c, o un derivado o anticuerpo clonal del mismo.

En otro aspecto, un anticuerpo de la invención comprende (a) un dominio VH que incluye al menos uno, al menos dos o las tres secuencias RHV VH seleccionadas a partir de (i) una RHV-H1 que consta de una secuencia de aminoácidos con N.° de ID de SEC.: 1, (ii) una RHV-H2 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 2, y (iii) RHV-H3 que consta de una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del N.° de ID SEC.: 3; y (b) un dominio VH que incluye al menos uno, al menos dos o las tres secuencias RHV VH seleccionadas a partir de (i) una RHV-L1 que consta de una secuencia de aminoácidos con N.° de ID de SEC.: 4; (ii) una RHV-L2 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 5, y (iii) una RHV-L3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 6. En algunos casos, el anticuerpo anti-CD3 puede tener un dominio de VH que consta de una secuencia de aminoácidos con N.° de ID de SEC.: 184 y un dominio de VL que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 185. En algunos casos, el anticuerpo anti-CD3 puede tener un dominio de VH que consta de una secuencia de aminoácidos con N.° de ID de SEC.: 186 y un dominio de VL que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 187. En una situación particular, el anticuerpo anti-CD3 puede ser 40G5c, o un derivado o anticuerpo clonal del mismo.

En cualquiera de las versiones mencionadas anteriormente, se humaniza un anticuerpo anti-CD3. En una versión, un anticuerpo anti-CD3 incluye unas RHV como en cualquiera de las versiones anteriores. Además, abarca un marco receptor, p.ej. un marco de inmunoglubina humana o un marco de consenso humano.

En otro aspecto, se producen anticuerpos anti-CD3, en donde el anticuerpo abarca un VH como en todas las versiones provistas anteriormente, y un VL como en todas las versiones previas, en las que una o ambas secuencias de dominio variable incluyen modificaciones pos-traduccionales.

Otro rasgo indica que la invención produce un anticuerpo que se une al mismo epítope como un anticuerpo anti-CD3 provisto anteriormente. Por ejemplo, en ciertas versiones, se produce un anticuerpo que se une al mismo epítope que un anticuerpo anti-CD3 incluyendo un N.° de secuencia VH de ID de SEC.: 184 y un N.° de secuencia VL de ID de SEC.: 185. En ciertas versiones, se provee un anticuerpo que se une a un epítope dentro de un fragmento de CD3 (p.ej. CD3ε de humano), que consiste en aminoácidos 1-26 (N.° de ID de SEC.: 283) o 1-27 (N.º de ID de SEC.: 278) de la cadena CD3ε de humano.

En otro aspecto, la invención produce un anticuerpo que se une con un epítope CD3 único. En ciertas representaciones, el anticuerpo anti-CD3 de la invención hace un contacto único con aminoácidos de CD3ε de humano a una distancia de 3,5 ángstroms; 3,25 ángstroms; 3,00 ángstroms; 2,75 ángstroms, o menos. En algunas representaciones, se proporciona un anticuerpo que se une a un epítope que consta de uno, dos, tres, cuatro o cinco aminoácidos de CD3ε de humano a una distancia de 3,5 ángstroms; 3,25 ángstroms; 3,00 ángstroms; 2,75 ángstroms, o menos. En una versión, el anticuerpo anti-

CD3 de la invención entra en contacto únicamente con aminoácidos de CD3ε a una distancia de 3,5 ángstroms o menos. En ciertas versiones, se provee un anticuerpo que se une a un epítope comprendiendo uno, dos, tres, cuatro o cinco aminoácidos de la cadena CD3ε de humano a una distancia de 3,5 ángstroms o menos. Por ejemplo, en ciertas versiones, se provee un anticuerpo que se une a un epítope que consiste en aminoácidos de la cadena CD3ε de humano seleccionado de GIn1, Asp2, Asn4, Glu6 y Met7. En una versión en particular, en anticuerpo anti-CD3 se une a un epítope que incluye Glu6 específicamente. En otras versiones particulares, se provee un anticuerpo que no se une a un epítope que incluye aminoácido Glu5 de la cadena CD3ε de humano. En otras versiones particulares, se provee un anticuerpo que no se une a un epítope que incluye aminoácidos Gly3 y Glu5 de la cadena CD3ε de humano.

Se puede determinar un epítope anti-CD3 por un anticuerpo anti-CD3 unido a fragmentos péptídicos del epítope. Alternativamente, un epítope anti-CD3 mediante puede determinarse mediante mutagénesis por escaneo de alanina. En una representación, una reducción en la unión de un anticuerpo anti-CD3 a un CD3 mutado por un porcentaje de 20%, 30%, 50%, 80% o más indica que el residuo del aminoácido del CD3 mutado en un ensayo de mutagénesis por escaneo de alanina es un residuo de epítipe para ese anticuerpo anti-CD3. Alternativamente, un epítope anti-CD3 puede determinarse mediante espectrometría de masas. En algunas versiones, el epítope se determina por cristalografía (por ejemplo, métodos cristalográficos descriptos en los Ejemplos).

En algunas versiones, el epítope, tal como se establece por cristalografía, se determina utilizando aminoácidos Q1-M7 de CD3. En algunas versiones, el epítope, tal como se establece por cristalografía, se determina utilizando aminoácidos QDGNEEMGGITQTPYK (N.° de ID de SEC.: 284) de CD3.

En algunas versiones, el epítope, tal como se estableció por cristalografía, puede llevarse a cabo combinando el anticuerpo anti-CD3 Fab, disuelto en 0,15 m de NaCl, 25 mM tris, pH de 7,5 en 10 mg/mL, con un exceso molar del doble (1 mg) del péptido del complejo CD3ε y detectando inicialmente una matriz dispersa de precipitantes en un formato de difusión de vapor. Los cristales optimizados pueden desarrollarse en una mezcla 1:1 con una solución de depósito con 70% de v/v de metilpentano, y 0,1 m de tampón HEPES a un pH de 7,5. El depósito puede utilizarse como crioprotector. Los cristales pueden transferirse a temperatura criogénica por inmersión súbita en nitrógeno líquido.

Los datos de difracción de cristales pueden recopilarse en línea de haz del Advanced Photon Source 22ID, utilizando un detector CCD MAR300. Las defracciones registradas pueden integrarse y ampliarse utilizando el programa HKL2000.

La estructura puede escalonarse por el método de reemplazo molecular (MR) utilizando el programa Phaser. Por ejemplo, el modelo de búsqueda de MR es una sub-unidad Fab derivada de una estructura cristalina del complejo HGFA/Fab (código PDB: 2R0L). El péptido de complejo CD3ε se desarrolla en la estructura basada en un mapa Fo-Fc. Como consecuencia, la estructura puede refinarse utilizando los programas REFMAC5 y

PHENIX, implementando las funciones objetivo de probabilidad, el método de refinamiento de factor-B individual anisotrópico y el método de refinamiento TLS, para lograr la convergencia.

En otras versiones particulares, se produce un anticuerpo que incluye un paratopo que se une al mismo epítope que un anticuerpo anti-CD3 incluido en el presente. Por ejemplo, en ciertas versiones, se desarrolla un anticuerpo que se une al mismo epítope que un parotopo de anticuerpos anti-CD3 incluyendo aminoácidos que toman contacto a una distancia de 3,5 ángstroms o menos. En ciertas versiones, se provee un anticuerpo que se une al mismo epítope que un paratopo de anticuerpo anti-CD3 que consiste en aminoácidos de la región VH del anticuerpo anti-CD3 seleccionado del grupo, incluyendo 33Tyr, 35His, 50Trp, 97Tyr y 98Ser. En ciertas versiones, se provee un anticuerpo que se une al mismo epítope que un paratopo de anticuerpo anti-CD3, que consiste en uno, dos, tres, cuatro o cinco aminoácidos de la región VH de un anticuerpo anti-CD3 seleccionado del grupo que incluye 33Tyr, 35His, 50Trp, 97Tyr y 98Ser. En ciertas versiones, se provee un anticuerpo que se une al mismo epítope que un paratopo de anticuerpo anti-CD3, que consiste en aminoácidos de la región VL de un anticuerpo anti-CD3 seleccionado del grupo, incluyendo 27Arg, 27Asn, 30Lys, 32Tyr y 92Phe, 94Leu y 96Arg. En ciertas versiones, se provee un anticuerpo que se une al mismo epítope que un paratopo de anticuerpo anti-CD3, que consiste en uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete aminoácidos de la región VL de un anticuerpo anti-CD3 seleccionado del grupo, incluyendo 27Arg, 27Asn, 30Lys, 32Tyr, 92Phe, 94Leu y 96Arg. En una versión opcional, se proporciona un anticuerpo que no se une al mismo epítope que un paratopo de anticuerpo anti-CD3, el cual consta de aminoácidos de la región VL, incluyendo 91Ser. Un aspecto adicional de la invención indica que, de acuerdo a cualquiera de las versiones mencionadas anteriormente, un anticuerpo anti-CD3 es un anticuerpo monoclonal que consiste en un anticuerpo humano, humanizado o quimérico. En una versión, un anticuerpo anti-CD3 es un fragmento de anticuerpo, por ejemplo: un Fv, Fab, Fab', scFv, diacuerpo, o un fragmento de $F(ab')_2$. En otra versión, el anticuerpo es de largo completo, es decir, un anticuerpo IgG intacto (por ej: un anticuerpo IgG1 intacto) u otra clase anticuerpo o isotopo según lo aquí contemplado.

Como aspecto adicional, de acuerdo a cualquiera de las versiones mencionadas anteriormente, un anticuerpo anti-CD3 puede incorporar cualquiera de estas características, individualmente o en combinación, tal como se describe en las Secciones 1-7 debajo.

1. Afinidad del Anticuerpo

En determinadas representaciones, un anticuerpo provisto aquí tiene una constante de disociación (Kd) de ≤1μM, ≤ 100 nm, ≤10 nm, ≤1 nm, ≤0,1 nm, ≤0,01 nm, o ≤ 0,001 nm (p. ej.: 10^{-8} M o menos, p. ej.: de 10^{-8}M a 10^{-13} M, p. ej.: de 10^{-9}M a 10^{-13} M).

En una representación, Kd se mide con un ensayo de unión de antígenos radiomarcados (RIA). En una representación, se lleva a cabo un RIA junto con la versión Fab de un

anticuerpo de interés y su antígeno. Por ejemplo, la afinidad de unión de la solución de Fabs para antígenos se mide equilibrando Fab con una concentración mínima de un antígeno marcado (^{125}I) en presencia de una titulación en serie de antígenos sin marcar y capturando antígenos unidos con una placa recubierta de anticuerpos anti-Fab (ver, p.ej., Chen et ál., *J. Mol. Biol.* 293:865-881(1999)). Con el fin de establecer las condiciones para el ensayo, las placas de pozo múltiple MICROTITER® (termo-científicas) son cubiertas durante la noche con 5 ug/mL de anticuerpos anti-Fab de captura (Laboratorios Cappel) en 50 mM de carbonato de sodio (pH de 9,6), y consecutivamente bloqueadas con 2% de Albúmina del Suero Bovino (p/p) en PBS entre dos y cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23°C). En el caso de una placa no absorbente (Nunc #269620), los antígenos [^{125}I] de 100 pM o 26 pM se mezclan con diluciones en serie de un Fab de interés (p. ej. consistentes con la evaluación del anticuerpo anti-VEGF, Fab-12, en Presta et ál., *Cancer Res.* 57:4593-4599 (1997)). Luego, el Fab de interés se incuba toda la noche; sin embargo, el proceso de incubación puede continuar por un período más largo (p.ej de aproximadamente 65 horas) para garantizar que se alcance el equilibrio. Posteriormente, las mezclas se transfieren a la placa capturadora para ser incubadas a temperatura ambiente (p.ej. durante una hora). Luego, se quita la solución y se enjuaga la placa ocho veces con 0,1% de polisorbato 20 (TWEEN-20®) en PBS. Cuando las placas están secas, se agregan 150 µl/pozo de centelleo (MICROSCINT-20 ™; Packard), y las placas se recuentan con un contador gama TOPCOUNT ™ (Packard) durante diez minutos. Las concentraciones de cada Fab que proporcionan 20% de unión máxima o menos son seleccionadas para implementarlos en ensayos de unión competitivos.

De acuerdo a otra representación, se mide la Kd utilizando un ensayo de resonancia plasmónica de superficie BIACORE® Por ejemplo, un ensayo que utiliza BIACORE®-2000 o un BIACORE ®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) se realiza a 25°C con chips CM5 de antígenos inmovilizados a ~10 unidades de respuesta (RU). En una representación, los chips de biosensores de dextrano carboximetilado (CM5, BIACORE, Inc.), se activan con *N*-etil-*N'*- (3-dimetilaminopropilamina)-hidrocloruro de carbodiimida (EDC) y *N-hidroxisuccinimida* (NHS) conforme a las instrucciones del proveedor. El antígeno se diluye con 10 mM de acetato de sodio, pH de 4,8, a 5 µg/ml (~0,2 µM) antes de inyectar a una velocidad de flujo de 5 µl/minuto para conseguir aproximadamente 10 unidades de respuesta (RU) de proteínas unidas. Luego de la inyección en el antígeno, se inyecta 1 M de etanolamina a los grupos no reaccionados de bloqueo. En el caso de mediciones cinéticas, se inyectan diluciones en serie de Fab duplicadas (0,78 nM a 500 nM9 en PBS con 0,05% de polisorbato 20 (TWEEN-20™) surfactante (PBST) a 25°C en una velocidad de flujo de aproximadamente 25 µl/min. Las tasas de asociación (k_{on}) y disociación (k_{off}) se calculan utilizando un modelo de unión Langmuir simple individual (BIACORE ® Evaluation Software- versión 3.2), adaptando simultáneamente los sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación de equilibrio (Kd) se calcula como la proporción k_{on}/k_{off}. Ver, por ejemplo, Chen et ál., *J. Mol. Biol.* 293:865-881 (1999). Si la constante de asociación excede$10^6 M^{-1} s^{-1}$ del ensayo de

resonancia plasmónica de superficie mencionado anteriormente, la constante de asociación puede determinarse utilizando una técnica de enfriamiento fluorescente que mide el aumento o disminución en la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, paso de banda de 16 nm) a 25°C de un anticuerpo anti-antígeno de 20 nM (forma Fáb) en PBS, pH de 7,2 en presencia de crecientes concentraciones de antígeno medidas en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro equipado por el método de parada de flujo (instrumentos Aviv) o un espectrofotómetro SLM-AMINCO TM (TermoEspectrónico) de serie 8000 con una cubeta revuelta.

2. Fragmentos de anticuerpos

En determinadas representaciones, un anticuerpo provisto en el presente es el fragmento de un anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpos incluyen pero no se limitan a fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')2, Fv y scFv, y otros fragmentos que se describen a continuación. Para una revisión de ciertos fragmentos de anticuerpos, vea Hudson et al. *Nat. Med.* 9:129-134 (2003). Para una revisión de los fragmentos scFv, vea, p. ej., Pluckthün, en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., (Springer-Verlag, Nueva York), págs. 269-315 (1994); vea también WO 93/16185; y las patentes de EE.UU. N.° 5.571.894 y 5.587.458. Para una discusión de los fragmentos Fab y F(ab')2 que comprenden los residuos epítopos de unión con el receptor de recuperación y que aumentaron la vida media in vivo, vea la patente de EE.UU. N.° 5.869.046).

Los diacuerpos son fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión de antígenos que pueden ser bivalentes o biespecíficos. Vea, por ejemplo, EP 404,097; WO 1993/01161; Hudson et al. *Nat. Med.* 9:129-134 (2003); y Hollinger et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993). Los tricuerpos y tetracuerpos también se describen en Hudson et al. *Nat. Med.* 9:129-134 (2003).

Los anticuerpos de un solo dominio son fragmentos de anticuerpos que comprenden todo el dominio variable de una cadena pesada o una parte de él o todo el dominio de una cadena liviana de un anticuerpo o una parte de él. En ciertas representaciones, un anticuerpo de un solo dominio es un anticuerpo humano de un solo dominio (Domantis, Inc., Waltham, MA; vea, p. ej., la patente de EE.UU. N.° 6.248.516 B1).

Los fragmentos de anticuerpos se pueden hacer mediante diversas técnicas, que incluyen pero no se limitan a la digestión proteolítica de anticuerpos intactos, así como la producción de células anfitrionas recombinantes (p. ej. E. coli o fago), tal como se describe en este documento.

3. Anticuerpos quiméricos y humanizados

En determinadas representaciones, un anticuerpo provisto en el presente es un anticuerpo quimérico. Se describen ciertos anticuerpos quiméricos, p. ej., en la patente de EE.UU. N.° 4.816.567; y Morrison et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855

(1984)). En un ejemplo, un anticuerpo quimérico consta de una región variable no humana (p. ej., una región variable derivada de un ratón, una rata, un hámster, un conejo, o un primate no humano, como un mono) y una región constante humana. En otro ejemplo, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo con conmutación de clase en el que la clase o subclase se ha modificado respecto de la del anticuerpo primario. Los anticuerpos quiméricos incluyen fragmentos de unión de antígenos de los mismos.

En determinadas representaciones, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo humanizado. Generalmente, un anticuerpo no humano es humanizado para reducir la inmunogenicidad a los seres humanos, al tiempo que mantiene la especificidad y afinidad del anticuerpo parental no humano. Por lo general, un anticuerpo humanizado consta de uno o más dominios variables en los que las HVR, p. ej., las CDR (o partes de las mismas) derivan de un anticuerpo no humano, y las FR (o partes de las mismas) derivan de secuencias de anticuerpos humanos. Un anticuerpo humanizado opcionalmente puede abarcar al menos una porción de una región constante humana. En algunas representaciones, algunos residuos de la FR en un anticuerpo humanizado se sustituyen con los correspondientes residuos de un anticuerpo no humano (p. ej., el anticuerpo del que derivan los residuos de la HVR), p. ej., para restaurar o mejorar la especificidad o afinidad de los anticuerpos.

Los anticuerpos humanizados y los métodos para hacerlos se revisan p. ej., en Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008), y se describen, p. ej., en Riechmann et al*., Nature* 332:323-329 (1988); Queen et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86:10029-10033 (1989); las patentes de EE.UU. N.° 5.821.337, 7.527.791, 6.982.321, y 7.087.409; Kashmiri *et al*., *Methods* 36:25-34 (2005) (describen la región que determina la especificidad [SDR]); Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489-498 (1991) (describe "recubrimiento"); Dall'Acqua et al., *Methods* 36:43-60 (2005) (describe "intercambio de FR"); y Osbourn et al., *Methods* 36:61-68 (2005) y Klimka et al., *Br. J. Cancer*, 83:252-260 (2000) (describe el enfoque de "selección guiada" al intercambio de FR).

Las regiones de estructura humana que pueden ser utilizadas para humanización incluyen, pero no se limitan a: regiones del marco seleccionadas utilizando el método "más adecuado" (vea, p. ej., Sims et al. *J. Immunol.* 151:2296 (1993)); regiones del marco derivadas de la secuencia de consenso de anticuerpos humanos de un subgrupo particular de regiones variables de cadena pesada o liviana (vea p. ej., Carter et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); y Presta et al. *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)); regiones del marco humanas maduras (mutadas somáticamente) o regiones del marco germinal humano (vea p. ej., Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)); y regiones del marco derivadas de genotecas de FR de detección (vea p. ej., Baca et al., *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684 (1997) y Rosok et al., *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618 (1996)).

4. Anticuerpos humanos

En determinadas representaciones, un anticuerpo provisto en el presente es un

anticuerpo humano. Los anticuerpos humanos pueden producirse mediante el uso de varias técnicas conocidas en la materia. Los anticuerpos humanos se describen a grandes rasgos en van Dijk y van de Winkel, *Curr. Opin. Farmacol.* 5: 368-74 (2001) y Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20:450-459 (2008).

Los anticuerpos humanos pueden ser preparados mediante la administración de un inmunógeno a un animal transgénico que haya sido modificado para producir anticuerpos humanos intactos o anticuerpos intactos con regiones variables humanas en respuesta a un desafío antigénico. Estos animales suelen contener la inmunoglobulina humana loci, o una parte de ella, que sustituye a la inmunoglobulina loci endógena, o que se presenta extracromosomalmente o se integra de forma aleatoria en los cromosomas del animal. En estos ratones transgénicos, la inmunoglobulina endógena loci generalmente ha sido inactivada. Para la revisión de los métodos para la obtención de anticuerpos humanos de animales transgénicos, vea Lonberg, Nat. *Biotech.* 23:1117-1125 (2005). Vea también, p. ej., las patentes de EE.UU. N.° 6.075.181 y 6.150.584 que describen la tecnología XENOMOUSETM; la patente de EE.UU. N.° 5.770.429 que describe la tecnología HuMab®; la patente de EE.UU. N.° 7.041.870 que describe la tecnología K-M MOUSE® y la publicación de presentación de patente de EE.UU. N.° 2007/0061900, que describe la tecnología VelociMouse®). Las regiones variables humanas de anticuerpos intactos generados por estos animales pueden sufrir más modificaciones, p. ej., combinándolas con una región constante humana diferente.

Los anticuerpos humanos también pueden hacerse por métodos basados en hibridomas. También se han descrito las líneas celulares de mieloma humano y heteromielona humano-ratón para la producción de anticuerpos monoclonales humanos. (Vea, p. ej., Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pág. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987); y Boerner et al., *J. Immunol*., 147: 86 (1991).) Los anticuerpos humanos generados mediante la tecnología de hibridomas de células B humanas también se describen en Li et al*., Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006). Otros métodos incluyen los descritos, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N.° 7.189.826 (que describe la producción de anticuerpos IgM monoclonales humanos de líneas celulares hibridomas) y Ni, *Xiandai Mianyixue*, 26(4):265-268 (2006) (que describe los hibridomas humanos-humanos). La tecnología de hibridomas humanos (tecnología Trioma) también se describe en Vollmers and Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005) y Vollmers and Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3):185-91 (2005).

Los anticuerpos humanos también pueden generarse aislando secuencias de dominio variable de clones Fv seleccionados de genotecas de exhibición de fagos derivados de humanos. Tales secuencias de dominio variable pueden combinarse con un dominio constante humano deseado. A continuación se describen las técnicas para la selección de anticuerpos humanos de genotecas de anticuerpos.

5. Anticuerpos derivados de genotecas

Los anticuerpos de la invención pueden ser aislados seleccionando genotecas combinatorias de anticuerpos con la actividad o las actividades deseadas. Por ejemplo, una variedad de métodos son conocidos en la materia por generar genotecas de exhibición de fagos y seleccionar esas genotecas para los anticuerpos que reúnan las características de unión deseadas. Se revisan tales métodos, p. ej., en Hoogenboom et al. en *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) y se describen p. ej., en the McCafferty et al., *Nature* 348:552-554; Clackson et al., *Nature* 352: 624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Marks and Bradbury, en *Methods in Molecular Biology* 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004); and Lee et al., *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132(2004).

En ciertos métodos de exhibición de fagos, repertorios de genes de VH y VL son clonados por separado mediante reacción en cadena de polimerasa (PCR) y recombinados aleatoriamente en las genotecas de fagos, que luego pueden ser examinadas para fagos de unión de antígenos tal como se describe en Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Generalmente, los fagos presentan fragmentos de anticuerpos, ya sea fragmentos de cadena simple Fv (scFv) o fragmentos Fab. Las genotecas de fuentes inmunizadas proporcionan anticuerpos de alta afinidad al inmunógeno sin el requisito de desarrollo de hibridomas. Por otra parte, el repertorio no tratado previamente puede clonarse (p. ej., del ser humano) para proporcionar una fuente única de anticuerpos a una amplia variedad de antígenos propios y no propios sin ningún tipo de inmunización, tal como se describe en Griffiths et al., EMBO J, 12: 725-734 (1993). Finalmente, las genotecas no tratadas previamente pueden también hacerse sintéticamente por clonación de los segmentos no reordenados del gen V de las células madre y usando los iniciadores de PCR que contienen una secuencia aleatoria para codificar las regiones CDR3 altamente variables y lograr un reordenamiento in vitro, tal como se describe en Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992). Las publicaciones de patentes que describen las genotecas de fagos de anticuerpos humanos incluyen, por ejemplo: patente de EE.UU N.° 5.750.373, y las patentes de publicación de EE.UU N.° 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936, y 2009/0002360.

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos aislados de las genotecas de anticuerpos humanos se consideran anticuerpos humanos o fragmentos de anticuerpos humanos en este documento.

6. Anticuerpos multiespecíficos

En cualquiera de los aspectos anteriores, el anticuerpo anti-CD3 que se proporciona en este documento, por ejemplo, es un anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos

multiespecíficos son anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión para al menos dos sitios diferentes. En ciertas representaciones, los anticuerpos biespecíficos pueden unirse a dos epítopes diferentes de CD3 (p. ej., CD3ε o CD3γ). En ciertas representaciones, una de las especificidades de unión es para CD3 (p. ej., CD3ε o CD3γ) y la otra es para cualquier otro antígeno (p. ej., una segunda molécula biológica, p. ej., un antígeno celular de superficie, p. ej., un antígeno tumoral). Por consiguiente, un anticuerpo biespecífico anti-CD3 puede tener especificidades de unión para CD3 y una segunda molécula biológica, como una segunda molécula biológica (p. ej., un antígeno tumoral) incluido en la tabla 1 y descrito en la publicación de EE.UU. N.° 2010/0111856.

TABLA 1. Receptores de los antígenos tumorales de los anticuerpos biespecíficos anti-CD3 de la invención

CD20	CD79a	ETBR	IL13Ralpha 2	M-CSF	P2X5	SSX-2
0772P	CD79b	proteína de fusión ETV6-AML1	IL20Rα	MCSP	p53	SSX-4
adipofilina	Cdc27	EZH2	carboxilesterasa intestinal	mdm-2	PAP	STEAP1
AIM-2	CDK4	FcRH1	IRTA2	MDP	PAX5	STEAP1
ALDH1A1	CDKN2A	FcRH2	Calicreína 4	ME1	PBF	STEAP2
alfa actinina 4	CEA	FcRH5	KIF20A	Melan-A / MART-1	PMEL17	survivina
alfafetoproteína	CLL1	FLT3-ITD	KK-LC-1	Meloe	proteína de fusión pml-RARalpha	proteína de fusión SYT-SSX1 o -SSX2
B7-H4	Cw6	GDNF-Ra1	Lengsin	MSG783	PSMA	TGF-betaRII
BAFF-R	CXCR5	GEDA	LGR5	MUC1	PTPRK	TMEFF1
BAGE-1	CXORF61	GFRA1	LY64	MUC5AC	RAB38 / NY-MEL-1	TMEM118
BCLX (L)	ciclina D1	glipicano-3	Ly6E	mucina	RAGE-1	TMEM46
Proteína	Ciclina	GnTVf	Ly6G6D	MUM-1f	RBAF600	TRAG-3

CD22	EpCAM	HERV-K-MEL	MAGE-A9	NY-BR-1	SIRT2	XAGE-1b/GAGED2a
CD33	EphA3	HLA-DOB	MAGE-C1	NY-ESO-1/LAGE-2	SLC35D3	EGFR-T790M;
CD45	EphB2R	hsp70-2	MAGE-C2	OA1	SNRPD1	BMPR1B
CD70	Epiregulin	IDO1	mamaglobin a-A	OGT	SOX10	
CD72	EGFR	IGF2B3	MART2	OS-9	Sp17	
EGFR-G719A	EGFR-G719C;	EGFR-G719S;	EGFR-L858R	EGFR-S768I	EGFR-L861Q	

para CD3 y una segunda molécula biológica que comprende un complejo HLA-péptido seleccionado del grupo constituido por 0772P (CA125, MUC16; GenBank n.° de adhesión AF36148); adipofilina (Perilipina-2, proteína relacionada con la diferenciación adiposa, ADRP, ADFP, MGC10598; secuencia de referencia NCBI: NP_001113.2); AIM-2 (ausente en melanoma 2, PYHIN4, proteína inducible por interferón AIM2; secuencia de referencia NCBI: NP_004824.1); ALDH1A1 (aldehido deshidrogenasa familia 1, miembro A1,

ALDH1, PUMB1, retinaldehido deshidrogenasa 1, ALDC, ALDH-E1, ALHDII, RALDH 1, CE 1.2.1.36, ALDH11, HEL-9 HEL-S-53e, HEL12, RALDH1, acetaldehido deshidrogenasa 1, aldehido deshidrogenasa 1, soluble, aldehido deshidrogenasa, hígado citosólico, ALDH clase 1, proteína luminal epidídimo 12, proteína luminal epidídimo 9, proteína de unión del esperma secretora del epidídimo Li 53e, retinal deshidrogenasa 1, RalDH1, aldehido deshidrogenasa familia 1 miembro A1, aldehido deshidrogenasa, citosólica, CE 1.2.1; secuencia de referencia NCBI: NP_000680.2); alfa-actinina-4 (ACTN4 actinina, Alfa 4, FSGS1, 1 de glomeruloesclerosis segmentaria focal, alfa-actinina 4 no muscular, proteína de unión cruzada F-actina, FSGS, actinina-4, actinina Alpha4 isoforma, alfa-actinina-4; secuencia de referencia NCBI: NP_004915.2); alfa-fetoproteína (AFP, HPAFP, FETA, alfa-1-fetoproteína, alfa-fetoglobulina, alfa-1-fetoproteína, alfa-fetoglobulina, HP; GenBank: AAB58754.1); Anfiregulina (AREG, SDGF, Factor de crecimiento derivado de schwanoma, factor de crecimiento derivado de las células del colorecto, AR, CRDGF; GenBank: AAA51781.1); ARTC1 (ART1, ADP-Ribosiltransferasa 1, Mono (ADP-ribosil) transferasa 1, ADP-Ribosiltransferasa C2 y C3 tipo toxina 1, ART2, CD296, RT6, ADP-Ribosiltransferasa 2, NAD ligado a GPI (+)--arginina ADP-Ribosiltransferasa 1, EC 2.4.2.31, antígeno de CD296; NP); ASLG659; ASPHD1 (aspartato beta-hidroxilasa que contiene 1 dominio, aspartato beta-hidroxilasa que contiene dominio de proteína 1, EC 1.14.11.-, EC 1.14.11; GenBank: AAI44153.1); B7-H4 (VTCN1, inhibidor de activación de células T 1 que contiene dominio V-Set, B7H4, miembro de la superfamilia B7 1, proteína inmunitaria coestimuladora B7-H4, B7h.5, molécula coestimuladora de células T B7x, B7S1, B7X, VCTN1, H4, B7 miembro de la familia, PRO1291, B7 miembro de la familia, H4, molécula coestimuladora de células T B7x, inhibidor de activación de células T 1 que contiene dominio V-Set, proteína B7S1; GenBank: AAZ17406.1); BAFF-R (TNFRSF13C, superfamilia de receptores de factor de necrosis tumoral, miembro 13C, BAFFR, receptor del factor de activación de células B, receptor BAFF, receptor 3 BLyS, CVID4, BROMIX, CD268, receptor del factor de activación de células B, prolixin, miembro de la superfamilia receptora del factor de necrosis tumoral 13C, BR3, antígeno de CD268; secuencia de referencia NCBI: NP_443177.1); BAGE-1; BCLX (L); proteína de fusión BCR-ABL (b3a2); beta-catenina (CTNNB1 catenina (proteína asociada a la caderina), Beta 1, 88kDa, CTNNB, MRD19, catenina (proteína asociada a la caderina), Beta 1 (88kD), armadillo, beta catenina-1; GenBank: CAA61107.1); BING-4 (WDR46, WD repetir dominio 46, C6orf11, BING4, proteína BING4 con repetición de WD, cromosoma 6 marco abierto de lectura 11, FP221, UTP7, proteína 46 con repetición de WD; NP); BMPR1B (receptor tipo IB de proteínas morfogenéticas de hueso, acceso de Genbank n.º NM_00120; NP); B-RAF (Brevican (BCAN, BEHAB, acceso de Genbank n.º AF22905); Brevican (BCAN proteoglicano Condroitín sulfato 7, proteína de unión Hyaluronan enriquecida cerebro, BEHAB, CSPG7, Brevican de proteoglicanos, proteína base Brevican, sulfato de condroitina Proteoglycan BEHAB; GenBank: AAH27971.1); CALCA (polipéptido alfa relacionado a polipéptido, CALC1, calcitonina 1, calcitonina, alfa-tipo CGRP, péptido Calcitonin relacionado al gen I, CGRP-I, CGRP, CGRP1, CT, KC, polipéptido

relacionados con calcitonina y calcitonina, alfa, katacalcin; NP); CASP-5 (CASP5, caspasa 5, cisteína peptidasa relacionada a apoptosis, caspasa 5, cisteína-proteasa relacionada a apoptosis, proteasa ICH-3, proteasa TY, ICE (rel)-III, III ICE (rel), ICEREL-III, ICH-3, caspasa-5, TY proteasa, CE 3.4.22.58, ICH3, EC 3.4.22; NP); CASP-8; CD19 (CD19 - antígeno del linfocito b CD19 isoforma 2 precursor, B4, CVID3 [Homo sapiens], secuencia de referencia NCBI: NP_001761.3); CD20 (CD20 - antígeno de linfocitos b CD20, 4-dominios que atraviesan la membrana, subfamilia A, miembro 1, B1, Bp35, CD20, CVID5, LEU-16, MS4A2, S7; Secuencia de Referencia NCBI: NP_690605.1); CD21 (CD21 (CR2 (receptor de complemento o C3DR (receptor de C3d/Epstein Barr virus) o acceso de Genbank Hs.73792 n.º M2600); (CD22 (B-célula receptor CD22-B isoforma, BL-CAM Lyb-8, Lyb8, SIGLEC-2, FLJ22814, acceso de Genbank n.º AK02646); CD22; CD33 (molécula CD33, antígeno CD33 (Gp67), ácido siálico vinculante Ig-símil lectina 3, ácido siálico vinculante Ig-símil lectina 3, SIGLEC3, gp67, SIGLEC-3, células mieloides superficie antígeno CD33, p67, Siglec-3, antígeno CD33; GenBank: AAH28152.1); CD45; CD70 (CD70 - superfamilia de factores de necrosis tumoral (ligando) miembro 7; antígeno de superficie CD70; Antígeno Ki-24; CD27 Ligando; CD27-L; miembro de la superfamilia de tumor necrosis factor ligand 7; NCBI secuencia de referencia para la especie homo sapiens: NP_001243.1); CD72 (CD72 (antígeno de diferenciación celular B CD72, Lyb-; 359 aa, pI: 8.66, MW: 40225 TM: 1 [P] Cromosoma del gen: 9p13.3, acceso de Genbank n.º NP_001773.); CD79a (CD79a (CD79A, CD79a, asociada a la inmunoglobulina alfa, una proteína específica de células B que covalentemente interactúa con beta Ig (CD79B) y forma un complejo en la superficie con las moléculas de Ig M, transmite una señal implicados en la diferenciación de células B), pI: 4.84, MW: 25028 TM: 2 [P] Cromosoma del gen: 19q13.2, acceso a Genbank n.º NP_001774.1); CD79b (CD79b (CD79B, CD79b, IGb (asociada a la inmunoglobulina beta), B29, acceso a Genbank n.º NM_000626 o 1103867); Cdc27 (ciclo de división celular 27, D0S1430E, D17S978E, subunidad 3 de complejo de promoción de anafase, subunidad 3 de complejo de promoción de anafase, ANAPC3, APC3, CDC27Hs, H-NUC, homólogo del CDC27, homólogo del ciclo 27 de división celular (S. Cerevisiae), HNUC, NUC2, complejo de promoción de anafase, proteína 3, homólogo del ciclo 27 de división celular, homólogo de proteína 27 del ciclo de división celular, homólogo del Nuc2; GenBank: AAH11656.1); Cdk4 (quinasa dependiente de ciclina 4, quinasa de proteína de división de células 4, PSK-J3, CE 2.7.11.22, CMM3, EC 2.7.11; Secuencia de Referencia NCBI: NP_000066.1); CDKN2A (Inhibidor 2A de quinasa dependiente de ciclina, MLM, CDKN2, MTS1, Inhibidor 2A de quinasa dependiente de ciclina (Melanoma, P16, Inhibe CDK4), Inhibidor A de quinasa 4 dependiente de ciclina, Supresor 1 de tumores múltiples, CDK4I, MTS-1, CMM2, P16, ARF, INK4, INK4A, P14, P14ARF, P16-INK4A, P16INK4, P16INK4A, P19, P19ARF, TP16, Inhibidor CDK4 P16-INK4, Reguladores beta negativos de ciclo celular, p14ARF, p16-INK4, p16-INK4a, p16INK4A, p19ARF; NP); CEA; CLL1 (CLL-1 (CLEC12A, MICL, y DCAL, codifica un miembro de la superfamilia de dominio lectina tipo C/similar a lectina tipo C (CTL/CTLD). Los miembros de esta familia comparten un pliegue proteico y tienen

distintas funciones, tales como adhesión de las células, señalización célula-célula, recambio de glucoproteína y funciones en la respuesta inflamatoria e inmune. La proteína codificada por este gen es una reguladora negativa de la función granulocito y monocito. Se han descrito variantes del transcrito de este gen con empalme alternativo, pero no se ha determinado la naturaleza en toda su extensión de algunas de estas variantes. El gen está relacionado de cerca con otros miembros de la superfamilia CTL/CTLD en la región del complejo de genes asesinos naturales en el cromosoma 12p13 (Drickamer K Curr. Opin. Struct. Biol. 9):585–90; van Rhenen A, et ál, Blood 110):2659–66; Chen CH, et ál. Blood 107):1459–67; Marshall AS, et ál. Eur. J. Immunol. 36):2159–69; Bakker AB, et ál Cancer Res. 64 :8443–50; Marshall AS, et ál J. Biol. Chem. 279 :14792–80. Se ha demostrado que CLL-1 es un receptor transmembrana de tipo 2 que comprende un único dominio similar a lectina tipo C (no se prevé que el mismo se una al calcio o al azúcar), la región del tallo, un dominio transmembrana y una cola citoplásmica corta que contiene un motivo ITIM); CLPP (Subunidad proteolítica de peptidasa de matriz mitocondrial caseinolítica, Endopeptidasa Clp, EC 3.4.21.92, PRLTS3, Proteasa ClpAP dependiente de ATP (E. Coli), Homólogo ClpP (Proteasa caseinolítica, Dependiente de ATP, Subunidad proteolítica, E. Coli), Peptidasa caseinolítica ClpP, Dependiente de ATP, Subunidad proteolítica homóloga (E. Coli), Proteasa caseinolítica ClpP, Dependiente de ATP, Subunidad proteolítica homóloga (E. Coli), humana, Subunidad proteolítica, Proteasa ClpAP dependiente de ATP, Subunidad proteolítica, Humana, Peptidasa caseinolítica ClpP dependiente de ATP, Subunidad proteolítica, Peptidasa caseionolítica ClpP, Dependiente de ATP, Subunidad proteolítica homóloga, Subunidad proteolítica de proteasa Clp dependiente de ATP putativo, Mitocondrial; NP); COA-1; CPSF; CRIPTO (CRIPTO (CR, CR1, CRGF, CRIPTO, TDGF1, factor de crecimiento derivado de teratocarcinoma, acceso de Genbank n.° NP_003203 o NM_00321); Cw6; CXCR5 CXCR5 (receptor 1 de linfoma de Burkitt, un receptor acoplado con proteína G que es activado por la quimioquina CXCL13, cumple funciones en la migración de linfocitos y defensa humoral, tiene un rol en la infección HIV-2 y quizás en desarrollo de SIDA, linfoma, mieloma y leucemia); 372 aa, pI: 8.54 MW: 41959 TM: 7 [P] Cromosoma del gen: 11q23.3, acceso Genbank n.° NP_001707.); CXORF61 CXORF61 - cromosoma X marco abierto de lectura 61[Homo sapiens], Referencia de secuencia NCBI: NP_001017978.1); ciclina D1 (CCND1, BCL1, PRAD1, D11S287E, CLL de células B/Linfoma 1, Proteína de linfoma 1 de células B, Oncogene BCL-1, Oncogene PRAD1, Ciclina D1 (PRAD1: Adenomatosis paratiroidea 1), Ciclina D1 específica de G1/S, Adenomatosis paratiroidea 1, U21B31, Ciclina D1 específica de G1/S, BCL-1; Referencia de secuencia NCBI : NP_444284.1); Ciclina-A1 (CCNA1, CT146, Ciclina A1; GenBank: AAH36346.1); proteína de fusión dek-can; DKK1 (Inhibidor 1 de vía de señalización Dickkopf WNT, SK, hDkk-1, Homólogo 1 Dickkopf (Xenopus Laevis), Homólogo Dickkopf 1 (Xenopus Laevis), DKK-1, Homólogo Dickkopf 1, Proteína 1 relacionada con Dickkopf, Símil Dickkopf-1, Proteína 1 símil Dickkopf, Proteína 1 relacionada con Dickkopf, Dickkopf-1, Dkk-1; GenBank: AAQ89364.1); DR1 (Regulador descendiente de transcrito 1, enlace TBP (Cofactor

negativo 2), Cofactor negativo 2-Beta, Fosfoproteína asociada con proteína con enlace TATA, NC2, NC2-BETA, Proteína Dr1, NC2-beta, Regulador descendiente de transcrito 1; Referencia de secuencia NCBI: NP_001929.1); DR13 (Complejo mayor de histocompatibilidad, Clase II, DR Beta 1, HLA-DR1B, DRw10, DW2.2/DR2.2, SS1, DRB1, HLA-DRB, Antígeno de histocompatibilidad HLA Clase II, Cadena DR-1 Beta, Antígeno de leucocito humano DRB1, Antígeno linfocito DRB1, Antígeno MHC Clase II, Cadena MHC Clase II HLA-DR Beta 1, Glucoproteína de superficie celular MHC Clase II HLA-DR, MHC Clase II HLA-DRw10-Beta, DR-1, DR-12, DR-13, DR-14, DR-16, DR-4, DR-5, DR-7, DR-8, DR-9, DR1, DR12, DR13, DR14, DR16, DR4, DR5, DR7, DR8, DR9, DRw11, DRw8, HLA-DRB2, Clon P2-Beta-3, Antígeno DRB1*1 MHC Clase II, Antígeno DRB1*10 MHC Clase II, Antígeno DRB1*11 MHC Clase II, Antígeno DRB1*12 MHC Clase II, Antígeno DRB1*13 MHC Clase II, Antígeno DRB1*14 MHC Clase II, Antígeno DRB1*15 MHC Clase II, Antígeno DRB1*16 MHC Clase II, Antígeno DRB1*3 MHC Clase II, Antígeno DRB1*4 MHC Clase II, Antígeno DRB1*7 MHC Clase II, Antígeno DRB1*8 MHC Clase II, Antígeno DRB1*9 MHC Clase II; NP); E16 (E16 (LAT1, SLC7A5, acceso Genbank n.° NM_00348); EDAR (EDAR - precursor EDAR miembro de la superfamilia de receptores de factor de necrosis de tumor, receptor EDA-A1; homólogo downless; receptor de ectodisplasina A; receptor de displasia ectodérmica; receptor 1 de ectodisplasina anhidrótica, DL; ECTD10A; ECTD10B; ED1R; ED3; ED5; EDA-A1R; EDA1R; EDA3; HRM1 [Homo sapiens]; Referencia de secuencia NCBI: NP_071731.1); EFTUD2 (Factor de elongación Tu GTP de enlace del dominio contenedor 2, Factor de elongación Tu GTP de enlace del dominio contenedor de proteína 2, hSNU114, Homólogo SNU114, Proteína específica de U5 SnRNP, 116 KDa, MFDGA, KIAA0031, 116 KD, Proteína específica de U5 SnRNP, Componente ribonucleico nuclear pequeño 116 KDa U5, MFDM, SNRNP116, Snrp116, Snu114, U5-116KD, SNRP116, U5-116 KDa; GenBank: AAH02360.1); EGFR (Receptor de factor de crecimiento epidérmico, ERBB, Proto-Oncogene C-ErbB-1, Receptor de tirosina-proteína quinasa ErbB-1, ERBB1, HER1, EC 2.7.10.1, Receptor de factor de crecimiento epidérmico (Leucemia eritroblástica aviar viral (V-Erb-B) Oncogene Homólogo), Leucemia eritroblástica viral (V-Erb-B) Oncogene Homólogo (Aviar), PIG61, Leucemia eritroblástica aviar viral (V-Erb-B) Oncogene Homólogo, Proteína 40 inhibidora de crecimiento celular, Proteína 61 de inducción de proliferación celular, mENA, EC 2.7.10; GenBank: AAH94761.1); EGFR-G719A ; EGFR-G719C; EGFR-G719S; EGFR-L858R; EGFR-L861Q; EGFR-S768I; EGFR-T790M; Factor de elongación 2 (EEF2, Factor de elongación 2 de traducción eucariota, EF2, Translocasa polipeptidilo-TRNA, EF-2, SCA26, EEF-2; Referencia de secuencia NCBI: NP_001952.1); ENAH (hMena) (Homólogo habilitado (Drosophila), MENA, Habilitado mamíferos, ENA, NDPP1, Homólogo habilitado de proteína; GenBank: AAH95481.1) – resultados sólo para “ENAH” y no “ENAH (hMena)”; EpCAM (Molécula de adhesión de células epiteliales, M4S1, MIC18, Transductor 1 de la señal de calcio asociado a tumores, TACSTD1, TROP1, Antígeno asociado a adenocarcinoma, Glucoproteína Trop-1 de superficie celular, Gruproteína epitelial 314, Proteína GA733-2 asociada a tumor gastrointestinal severo, EGP314, KSA, DIAR5,

HNPCC8, Antígeno identificado por anticuerpo monoclonal AUA1, EGP-2, EGP40, ESA, KS1/4, MK-1, Glucoproteína 2 epitelial humana, Componente de membrana, Cromosoma 4, Marcador superficial (35kD Glycoprotein), EGP, Ep-CAM, GA733-2, M1S2, CD326 Antígeno, Antígeno de superficie de células epiteliales, hEGP314, Antígeno KS 1/4, ACSTD1; GenBank: AAH14785.1); EphA3 (EPH Receptor A3, ETK1, ETK, TYRO4, HEK, Tirosina quinasa 1 símil Eph, Receptor ETK1 de tirosina-proteína quinasa, EK4, Quinasa 4 símil EPH, EC 2.7.10.1, EPHA3, HEK4, Receptor 3 efrina tipo A, Quinasa 1 de embrión humano, Proteína tirosina quinasa TYRO4, hEK4, Quinasa de embrión humano, Tirosina-proteína quinasa TYRO4, EC 2.7.10; GenBank: AAH63282.1); EphB2R ; Epirregulina (EREG, ER, proepirregulina; GenBank: AAI36405.1); ETBR (EDNRB, Receptor de endotelina tipo B, HSCR2, HSCR, Receptor de endotelina tipo no selectivo, ET-B, ET-BR, ETRB, ABCDS, WS4A, ETB, Receptor de endotelina B; NP); proteína de fusión ETV6-AML1; EZH2 (Potenciadora de zeste homólogo 2 (Drosophila), Lisina N-metiltransferasa 6, ENX-1, KMT6 EC 2.1.1.43, EZH1, WVS, Potenciadora de zeste homólogo 2 (Drosophila), ENX1, EZH2b, KMT6A, WVS2, Histona-lisina N-metiltransferasa EZH2, Potenciadora de zeste homólogo 2, EC 2.1.1; GenBank: AAH10858.1); FcRH1 (FCRL1, Símil receptor Fc 1, FCRH1, Receptor Fc homólogo 1, Proteína 1 símil FcR, Proteína 5 asociada a la translocación del receptor inmune, IFGP1, IRTA5, hIFGP1, Proteína 1 de familia IFGP, CD307a, Proteína 1 símil receptor Fc, Receptor Fc de superfamilia de inmunoglobulina, Gp42, FcRL1, Antígeno CD307a; GenBank: AAH33690.1); FcRH2 (FCRL2, Símil receptor Fc 2, SPAP1, Dominio SH2 con proteína 1 de anclaje de fosfatasa, Receptor Fc homólogo 2, Proteína 2 símil FcR, Proteína 4 asociada a translocación del receptor de inmunoglobulina, FCRH2, IFGP4, IRTA4, Proteína 4 de familia IFGP, SPAP1A, SPAP1B, SPAP1C, CD307b, Proteína 2 símil receptor Fc, Proteína 4 asociada a translocación del receptor inmune, Receptor Fc de superfamilia de inmunoglobulina, Gp42, Dominio SH2 con proteína 1 de anclaje de fosfatasa, FcRL2, Antígeno CD307b; GenBank: AAQ88497.1); FcRH5 (FCRL5, Símil 5 receptor Fc, IRTA2, Receptor Fc homólogo 5, Proteína 5 símil FcR, Proteína 2 asociada a translocación del receptor inmune, BXMAS1, FCRH5, CD307, CD307e, PRO820, Proteína 5 símil receptor Fc, Translocación asociada 2 de receptor de superfamilia de inmunoglobulina (IRTA2), FcRL5, CD307e Antígeno; GenBank: AAI01070.1); FLT3-ITD; FN1(Fibronectina 1, Globulina insoluble en frío, FN, Factor de estimulación de migración, CIG, FNZ, GFND2, LETS, ED-B, FINC, GFND, MSF, fibronectina; GenBank: AAI43764.1); G250 (MN, CAIX, Anhidrasa carbónica IX, Deshidratasa carbónica, Proteína G250 asociada a RCC, Carbonato deshidratasa IX, Membrana antígena MN, Antígeno G250 asociado a carcinoma celular renal, CA-IX, P54/58N, pMW1, Antígeno G250 asociado a RCC, Anhidrasa carbónica 9; NP); - resultados para “G250” y no “G250 / MN / CAIX”; GAGE-1,2,8; GAGE-3,4,5,6,7; GDNF-Ra1 (receptor alfa 1 de la familia GDNF; GFRA1; GDNFR; GDNFRA; RETL1; TRNR1; RET1L; GDNFR-alpha1; GFR-ALPHA-; U95847; BC014962; NM_145793 NM_005264); GEDA (acceso Genbank n.° AY26076); GFRA1 - receptor alfa 1 de la familia GDNF; receptor alfa 1 GDNF; GDNFR-alpha-1; GFR-alpha-1; ligando 1 RET; Factor neurotrópico receptor 1 relacionado con

TGF-beta [Homo sapiens]; ProtKB/Swiss-Prot: P56159.2; glipicano-3 (GPC3, Glipicano 3, SDYS, Glipicano proteoglicano 3, Proteína intestinal OCI-5, GTR2-2, MXR7, SGBS1, DGSX, OCI-5. SGB, SGBS, Proteoglicano de sulfato de heparán, Glipicano 3 secretado, OCI5; GenBank: AAH35972.1); GnTVf ; gp100 (PMEL, Proteína premelanosoma, SILV, D12S53E, PMEL17, SIL, Proteína melanocita Pmel 17, Antígeno GP100 específico para línea de melanocitos, Antígeno ME20 asociado a melanomas, Proteína homóloga locus plata, ME20-M, ME20M, P1, P100, Símil plata (Homólogo ratón), Homólogo plata (ratón), ME20, SI, Proteína melanocita Mel 17, Proteína melanocita PMEL, Martiz melanosomal Proteína17, Plata, Ratón, Homólogo de; GenBank: AAC60634.1); GPC; GPNMB (Glucoproteína (Transmembrana) Nmb, Glucoproteína NMB, Proteína símil glucoproteína Nmb, osteoactivina, Glucoproteína transmembrana HGFIN, HGFIN, NMB, Glucoproteína transmembrana, Glucoproteína transmembrana NMB; GenBank: AAH32783.1); GPR172A (receptor 172A acoplado con proteína G; GPCR41; FLJ11856; D15Ertd747e); NP_078807.1; NM_024531.3); GPR19 (receptor 19 acoplado con proteína G; Mm.478; NP_006134.1; NM_006143.2); GPR54 (receptor KISS1; KISS1R; GPR54; HOT7T175; AXOR1; NP_115940.2; NM_032551.4); HAVCR1 (Receptor celular 1 de virus de hepatitis A, Inmunoglobulina de células T miembro 1 de la familia mucina, Molécula 1 de lesión renal, KIM-1, KIM1, TIM, TIM-1, TIM1, TIMD-1, TIMD1, Receptor 1 de inmunoglobulina mucina de células T, Proteína 1 de membranas de células T, HAVCR, HAVCR-1, Dominio de inmunoglobulina de células T y Proteína 1 de dominio de mucina, HAVcr-1, Inmunoglobulina de células T y Dominio de mucina con proteína 1; GenBank: AAH13325.1); HER2 (ERBB2, V-Erb-B2 Leucemia eritroblástica aviar viral oncogene homólogo 2, NGL, NEU, Oncogene homólogo derivado de neuro/glioblastoma, Proteína de gen 19 de nodo linfático metastásico, Proto-Oncogene C-ErbB-2, Proto-Oncogene Neu, Receptor HER2 de superficie celular tipo tirosina quinasa, MLN 19, p185erbB2, EC 2.7.10.1, V-Erb-B2 Leucemia eritroblástica aviar viral oncogene homólogo 2 (Oncogene homólogo derivado de neuro/glioblastoma), CD340, HER-2, HER-2/neu, TKR1, Proteína C-Erb B2/Neu, herstatina, Oncogene homólogo derivado de neuroblastoma/glioblastoma, Receptor tirosina-proteína quinasa ErbB-2, V-Erb-B2 Leucemia eritroblástica viral oncogene homólogo 2, Oncogene homólogo derivado de neuro/glioblastoma, MLN19, Antígeno CD340, EC 2.7.10; NP); HER-2 / neu – sobrenombre del anterior; HERV-K-MEL ; HLA-DOB (Subunidad beta de la molécula MHC clase II (Antígeno Ia) que liga los péptidos y los une con CD4+ linfocitos T); 273 aa, pI: 6.56, MW: 30820.TM: 1 [P] Cromosoma del gen: 6p21.3, acceso Genbank n.° NP_002111); hsp70-2 (HSPA2, Proteína 2 de golpe de calor 70kDa, Proteína 2 de golpe de calor 70kD, HSP70-3, Proteína 2 asociada con golpe de calor 70 KDa, Proteína 2 de golpe de calor 70 KDa; GenBank: AAD21815.1); IDO1 (Indolamina 2,3-Dioxigenasa 1, IDO, INDO, Indolamina-Pirrol 2,3-Dioxigenasa, IDO-1, Indolamina-Pirrol 2,3 Dioxigenasa, Indolamina 2,3 Dioxigenasa, Indole 2,3 Dioxigenasa, EC 1.13.11.52; Referencia de secuencia NCBI: NP_002155.1); IGF2B3 ; IL13Ralpha2 (IL13RA2, Receptor de interleucina 13, Alfa 2, Antígeno 19 cancer/testículos, Proteína de enlace de interleucina

13, IL-13R-alfa-2, IL-13RA2, IL-13 Subunidad receptora alfa-2, IL-13R Subunidad alfa-2, CD213A2, CT19, IL-13R, IL13BP, Proteína de enlace de interleucina 13, Cadena alfa 2 receptora de interleucina 13, Subunidad alfa 2 receptora de interleucina, IL13R, Antígeno CD213a2; NP); IL20Rα; Carboxilesterasa intestinal; IRTA2 (sobrenombre de FcRH5); Kallikrein 4 (KLK4, Peptidasa 4 relacionada con Kallikrein, PRSS17, EMSP1, Serina proteinasa 1 de la matriz de esmalte, Proteína 1 símil Kallikrein, Serina proteasa 17, KLK-L1, PSTS, AI2A1, Kallikrein 4 (Prostasa, Matriz de esmalte, Próstata), ARM1, EMSP, Mensaje 1 regulado por andrógenos, Serina proteasa 1 de la matriz de esmalte, kallikrein, kallikrein-4, prostasa, EC 3.4.21.-, Prostasa, EC 3.4.21; GenBank: AAX30051.1); KIF20A (Miembro 20A de la familia de quinesina, RAB6KIFL, Interactuación de RAB6, Símil quinesina (Rabkinesin6), Mitotic a; LAGE-1; Proteína LDLR-fusión de fucosiltransferasas; Lengsin (LGSN, Lengsin, Proteína de cristalino con dominio de glutamina sintetasa, GLULD1, Dominio de glutamato-amoníaco ligasa con Proteína 1, LGS, Dominio contenedor 1 de glutamato-amoníaco ligasa (Glutamina sintetasa), Dominio contenedor 1 de glutamato-amoníaco ligasa, Símil glutamina sintetasa de cristalino; GenBank: AAF61255.1); LGR5 (repetición rica en leucina con receptor 5 acoplado con proteína G; GPR49, GPR6; NP_003658.1; NM_003667.2; LY64 (Antígeno linfocitos 64 (RP10, proteína de membrana de tipo I de la familia de repetición rica en leucina (LRR), regula la activación de las células B y la apoptosis, la pérdida de funciones está asociada con un incremento de enfermedades en pacientes con lupus eritematoso sistémico); 661 aa, pI: 6.20, MW: 74147 TM: 1 [P] Cromosoma del gen: 5q12, acceso Genbank n.° NP_005573.; Ly6E (complejo linfocito antígeno 6, locus E; Ly67,RIG-E,SCA-2,TSA-; NP_002337.1; NM_002346.2); Ly6G6D (complejo linfocito antígeno 6, locus G6D; Ly6-D, MEGT; NP_067079.2; NM_021246.2); LY6K (complejo linfocito antígeno 6, locus K; LY6K; HSJ001348; FLJ3522; NP_059997.3; NM_017527.3); dominio LyPD1 - LY6/PLAUR conteniendo 1, PHTS [Homo sapiens], GenBank: AAH17318.1); MAGE-A1 (Familia A de antígenos de melanoma, 1 (Controla la expresión del antígeno MZ2-E, MAGE1, Familia A 1 de antígenos de melanoma, MAGEA1, Antígeno de melanoma MAGE-1, Antígeno 1 asociado a melanoma, Antígeno MZ2-E asociado a melanoma, Antígeno MZ2-E, Antígeno 1.1 cancer/testículos, CT1.1, Antígeno MAGE-1, Familia 1 de antígenos cancer/testículos, Miembro 1, Familia 1 de antígenos cancer/testículos, Miembro 1, MAGE1A; Referencia de secuencia NCBI: NP_004979.3); MAGE-A10 (MAGEA10, Familia A de antígenos de melanoma, 10, MAGE10, Antígeno MAGE-10, Antígeno 10 asociado a melanoma, Antígeno 1.10 cancer/testículos, CT1.10, Familia 1 de antígenos cancer/testículos, Miembro 10, Familia 1 de antígenos cancer/testículos, Miembro 10; Referencia de secuencia NCBI: NP_001238757.1); MAGE-A12 (MAGEA12, Familia A de antígenos de melanoma, 12, MAGE12, Antígeno 1.12 cancer/testículos, CT1.12, Antígeno MAGE12F, Familia 1 de antígenos cancer/testículos, Miembro 12, Familia 1 de antígenos cancer/testículos, Miembro 12, Antígeno 12 asociado a melanoma, Antígeno MAGE-12; Referencia de secuencia NCBI: NP_001159859.1); MAGE-A2 (MAGEA2, Familia A de antígenos de melanoma, 2, MAGE2, Antígeno 1.2 cancer/testículos, CT1.2, MAGEA2A,

Antígeno MAGE-2, Familia 1 de antígenos cancer/testículos, Miembro 2, Familia 1 de antígenos cancer/testículos, Miembro 2, Antígeno 2 de melanoma, Antígeno 2 asociado a melanoma; Referencia de secuencia NCBI: NP_001269434.1); MAGE-A3 (MAGEA3, Familia A de antígenos de melanoma, 3, MAGE3, Antígeno MAGE-3, Antígeno MZ2-D, Antígeno 3 asociado a melanoma, Antígeno 1.3 cancer/testículos, CT1.3, Familia 1 de antígenos cancer/testículos, Miembro 3, HIP8, HYPD, MAGEA6, Familia 1 de antígenos cancer/testículos, Miembro 3; Referencia de secuencia NCBI: NP_005353.1); MAGE-A4 (MAGEA4, Familia A de antígenos de melanoma, 4, MAGE4, Antígeno 4 asociado a melanoma, Antígeno 1.4 cancer/testículos, CT1.4, Antígeno MAGE-4, Antígeno MAGE-41, Antígeno MAGE-X2, MAGE4A, MAGE4B, Familia 1 de antígenos cancer/testículos, Miembro 4, MAGE-41, MAGE-X2, Familia 1 de antígenos cancer/testículos, Miembro 4; Referencia de secuencia NCBI: NP_001011550.1); MAGE-A6 (MAGEA6, Familia A de antígenos de melanoma, 6, MAGE6, Antígeno MAGE-6, Antígeno 6 asociado a melanoma, Antígeno 1.6 cancer/testículos, CT1.6, Antígeno MAGE3B, Familia 1 de antígenos cancer/testículos, Familia A 6 de antígenos de melanoma, Miembro 6, MAGE-3b, MAGE3B, Familia 1 de antígenos cancer/testículos, Miembro 6; Referencia de secuencia NCBI: NP_787064.1); MAGE-A9 (MAGEA9, Familia A de antígenos de melanoma, 9, MAGE9, Antígeno MAGE-9, Antígeno 9 asociado a melanoma, Antígeno 1.9 cancer/testículos, CT1.9, Familia 1 de antígenos cancer/testículos, Miembro 9, Familia 1 de antígenos cancer/testículos, Miembro 9, MAGEA9A; Referencia de secuencia NCBI: NP_005356.1); MAGE-C1 (MAGEC1, Familia C de antígenos de melanoma, 1, Antígeno 7.1 cancer/testículos, CT7.1, Antígeno MAGE-C1, Familia 7 de antígenos cancer/testículos, Miembro 1, CT7, Familia 7 de antígenos cancer/testículos, Miembro 1, Antígeno C1 asociado a melanoma; Referencia de secuencia NCBI: NP_005453.2); MAGE-C2 (MAGEC2, Familia C de antígenos de melanoma, 2, MAGEE1, Antígeno 10 cancer/testículos, CT10, HCA587, Familia E de antígenos de melanoma, 1, Específico de cancer/testículos, Antígeno 587 asociado a carcinoma hepatocelular, Antígeno MAGE-C2, Antígeno MAGE-E1, Hepatocellular Cancer Antígeno 587 de cancer hepatocelular, Antígeno C2 asociado a melanoma; Referencia de secuencia NCBI: NP_057333.1); mamaglobina-A (SCGB2A2, Secretoglobina, Familia 2A, Miembro 2, MGB1, Mamaglobina 1, UGB2, Mamaglobina A, mamaglobina-A, mamaglobina-1, Familia Secretoglobina 2A Miembro 2; NP); MART2 (HHAT, Aciltransferasa de puercoespín, SKI1, Antígeno de melanoma reconocido por células T 2, Proteína 1 de puercoespín flaco, Skn, Antígeno de melanoma reconocido por células T 2, Proteína-cisteína N-palmitoiltransferasa HHAT, EC 2.3.1.-; GenBank: AAH39071.1); M-CSF (CSF1, Estimulante de colonia factor 1 (Macrófago), MCSF, CSF-1, lanimostim, Factor 1 de estímulo de colonia de macrófago humano, Lanimostim; GenBank: AAH21117.1); MCSP (SMCP, Proteína rica en cisteína asociada a la mitocondria del espermatozoide, MCS, Selenoproteína de cápsula mitocondrial, HSMCSGEN1, Proteína rica en cisteína asociada a la mitocondria del espermatozoide; Referencia de secuencia NCBI: NP_109588.2); XAGE-1b/GAGED2a; WT1 (Tumor 1 de Wilms, WAGR, GUD, WIT-2, WT33, Dominio amino-terminal de EWS, NPHS4, Últimos tres dedos de zinc

del dominio de enlace de ADN de WT1, AWT1, Proteína de tumor de Wilms, EWS-WT1; GenBank: AAB33443.1); VEGF; Tirosinasa (TYR; OCAIA; OCA1A; tirosinasa; SHEP; NP_000363.1; NM_000372.4; GenBank: AAB60319.1); TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, posible canal de catión del receptor transitorio, subfamilia M, miembro 4, acceso de Genbank n.º NM_01763); TRP2-INT2; TRP-2 ; TRP-1 / gp75 (Proteína 1 relacionada a la tirosinasa, 5,6-dihidroxindol-2-Oxidasa ácido carboxílico, CAS2, CATB, TYRP, OCA3, Catalasa B, PROTEÍNA b, glucoproteína 75, CE 1.14.18., Antígeno Melanoma Gp75, TYRP1, TRP, TYRRP, TRP1, SHEP11, Oxidasa DHICA, CE 1.14.18, GP75, CE 1.14.18.1; Triosa fosfato isomerasa (Triosa fosfato isomerasa 1, TPID, Triosa fosfato isomerasa, HEL-S-49, TIM, Proteína secreción epidídimo Li 49, TPI, Triosa fosfato isomerasa, CE 5.3.1.1; TRAG-3 (Miembro de la familia CSAG 2, Familia de antígeno Cáncer/Testículos 24, CSAG3B, Miembro 2, Miembro de la familia CSAG 3B, Familia de antígeno Cáncer/Testículos 24 Miembro 2, Antígeno Cáncer/Testículos 24.2, Gen asociado a la condrosarcoma 2/3 Proteína, Proteína asociada resistente a Taxol Gen 3, Gen asociado a la condrosarcoma 2/3 proteína-símil, CT24.2, Gen 3 asociado resistente a Taxol, TRAG-3, CSAG3A, TRAG3;); TMEM46 (homólogo 2 shisa (Xenopus laevis); SHISA; NP_001007539.1; NM_001007538.1; TMEM118 (proteína dedo angular, transmembrana2; RNFT2; FLJ1462; NP_001103373.1; NM_001109903.1; TMEFF1 (proteína transmembrana con EGF-símil y dos dominios folistatina-símil 1; Tomoregulin- ; H7365; C9orf2; C9ORF2; U19878; X83961; NM_080655; NM_003692; TGF-betaRII (TGFBR2, factor de crecimiento transformador, Receptor Beta II (70/80kDa), TGFbeta-RII, MFS2, tbetaR-II, TGFR-2, Receptor TGF-Beta Tipo IIB, Receptor TGF-Beta Tipo II, Receptor TGF-Beta Tipo 2, EC 2.7.11.30, Receptor beta de factor de crecimiento transformador tipo IIC, AAT3, TbetaR-II, factor de crecimiento transformador, Receptor beta II (70-80kD), Receptor TGF-Beta tipo II, FAA3, Receptor beta de factor de crecimiento transformador tipo III, LDS1B, HNPCC6, LDS2B, LDS2, RIIC, CE 2.7.11, TAAD2; TENB2 (TMEFF2, tomoregulin, TPEF, HPP1, TR, proteoglican transmembranosos putativo, relacionado a la familia EGF/heregulina de factores de crecimiento y folistatina); 374 aa, Accesión NCBI: AAD55776, AAF91397, AAG49451, NCBI RefSeq: NP_057276; Gen NCBI: 23671; OMIM: 605734; SwissProt Q9UIK5; Acceso de Genbank N.º AF179274; AY358907, CAF85723, CQ782436; TAG-2; TAG-1 (Contactin 2 (Axonal), TAG-1, AXT, Molécula de adhesión celular Axonin-1, TAX, Contactin 2 (expresada transitoriamente), TAX1, Contactin-2, Glucoproteína axonal TAG-1, Glucoproteína axona expresada transitoriamente, Glucoproteína axonal transitoria, Axonin-1, TAX-1, TAG1, FAME5; PRF: 444868); SYT-SSX1 o -SSX2 proteína de fusión; survivin; STEAP2 (HGNC_8639, IPCA-1, PCANAP1, STAMP1, STEAP2, STMP, gen 1 asociado al cáncer de próstata, proteína 1 asociada al cáncer de próstata, seis antígenos epiteliales de próstata 2, seis proteínas de próstata transmembrana, Genbank accession no. AF45513; STEAP1 (seis antígenos epiteliales de próstata, Acceso de Genbank n.º NM_01244; SSX-4; SSX-2 (SSX2, Sarcoma sinovial, X Breakpoint2, X Breakpoint 2, SSX, X Breakpoint 2B, Antigeno Cáncer/Testículos 5.2, X-Cromosoma-Relacionado 2, Antígeno tumoral HOM-MEL-40,

CT5.2, HD21, Antígeno Cáncer/Testículos Familia 5, HOM-MEL-40, Isoforma B, Antígeno Cáncer/Testículos Familia 5 miembro 2a, miembro 2a, Proteína SSX2, Sarcoma, Sarcoma, Sinovial, X-Cromosoma-Relacionada 2, sinovial, Sarcoma sinovial, X Breakpoint 2B, Sarcoma sinovial, SSX2A; Sp17; SOX10 (SRY (Región determinadora de sexo Y)-Box 10, ratón, PCWH, DOM, WS4, WS2E, WS4C, Megacolon dominante, ratón, Homologo humano de, Megacolon dominate, SRY-relacionado HMG-Box Gen 10, Homologo humano de,Factor de transcripción SOX-10; GenBank: CAG30470.1); SNRPD1 (pequeña ribonucleoproteina nuclear D1, pequeña ribonucleoproteina nuclear D1, polipéptido 16kDa, polipéptido (16kD), SNRPD, HsT2456, Sm-D1, SMD1, Sm-D autoantígeno, pequeña ribonucleoproteina nuclear D1 polipéptido 16kDa Pseudogene, SnRNP Proteína principal D1, pequeña ribonucleoproteina nuclear Sm D1; SLC35D3 (soluto compañía familia 35, miembro D3, FRCL1, Proteína de conexión limítrofe-símil 1, bA55K22.3, Frc, Límite-símil 1, soluto compañía familia 35 miembro D3; NCBI GenBank: NC_000006.11 NC_018917.2 NT_025741.16); SIRT2 (Sirtuina 2, NAD-dependiente deacetilasa sirtuin-2, SIRL2, silencio información regulatorio 2, Proteína reguladora SIR2 Homólogo 2, Proteína Sir2-Relacionada yipo 2, Proteína 2 SIR2-símil, Sirtuina tipo 2, Sirtuina (Regulación de información de tipo de apareamiento silencioso 2 homóloga) 2 (S.Cerevisiae), Sirtuina-2, Sirtuina (Regulación de información de tipo de apareamiento silencioso 2, S.Cerevisiae, Homóloga) 2, CE 3.5.1., SIR2; GenBank: AAK51133.1); Sema 5b (FLJ10372, KIAA1445, Mm.42015, SEMA5B, SEMAG, Semaforina 5b Hlog, dominio sema, siete repeticiones de trombospondina (tipo 1 y tipo 1-símil), dominio transmembrana (TM) y dominio citoplásmico corto, (semaforina) 5B, acceso de Genbank n.º AB04087; secernina 1 (SCRN1, SES1, KIAA0193, secerina-1; GenBank: EAL24458.1); SAGE (SAGE1, Antígeno sarcoma 1, Antígeno Cáncer/Testículos 14, CT14, Antígeno de tumor putativo; Secuencia de referencia NCBI: NP_061136.2); RU2AS (KAAG1, Antígeno asociado al riñón 1, RU2AS, RU2 Proteína del gen antisentido, Antígeno asociado al riñón 1; GenBank: AAF23613.1); RNF43 - E3 ligasa ubiquitina-proteína RNF43 precursor [Homo sapiens], RNF124; URCC; Secuencia de referencia: NP_060233.3; RhoC (;RGS5 (Regulador de señalización de proteína-G 5, MSTP032, Regulador de señalización de proteína-G 5, MSTP092, MST092, MSTP106, MST106, MSTP129, MST129; GenBank: AAB84001.1); RET (proto-oncogen RET; MEN2A; HSCR1; MEN2B; MTC1; PTC; CDHF12; Hs.168114; RET51; RET-ELE; NP_066124.1; NM_020975.4); RBAF600 (UBR4, ligasa proteína ubiquitina E3 componente N-Recognin 4, dedo de zinc, UBR1 Type 1, ZUBR1, E3 ligasa ubiquitina-proteína UBR4, RBAF600, Factor 600 KDa retinoblastoma asociada a la proteína, Proteína 1 dedo de zinc tipo UBR1, EC 6.3.2., N-recognin-4, KIAA0462, p600, CE 6.3.2, KIAA1307; GenBank: AAL83880.1); RAGE-1 (MOK, proteína quinasa MOK, Antígeno del tumor renal, RAGE, MAPK/MAK/MRK quinasa superpuesta, Antígeno del tumor renal 1, Antígeno del carcinoma de células renales, RAGE-1, CE 2.7.11.22, RAGE1; UniProtKB/Swiss-Prot: Q9UQ07.1); RAB38 / NY-MEL-1 (RAB38, NY-MEL-1, RAB38, Miembro RAS familia oncógena, Antígeno del melanoma NY-MEL-1, Proteína de unión de GTP relacionada aRab, Proteína relacionada a Ras Rab-38, rrGTPbp; GenBank:

AAH15808.1); PTPRK (DJ480J14.2.1 (Fosfatasa tirosina de proteína, Tipo receptor, K R-PTP-KAPPA, Kappa Fosfatasa tirosina de proteína, Kappa Fosfatasa tirosina de proteína), Fosfatasa tirosina de proteína, Tipo receptor, K, Kappa Fosfatasa tirosina de proteína, Fosfatasa tirosina de proteína, Tipo receptor, Kappa, R-PTP-kappa, Kappa Fosfatasa tirosina de proteína tipo receptor, CE 3.1.3.48, PTPK; GenBank: AAI44514.1); PSMA; PSCA hlg(2700050C12Rik, C530008O16Rik, RIKEN cDNA 2700050C12, RIKEN cDNA 2700050C12 gen, acceso de Genbank n.º AY358628); PSCA (Procursor del antígeno de células madre de la próstata, acceso de Genbank n.º AJ29743; ; PRDX5 (Peroxiredoxina 5, CE 1.11.1.15, TPx Tipo VI, B166, Enzima antioxidante B166, HEL-S-55, Tejido del hígado página 2D punto 71B, PMP20, Enzima antioxidante peroxisoma, PRDX6, Tioredoxina peroxidasa PMP20, PRXV, AOEB166, Proteína secretora de epidermis Li 55, Alu co-represor 1, Peroxiredoxina-5, Mitocondrial, Peroxiredoxina V, prx-V, Tioredoxina Reductasa, Prx-V, ACR1, Alu Corepressor, PLP; GenBank: CAG33484.1); PRAME (Antígeno expresado preferencialmente en melanoma, Antígeno expresado preferencialmente del melanoma, MAPE, OIP-4, OIPA, CT130, Antígeno Cáncer/Testículos 130, Antígeno melanoma expresado preferiblemente en tumores, Proteína de interacción con Opa 4, Proteína de interacción con Opa 4; GenBank: CAG30435.1); proteína de fusión pml-RARalpha; PMEL17 (homólogo plata; SILV; D12S53E; PMEL17; SI; SIL); ME20; gp10 BC001414; BT007202; M32295; M77348; NM_006928; PBF (ZNF395, proteína de dedo de zinc 395, PRF-1, Regulatorio de la enfermedad de Huntington, Proteína de unión de región regulatoria del gen HD, Proteína 2 de union de región, Proteínna 2, Factor 1 regulatorio del virus del papiloma, factor 2 regulatorio de HD, Factor regulatorio del virus del papiloma, PRF1, HDBP-2, Si-1-8-14, HDBP2, Proteína 2 de unión de región regulatoria del gen de la enfermedad de Huntington 2, HDRF-2, Factor PRF-1 regulatorio del virus del papiloma, PBF; GenBank: AAH01237.1); PAX5 (Paired Box 5, Gen 5 homeótico Paire5, BSAP, caja pareada de proteína Pax-5, Activador específico del linaje celular, Gen 5 de dominio pareado, caja pareada de gen 5 (Proteína activadora específica del linaje de células B), factor de transcripción específico de células B, caja pareada de gen 5 (activador específico del linaje de células B); PAP (REG3A, Alfa 3 derivado de islote regenerador, INGAP, PAP-H, Proteína pancreática Hepatointestinal, PBBCGF, Péptida de islote pro humana, REG-III, Proteína 1 asociada a la pancreatitis, Reg3, Reg III-Alfa, páncreas-intestinal-hepatocarcinoma, Proteína regeneradora derivada de islote III-Alfa, Factor de crecimiento celular Beta pancreático, HIP, Proteína PAP homóloga, HIP/PAP, Proteína inductora de proliferación 34, PAP1, Proteína inductora de proliferación 42, REG-3-alfa, Proteína regeneradora derivada de islote 3-Alfa, Proteína asociada a la Pancreatitis; GenBank: AAH36776.1); p53 (TP53, Proteína de tumores P53, TPR53, P53, Antígeno de tumor celular P53, Antígeno NY-CO-13, Proteína de tumor mutante 53, Fosfoproteína P53, P53 Supresor de tumores, BCC7, Proteína relacionada a la transformación 53, LFS1, Proteína de tumor 53, Síndrome Li-Fraumeni, Supresor de tumores P53; P2X5 (Receptor purinérgico P2X canal 5 con ventanas ligando, un canal de ion con ventana por ATP

extracelular, puede estar involucrado en la transmisión sináptica y la neurogénesis, la insuficiencia puede contribuir a la patofisiología de la inestabilidad del detrusor idiopático); 422 aa), pI: 7.63, MW: 47206 TM: 1 [P] Cromosoma del gen: 17p13.3, Acceso de GenBank N.º NP_002552.; OGT (Vinculado-O N-acetilglucosamina (GlcNAc) transferasa, O- GlcNAc transferasa P110 Subunidad, Vinculado-O N-acetilglucosamina (GlcNAc) transferasa (UDP-N-acetilglucosamina: Polipéptido-N-acetilglucosaminil transferasa, UDP-N-Acetylglucosamine--péptido N- acetilglucosaminiltransferasa 110 KDa Subunidad, UDP-N-acetilglucosamina: polipéptido-N-acetilglucosaminil transferasa, Difosfouridina-N-acetilglucosamina: polipéptido Beta-N-acetilglucosaminil transferasa, O- GlcNAc transferasa Subunidad P110, CE 2.4.1.255, Vinculado-O N-acetilglucosamina transferasa 110 KDa Subunidad, CE 2.4.1, HRNT1, CE 2.4.1.186, O-GlcNAc; GenBank: AAH38180.1); OA1 (Osteoartritis QTL 1, OASD; GenBank: CAA88742.1); NY-ESO-1/LAGE-2 (cáncer/testículo antígeno 1B, CTAG1B, NY-ESO-1, LAGE- 2, ESO1, CTAG1, CTAG, LAGE2B, antígeno cáncer/testículo 1, Antígeno cáncer/testículo Autoimmunogénico NY- ESO-1, Antígeno ancer 3, antígeno cáncer/testículo 6,1, Carcinoma de células escamosas del esófago Nueva York 1, L antígeno miembro de la Familia 2, LAGE2, CT6.1, LAGE2A; GenBank: AAI30365.1); NY-BR-1 (ANKRD30A, Dominio repetido Ankirina 30A, antígeno cáncer de pecho NY- BR- 1, Antígeno de cáncer de seno definido serológicamente NY-BR-1, Proteína con contenido de dominio repetido Ankirina 30A; Secuencia de Referencia NCBI: NP_443723.2); N-ras (NRAS, neuroblastoma RAS virales (V-Ras) Homólogo oncogen, NRAS1, Transformando la Proteína N-Ras, GTPase ANR, ALPS4, Proteína N-Ras Parte 4, NP6, Homólogo oncogen, HRAS1; GenBank: AAH05219.1); FJCN (factor de transcripción nuclear Y, Gamma, Hap5, HSM, Factor de transcripción nuclear Y Subunidad C, transactivador HSM-1/2 media, CCAAT subunidad de unión al factor C, NF-YC, CCAAT de transcripción de unión factor subunidad gamma, caja CAAT ADN-proteína de unión subunidad C, Subunidad de grandes dimensiones 2A del factor de unión de transcripción Histona H1, CBFC, Factor de transcripción nuclear Y subunidad gamma, CBF-C, transactivador HSM-1, H1TF2A, factor de transcripción NF-Y, C subunidad; neo-PAP (PAPOLG, Poly (A) polimerasa gamma, Neo-poli (A) polimerasa, Nuclear poli (A) polimerasa gamma, Polinucleótido adeniltransferasa gamma, SRP ARN 3" Enzima adelinato PAP2, PAP-gamma, Neo-PAP, SRP ARN 3" Enzima adelinato, PAP2, CE 2.7.7.19, PapG; Secuencia de Referencia NCBI: NP_075045.2); NCA (CEACAM6, acceso de GenBank n.º M1872); Napi3b (NAPI-3B, NPTIIb, Slc34a2, familia transportista de soluto 34 (fosfato de sodio), miembro 2, tipo II transportador de fosfato 3b dependiente de sodio, acceso de GenBank n.º NM_00642); Miosina clase I; MUM-3; MUM-2 (TRAPPC1, Subunidad 1 compleja de partículas de proteína de tráfico, BET5, Homólogo de BET5, MUM2, melanoma ubicuo mutado 2, Proteína de mieloma múltiple 2, Subunidad 1 compleja de partículas de proteína de tráfico; MUM-1f ; mucina (MUC1, mucina 1, célula superficiales asociadas, PEMA, PUM, CA 15-3, MCKD1, ADMCKD, Enfermedad de riñón medular quística 1 (autosómica dominante), ADMCKD1, mucina 1, transmembrana, CD227, Antígeno asociado al

carcinoma de seno DF3, MAM6, Antígeno de cáncer 15-3, MCD (Documento de Control de Materiales), Carcinoma asociada mucina, MCKD, Krebs Von Den Lungen-6, MUC-1/SEC, Mucina urinaria reactiva al maní, MUC1/ZD, Antígeno de emembrana epitelial asociada a tumores, Antígeno DF3, Mucina asociada a tumores, episialin, EMA, Antígeno de H23, H23AG, mucina-1, KL-6, Mucina epitelial asociada a tumores, MUC-1, Episialin, PEM, Antígeno CD227; UniProtKB/Swiss-Prot: P15941.3); MUC5AC (mucina 5AC, moco/formadores de gel oligoméricico, mucina traqueobronquial, MUC5, TBM, mucina 5, subtipos A y C, traqueobronquial/gástrico, LEB, mucina gástrica, mucina 5AC, pseudogen moco/formadores de gel oligomérico, antígeno del grupo de sangre Lewis B, LeB, vías respiratorias de la glucoproteína principales, MUC- 5AC, mucina 5 subtipo AC, traqueobronquial; MUC1 (mucina 1, superficie celular asociada, PEMA, PUM, CA 15-3, MCKD1, ADMCKD, enfermedad quística medular renal 1 (autosómica dominante), ADMCKD1, mucina 1, transmembrana, CD227, antígeno DF3 asociado al carcinoma de seno, MAM6, antígeno de cáncer 15-3, MCD (Documento de Control de Materiales), mucina asociada al carcinoma, MCKD, Krebs Von Den Lungen-6, MUC1/SEC, mucina urinaria reactiva al maní, MUC-1/X, mucina epithelial polimórfica, MUC1/ZD, antígeno de membrana epithelial asociado a tumores, antígeno DF3, mucina asociada a tumores, episialin, EMA, antígeno de h23, H23AG, mucina-1, KL-6, mucina epithelial asociada a tumores, MUC1, Episialin, PEM, antígeno de CD227; ; MSG783 (RNF124, proteína hipotética FLJ20315, acceso de GenBank n.º NM-01776; MRP4 - proteína 4 isoforma 3 asociada a la resistencia a múltiples fármacos, MOAT-B; MOATB [Homo sapiens]; Secuencia de Referencia NCBI: NP_001288758.1; MPF (MPF, MSLN, SMR, megacariocitos potenciando el factor, mesothelin, Genbank adhesión no. NM_00582; MMP-7 (MMP7, matrilysin, MPSL1, matrin, 7 metaloproteinasa de la matriz (útero, Matrilysin), Matrilysin uterina, metaloproteinasa de la matriz-7, CE 3.4.24.23, bomba-1 proteasa, Matrin, Metaloproteinasa uterina, PUMP1, MMP-7, CE 3.4.24, bomba-1; GenBank: AAC37543.1); MMP-2 (MMP2, matriz curación 2 (gelatinasa A, 72kDa gelatinasa, 72kDa tipo colagenasa IV), MONA, CLG4A, metaloproteinasa de la matriz 2 (gelatinasa A, 72kD gelatinasa, 72kD tipo colagenasa IV), CLG4, 72kDa gelatinasa, 72kDa tipo colagenasa IV), matriz metaloproteinasa-2, MMP-II, 72 KDa gelatinasa, colagenasa tipo IV-A, MMP-2, metaloproteinasa de la matriz-II, TBE-1, gelatinasa neutrófila, CE 3.4.24.24, CE 3.4.24; GenBank: AAH02576.1); y Meloe.

Por ejemplo, en algunas situaciones, un anticuerpo anti CD3 que tiene un primer dominio de unión puede comprender al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis regiones hipervariables (RHV) que se seleccionan de (a) una RHV-H1 que consta en una secuencia de aminoácidos con N°. de ID de SEC.: 1; (b) una RHV-H2 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.° de ID de SEC.: 2; (c) una RHV-H3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 3; (d) una RHV-L1 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 4; (e) una RHV-L2 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 5; y (f) una RHV-L3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 6, como 40G5c, puede tener un segundo dominio

de unión que se une con CD20.

En algunas situaciones, un anticuerpo anti CD3 que tiene un primer dominio de unión puede comprender al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis regiones hipervariables (RHV) que se seleccionan de (a) una RHV-H1 que consta en una secuencia de aminoácidos con N°. de ID de SEC.: 1; (b) una RHV-H2 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.° de ID de SEC.: 2; (c) una RHV-H3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 3; (d) una RHV-L1 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 4; (e) una RHV-L2 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 5; y (f) una RHV-L3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 6, como 40G5c, puede tener un segundo dominio de unión que se une con HER2. El segundo dominio de unión que se liga con HER2 puede, por ejemplo, comprender de al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis regiones hipervariables (RHV) que se seleccionan de (a) una RHV-CD20 que consta en una secuencia de aminoácidos con N°. de ID de SEC.: 169; (b) una RHV-H2 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.° de ID de SEC.: 170; (c) una RHV-H3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 171; (d) una RHV-L1 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 172; (e) una RHV-L2 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 173; y (f) una RHV-L3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 174, como las que tiene el anticuerpo anti HER2, hu4D5. En algunas situaciones, el segundo dominio de unión que une HER2 contiene al menos una (p.ej., 1, 2, 3, o 4) de las regiones del marco de las cadenas pesadas FR-H1, FR-H2, FR-H3, y FR-H4 que consiste en las secuencias de N.º de ID de SEC.: 549-552, respectivamente, y/o al menos una (p.ej., 1, 2, 3, o 4) de las regiones del marco de la cadena liviana FR-L1, FR-L2, FR-L3, y FR-L4 que consiste en las secuencias de N.º de ID de SEC.: 553-556, respectivamente. En algunas situaciones, el segundo dominio de unión que se liga con HER2 puede, por ejemplo, comprender de (a) un dominio de VH que consta de una secuencia de animoácidos que tiene al menos una identidad de secuencia del 90% (p.ej., con una identidad de secuencia de al menos el 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%) con, o la secuencia de, N.° de ID de SEC.: 270; (b) un dominio de VL que consta de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una identidad de secuencia del 90% (p.ej., con una identidad de secuencia de al menos el 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%) con, o la secuencia de, N.° de ID de SEC.: 271; o (c) un dominio de VH como en (a) y un dominio de VL como en (b).

En algunas situaciones, un anticuerpo anti CD3 que tiene un primer dominio de unión puede comprender al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis regiones hipervariables (RHV) que se seleccionan de (a) una RHV-H1 que consta en una secuencia de aminoácidos con N°. de ID de SEC.: 7; (b) una RHV-H2 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.° de ID de SEC.: 8; (c) una RHV-H3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 9; (d) una RHV-L1 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 10; (e) una RHV-L2 que consiste en una secuencia de

aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 11; y (f) una RHV-L3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 12, como 38E4v1, puede tener un segundo dominio de unión que se une con HER2. El segundo dominio de unión que se liga con HER2 puede, por ejemplo, comprender de al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis regiones hipervariables (RHV) que se seleccionan de (a) una RHV-CD20 que consta en una secuencia de aminoácidos con N°. de ID de SEC.: 169; (b) una RHV-H2 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.° de ID de SEC.: 170; (c) una RHV-H3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 171; (d) una RHV-L1 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 172; (e) una RHV-L2 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 173; y (f) una RHV-L3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 174, como las que tiene el anticuerpo anti HER2, hu4D5. En algunas situaciones, el segundo dominio de unión que se liga con HER2 puede, por ejemplo, comprender de (a) un dominio de VH que consta de una secuencia de animoácidos que tiene al menos una identidad de secuencia del 90% (p. ej., con una identidad de secuencia de al menos el 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%) con, o la secuencia de, N.° de ID de SEC.: 270; (b) un dominio de VL que consta de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una identidad de secuencia del 90% (p. ej., con una identidad de secuencia de al menos el 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%) con, o la secuencia de, N.° de ID de SEC.: 271; o (c) un dominio de VH como en (a) y un dominio de VL como en (b).

.

En algunas versiones, también se pueden utilizar anticuerpos biespecíficos para localizar agentes citotóxicos en células que expresan un antígeno tumoral, como los antígenos tumorales que aparecen en la Tabla 1 (p. ej. CD20, FcRH5, HER2, LYPD1, LY6G6D, PMEL17, LY6E, CD19, CD33, CD22, CD79A, CD79B, EDAR, GFRA1, MRP4, RET, Steap1, o TenB2). También se pueden preparar anticuerpos biespecíficos como fragmentos o anticuerpos completos.

Entre las técnicas para crear anticuerpos específicos se encuentran, pero no se limitan a, coexpresión recombinante de dos pares de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina con especificidades diferentes (consulte Milstein y Cuello, *Nature* 305: 537 (1983)), WO 93/08829, y Traunecker et ál., *EMBO J.* 10: 3655 (1991)), ingeniería "botón en ojal" (consulte, p. ej., patente de EE.UU. N.° 5.731.168). Se puede utilizar la ingeniería de "botón en ojal" para generar un primer grupo que contenga un botón y un segundo grupo que contenga un ojal que se pueda unir con el botón del primer grupo. El botón de los anticuerpos mutiespecíficos de la invención puede estar en un grupo anti-CD3 en una versión. De forma alternativa, el botón de los anticuerpos mutiespecíficos de la invención puede estar en un grupo anti-objetivo/antígeno en una versión. El ojal de los anticuerpos mutiespecíficos de la invención puede estar en un grupo anti-CD3 en una versión. De forma alternativa, el ojal de los anticuerpos multiespecíficos de la invención puede estar en un grupo anti-objetivo/antígeno en una versión. También se pueden crear anticuerpos multiespecíficos con tecnología de cruzado de inmunoglobulina

(también conocida como intercambio de dominio Fab o formato CrossMab) (consulte p. ej., WO2009/080253; Schaefer et ál., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108:11187-11192 (2011)). También se pueden crear anticuerpos multiespecíficos por medio de efectos reguladores electrostáticos para la creación de moléculas heterodiméricas del Fc del anticuerpo (WO 2009/089004A1); con una unión cruzada de dos más anticuerpos o fragmentos (consulte, p. ej., patente de EE.UU. N.° 4.676.980, y Brennan et ál., Science, 229: 81 (1985)); con una cremallera de leucina para producir anticuerpos biespecíficos (consulte, p. ej., Kostelny et ál., J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992)); con tecnología "diacuerpo" para crear fragmentos de anticuerpo biespecíficos (consulte, p. ej., Hollinger et ál., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)); y con dímeros de fragmento Fv de cadena sencilla (sFv, por su sigla en inglés) (consulte, p. ej., Gruber et ál., J. Immunol., 152:5368 (1994)); y preparando anticuerpos triespecíficos como se indica, p. ej., en Tutt et ál. *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

Los anticuerpos creados con tres o más sitios de unión de antígenos funcionales, entre ellos los "anticuerpos pulpo", también se incluyen en este documento (consulte, p. ej., US 2006/0025576A1).

Estos anticuerpos, o sus fragmentos, también pueden incluir "fragmentos FAb de doble acción" o "DAF" (por su sigla en inglés) que constan de un sitio de unión de antígeno que se une a CD3 y a otro antígeno diferente (p. ej., una segunda molécula biológica) (consulte, p. ej., US 2008/0069820).

7. Variantes de Anticuerpos

Se contemplan en algunas versiones las variantes de las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos anti-CD3 de la invención (p. ej., los anticuerpos anti-CD3 biespecíficos de la invención que se unen a CD3 y a una segunda molécula biológica como, p. ej., el antígeno de superficie de una célula, p. ej., el antígeno de un tumor, como los anticuerpos TDB de la invención o las variantes correspondientes). Por ejemplo, se puede desear aumentar la afinidad de unión u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Se pueden preparar variantes de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo al ingresar las modificaciones apropiadas en la secuencia de nucleótidos que codifica al anticuerpo, o con una síntesis peptídica. Entre estas modificaciones se encuentran, por ejemplo, las eliminaciones de, o inserciones en o sustituciones de los residuos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Cualquier combinación de eliminación, inserción o sustitución puede llegar a la construcción final, siempre que la construcción final tenga las características esperadas, por ejemplo, unión de antígenos.

a. Variantes de Sustitución, Inserción y Eliminación

En algunas versiones, se incluyen las variantes de anticuerpos que tienen una o más sustituciones de aminoácidos. Entre los sitios de interés para la mutagénesis por sustitución se encuentran las RHV y FR. En la Tabla 2 aparecen las sustituciones conservadoras con el título "sustituciones preferidas". En la Tabla 2 se incluyen más

cambios considerables con el título “sustituciones ilustrativas”, y como se describe posteriormente en referencia a las clases de cadenas laterales de los aminoácidos. Se pueden introducir sustituciones de aminoácidos en un anticuerpo de interés y se pueden seleccionar los productos según la actividad deseada, por ejemplo, aumento/mantenimiento de la unión de antígenos, disminución en la inmunogenicidad o aumento de ADCC o CDC.

TABLA 2. Sustituciones de Aminoácidos Ilustrativas y Preferidas

Original Residuo	**Sustituciones Ilustrativas**	**Sustituciones Preferidas**
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

modificaciones (p. ej., mejoras) en ciertas propiedades biológicas (p. ej., aumento de la afinidad, disminución de la inmunogenicidad) relativas al anticuerpo original o habrá

conservado sustancialmente ciertas propiedades biológicas del anticuerpo original. Una variante de sustitución ilustrativa es un anticuerpo madurado por afinidad que puede generarse convenientemente, p. ej., con técnicas de maduración por afinidad por medio de fagos como las que se describen aquí. Brevemente, se mutan uno o dos residuos RHV y se presentan los anticuerpos variables en los fagos y se selecciona según cierta actividad biológica (p. ej., afinidad de unión).

Se pueden realizar alteraciones (p. ej., sustituciones) en las RHV, p. ej., para aumentar la afinidad de los anticuerpos. Se pueden realizar esas alteraciones en los "puntos de acceso" de RHV, p. ej., los residuos decodificados por codones que tienen una mutación en una frecuencia alta durante el proceso de maduración somática (consulte, p. ej., Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)), o residuos que contactan con los antígenos, con la prueba de afinidad de unión de la variación resultante de VH o VL. Maduración por afinidad construyendo y seleccionando de genotecas secundarias como se describe, p. ej., en Hoogenboom et ál en Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien et ál., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001).) En algunas versiones de maduración por afinidad, se introduce diversidad en los genes variables seleccionados para madurar con cualquiera de varios métodos (p. ej., RCP con tendencia al error, intercambio de cadenas o mutagénesis dirigida por oligonucleótidos). Entonces se crea una genoteca secundaria. Se examina la genoteca para identificar cualquier variante en los anticuerpos con la afinidad deseada. Otro método para introducir diversidad incluye un método dirigido por RHV, en el que se hacen aleatorios varios residuos RHV (p. ej., entre 4 y 6 residuos por vez). Los residuos RHV involucrados en la unión de antígenos pueden identificarse específicamente, p. ej., utilizando modelado o mutagénesis por barrido de alanina. Se suele concentrar sobre CDR-H3 y CDR-L3.

En algunas versiones, puede haber sustituciones, inserciones o eliminaciones dentro de una o mas RHV siempre que las alteraciones no reduzcan sustancialmente la habilidad del anticuerpo para unirse con el antígeno. Por ejemplo, se pueden convertir en RHV a las alteraciones conservadoras (p. ej., las sustituciones conservadoras que se incluyen aquí) que no reduzcan sustancialmente la afinidad de unión. Esas alternaciones pueden estar, por ejemplo, por fuera de residuos en contacto con antígenos en las RHV. En algunas versiones de la variante de las secuencias VH y VL que se mencionan antes, cada RHV no tiene alteración o contiene no más de una, dos o tres sustituciones de aminoácidos.

Un método útil para identificar los residuos o regiones de un anticuerpo que pueden ser objeto de mutagénesis se llama "mutagénesis por barrido de alanina" como describe Cunningham y Wells (1989) Science, 244:1081-1085. En este método, se identifica y reemplaza un residuo o grupo de residuos objetivo (p. ej., residuos cargados como arg, asp, his, lys y glu) con aminoácidos neutrales o con carga negativa (p. ej., alanina o polialanina) para determinar si se afecta la interacción del anticuerpo con el antígeno. Se pueden introducir más sustituciones en los sitios de los aminoácidos que demuestran

sensibilidad funcional a las sustituciones iniciales. Opcional, o adicionalmente, se puede agregar una estructura de cristal de un complejo antígeno-anticuerpo para identificar los puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Esos residuos de contacto o linderos pueden ser objeto o eliminarse como candidatos para la sustitución. Se pueden evaluar las variantes para determinar si contienen las propiedades deseadas.

Las inserciones en la secuencia de aminoácidos incluyen fusiones de amino o carboxilo terminales que puede variar desde un residuo hasta polipéptidos que contengan cientos de residuos, así como las inserciones intrasecuencia de uno o varios residuos de aminoácidos. Entre los ejemplos de las inserciones terminales se encuentra un anticuerpo con un residuo metionil N-terminal. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión de N- o C-terminal del anticuerpo con una enzima (p. ej., para ADEPT) o un polipéptido que aumenta la vida media del suero del anticuerpo.

b. Variantes de Glucosilación

En ciertas versiones, los anticuerpos anti-CD3 de la invención (p. ej., los anticuerpos anti-CD3 biespecíficos de la invención que se unen a CD3 y a una segunda molécula biológica como, p. ej., un antígeno de superficie celular, p. ej., el antígeno de un tumor, como los anticuerpos TDB de la invención o las variantes correspondientes) pueden alterarse para aumentar o disminuir cuanto se glucosila el anticuerpo. Se puede lograr agregar o eliminar sitios de glucosilación a un anticuerpo anti-CD3 de la invención alterando la secuencia de aminoácidos para que se creen o eliminen uno o más de los sitios de glucosilación.

Cuando el anticuerpo involucra una región Fc, se puede alterar el hidrato de carbono unido a él. Los anticuerpos nativos que producen las células de los mamíferos generalmente incluyen un oligosacárido biantenario y ramificado que por lo general se liga por una unión N- con Asn297 del dominio CH2 de la región Fc. Consulte, p. ej., Wright et ál. *TIBTECH* 15:26-32 (1997). El oligosacárido puede incluir varios hidratos de carbono, p. ej., manosa, N-acetilglucosamina (GlcNAc), galactosa y ácido siálico, así como una fucosa unida a un GlcNAc en la "raíz" de la estructura del oligosacárido biantenario. En algunas versiones, se pueden realizar las modificaciones del oligosacárido en un anticuerpo de la invención para crear variantes de anticuerpo con ciertas propiedades mejoradas.

En una versión, se incluyen las variantes del anticuerpo anti-CD3 que tienen una estructura de hidrato de carbono sin fucosa unida (directa o indirectamente) a una región Fc. Por ejemplo, la cantidad de fucosa en dicho anticuerpo puede variar entre 1% y 80%, 1% y 65%, 5% y 65% o 20% y 40%. La cantidad de fucosa se determina calculando la cantidad promedio de fucosa dentro de la cadena de azúcar en Asn297, en relación a la cantidad de glicoestructuras unidas a Asn297 (p. ej., estructuras complejas, híbridas y altas en manosa) como se mide con la espectrometría de masas MALDI-TOF, como se describe por ejemplo en WO 2008/077546. Asn297 hace referencia al residuo

de asparagina ubicado por la posición297 en la región Fc (numeración UE de los residuos de la región Fc); sin embargo, Asn297 también puede encontrarse ±3 aminoácidos arriba o abajo de la posición 297, o sea, entre las posiciones 294 y 300, por algunas variaciones menores en la secuencia de los anticuerpos. Dichas variantes fucolizadas podrían mejorar la función ADCC. Consulte, p. ej., presentación de patentes de EE.UU. N.° US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Entre los ejemplos de publicaciones relacionadas con variantes de anticuerpos "desfucolizados" o "deficientes en fucosa" se encuentran: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki et ál. *J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et ál. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004). Entre los ejemplos de líneas celulares capaces de producir anticuerpos desfucolizados se encuentran las células CHO Lec 13 sin fucolización de proteínas (Ripka et ál. *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); Presentación de patente de EE.UU. N.º US 2003/0157108 A1, Presta, L; y WO 2004/056312 A1, Adams *et ál*., en espacial en el ejemplo 11) y líneas celulares knockout, tales como el gen alfa-1,6-fucolsiltransferasa, *FUT8, células de* knockout CHO (consulte, por ejemplo a Yamane-Ohnuki et ál. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004); Kanda, Y. et ál*., Biotechnol. Bioeng*., 94(4):680-688 (2006); y WO2003/085107).

También se proporcionan variantes de los anticuerpos anti-CD3 con oligosacáridos bisectados, por ejemplo, en los cuales se bisecta con GIcNAc un oligosacárido biantenario ligado a la región Fc del anticuerpo. Es posible que tales variantes hayan reducido la fucosilación y/o mejorado la función de la ADCC. Se describen ejemplos de tales variantes de anticuerpos, p.ej., en WO 2003/011878 (Jean-Mairet et ál.), Presentación de patente de EE.UU. N.º 6.602.684 (Umana et ál.) y US 2005/0123546 (Umana *et ál.*). También se proporcionan variantes de anticuerpos con al menos un residuo de galactosa en el oligosacárido unido a la región Fc. Es posible que estas variantes de anticuerpos hayan mejorado la función de la CDC. Estas variantes de anticuerpos se describen, por ejemplo, en WO 1997/30087 (Patel et ál.), WO 1998/58964 (Raju, S.) y WO 1999/22764 (Raju, S.).

c. Variantes de la región Fc

En algunas versiones, se puede introducir una o más modificaciones a los amino ácidos en la región Fc de un anticuerpo anti-CD3 de la invención (por ejemplo, un anticuerpo anti-CD3 biespecífico de la invención que se une al CD3 y a una segunda molécula biológica, p.ej., a un antígeno de superficie celular, un antígeno tumoral, como un anticuerpo TDB de la invención o sus mismas variantes), por lo tanto se genera una variante de la región Fc (consulte, p.ej., US 2012/0251531). La variante de la región Fc puede comprender una secuencia de la región Fc humana, p.ej., una región Fc humana IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, que incluye una modificación a un amino ácido, p.ej., una

sustitución, en una o más posiciones de amino ácidos.

En algunas versiones, la invención contempla una variante del anticuerpo anti-CD3 que posee algunas pero no todas las funciones de efector, lo que la convierte en una buena candidata para las presentaciones en las que si bien la semivida del anticuerpo *in vivo* es importante, algunas funciones de efector son innecesarias o perjudiciales, como un complemento o una ADCC. *También es posible realizar ensayos de citotoxicidad* in vitro *y/o* in vivo para confirmar la reducción/agotamiento de la actividades de la CDC y/o de la ADCC. Por ejemplo, es posible realizar ensayos de unión de receptores Fc (FcR) para garantizar que el anticuerpo carece de unión FcγR (por lo tanto, es probable que carezca de actividad ADCC), pero sigue manteniendo la capacidad de unión FcRn. Las células primarias para la mediación de ADCC, células NK, expresan Fc(RIII solamente, mientras que los monocitos expresan Fc(RI, Fc(la expresión de FcR RII y Fc(RIII. Fen células hematopopéyicas se resume en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991). Se presentan ejemplos, no restrictivos, de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad de la ADCC de una molécula de interés, en la patente de EE.UU. N.º 5.500.362 (consulte, p.ej., Hellstrom, I., et ál. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83:7059-7063 (1986)) y Hellstrom, I et ál., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82:1499-1502 (1985); 5,821,337 (consulte Bruggemann, M. et ál., *J. Exp. Med.* 166:1351-1361 (1987)). Por otra parte, se pueden utilizar métodos de determinación no radioactivos (consulte, p.ej., el ensayo de citotoxicidad no radiactivo ACTI™ para la citometría de flujo (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA; y el ensayo de citotoxicidad no radiactivo CytoTox 96® (Promega, Madison, WI). La células efectoras útiles para estos ensayos incluyen las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células asesinas naturales (NK). Por otro lado, o adicionalmente, se puede determinar la actividad de la ADCC de la molécula de interés *in vivo*, p.ej., en un modelo de animal como el que presenta Clynes et ál. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 95:652-656 (1998). También se pueden realizar ensayos de unión de C1q para confirmar que el anticuerpo es incapaz de unir C1q, y, en consecuencia, carece de actividad CDC. Consulte, p.ej. el método ELISA de unión C1q y C3c en WO 2006/029879 y en WO 2005/100402. A fin de evaluar la activación del complemento, se puede realizar un ensayo de CDC (consulte, por ejemplo, Gazzano-Santoro *et ál. J. Immunol. Métodos* 202:163 (1996); Cragg, M.S. et ál. *Blood.* 101:1045-1052 (2003); y Cragg, M.S. y M.J. Glennie *Blood.* 103:2738-2743 (2004)). Los ensayos de la unión FcRn y la eliminación/semivida *in vivo* también pueden realizarse con métodos conocidos (consulte, p.ej. Petkova, S.B. et ál. *Int'l. Immunol.* 18(12):1759-1769 (2006)).

Los anticuerpos con función de efector disminuida incluyen aquellos con sustitución de uno o más de los residuos de las región Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 (de las patentes de EE.UU. N.° 6.737.056 y 8.219.149). Estos mutantes Fc incluyen mutantes Fc con sustituciones en dos o más posiciones de aminoácidos 265, 269, 270, 297 y 327, incluido el mutante Fc llamado "DANA" con sustitución en los residuos 265 y 297 a la alanina (patente de EE.UU. N.° 7.332.581 y 8.219.149).

En algunas versiones, se sustituye la prolina en la posición 329 de una región Fc humana en estado natural en el anticuerpo con glicina o arginina o un residuo de aminoácido lo suficientemente grande para destruir el sandwich de prolina dentro de la interfaz del receptor Fc/Fc.gamma. que se forma entre la prolina 329 del Fc y los residuos triptófanos Trp 87 y Trp 110 de FcgRIII (Sondermann et ál.: Nature 406, 267-273 (20 de julio 2000)). En algunas versiones, el anticuerpo incluye al menos una sustitución más de aminoácido. En una versión, la sustitución adicionada de aminoácido es S228P, E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297D o P331S, e incluso en otra versión, la sustitución adicionada de aminoácido es L234A y L235A de la región humana Fc IgG1 o S228P y L235E de la región humana Fc IgG4 (consulte, p.ej., US 2012/0251531) e incluso en otra versión, la sustitución adicionada de aminoácido es L234A y L235A y P329G de la región humana Fc IgG1.

Se describen ciertas variantes de anticuerpo con unión a FcR mejorada o disminuida (consulte, p.ej., Patente de EE.UU. N.º 6.737.056; WO 2004/056312, y Shields et ál.*, J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001)).

En algunas versiones, una variante de anticuerpo incluye una región Fc con una o más sustituciones de aminoácidos que mejoran la ADCC, p.ej., sustituciones en las posiciones 298, 333, y/o 334 de la región Fc (numeración de residuos de la UE).

En algunas versiones, las alteraciones se realizan en la región Fc que resultan en la unión de C1q alterada (es decir, mejorada o disminuida) y/o en Citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), p.ej., como lo describe la Patente de EE.UU. N.º 6.194.551, WO 99/51642 e Idusogie et ál. *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

Los anticuerpos con semividas aumentadas y unión mejorada para el receptor Fc neonatal (FcRn), el cual es responsable de la transferencia de IgC materno al feto (Guyer et ál, *J. Immunol.* 117:587 (1976) y Kim et ál., *J. Immunol.* 24:249 (1994)), se describen en US2005/0014934A1 (Hinton et ál.). Esos anticuerpos incluyen una región Fc con una o más sustituciones ahí mismo que mejoran la unión de la región Fc con FcRn. Tales variantes Fc incluyen aquellas con sustituciones en uno o más residuos de la región Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 o 434, p.ej., sustitución del residuo de la región Fc 434 (patentes de EE.UU. N.° 7.371.826).

También consulte Duncan & Winter, *Nature* 322:738-40 (1988), patente de EE.UU. N.° 5.648.260, patente de EE.UU. N.° 5.624.821 y WO 94/29351 en relación a otros ejemplos de las variantes de la región Fc.

En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD3 (p.ej., el anticuerpo anti-CD3 bioespecífico) contiene una región Fc que incluye una mutación N297G. En algunos entornos, el anticuerpo anti-CD3 que incluye la mutación N297G comprende un grupo de anti-CD3 que está compuesto por un primer dominio de unión que consta de las siguientes seis RHV: (a) una RHV-H1 que comprende una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 1; (b) una RHV-H2 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 2; (c) una RHV-H3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de

SEC.: 3; (d) una RHV-L1 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 4; (e) una RHV-L2 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 5; y (f) una RHV-L3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 6; y un grupo anti-CD20 que consiste en un segundo dominio de unión que incluye los siguientes seis RHV: (a) un RHV-H1 que comprende la secuencia de amino ácido con N.º de ID de SEC.: 157; (b) una RHV-H2 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 158; (c) una RHV-H3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 159; (d) una RHV-L1 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 160; (e) una RHV-L2 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 161; y (f) una RHV-L3 que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 162.

En algunas versiones, el anticuerpo anti-CD3 que incluye la mutación N297G comprende un grupo de anti-CD3 que está compuesto por un primer dominio de unión que consta de (a) una HV que comprende una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 184 y (b) un dominio de VL que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 185 y un grupo anti-CD20 que comprende un segundo dominio de unión que consta de (a) un dominio de HV que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 266 y (b) un dominio de VL que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 267.

En algunas versiones, el anticuerpo anti-CD3 que incluye la mutación N297G puede comprender uno o más dominios constantes de cadenas pesadas, donde el o los dominios constantes de cadenas pesadas son seleccionados de un primer dominio CH1 ($CH1_1$), un primer dominio CH2 ($CH2_1$), un primer dominio CH3 ($CH3_1$), un primer dominio CH1 ($CH1_2$), un segundo dominio CH2 ($CH2_2$) y un segundo dominio CH3 ($CH3_2$). En algunas ocasiones, al menos uno o los dominios constantes de cadenas pesadas está emparejado con otro dominio constante de cadenas pesadas. En algunas ocasiones, los dominios $CH3_1$ y $CH3_2$ comprenden una protuberancia o una cavidad, donde la protuberancia o cavidad en el dominio $CH3_1$ puede posicionarse en la cavidad o la protuberancia respectiva del dominio $CH3_2$. En algunas ocasiones, los dominios $CH3_1$ y $CH3_2$ se encuentran en una interfaz entre la protuberancia y cavidad mencionadas. En algunas ocasiones, los dominios $CH2_1$ y $CH2_2$ comprenden una protuberancia o una cavidad, donde la protuberancia o cavidad en el dominio $CH2_1$ puede posicionarse en la cavidad o la protuberancia respectiva del dominio $CH2_2$. En otras ocasiones, los dominios $CH2_1$ y $CH2_2$ se encuentran en una interfaz entre la protuberancia y cavidad mencionadas. En algunas ocasiones, el anticuerpo anti-CD3 es un anticuerpo IgG1.

En otras versiones, el anticuerpo anti-CD3 que incluye la mutación N297G comprende un grupo de anti-CD3 que está compuesto por un primer dominio de unión que consta de (a) una HV que comprende una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 184 y (b) un dominio de VL que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 185 y un grupo anti-CD20 que comprende un segundo dominio de unión que consta de (a) un dominio de HV que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de

SEC.: 266 y (b) un dominio de VL que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 267, donde (a) el grupo anti-CD3 comprende mutaciones por sustitución de T366S, L368A, Y407V y N297G y (b) el grupo anti-CD20 comprende mutaciones por sustitución de T366W y N297G.

d. Variantes de anticuerpos creados con cisteína

En ciertas versiones, es posible querer crear anticuerpos creados con cisteína, p.ej., "thioMAbs", en el cual se sustituye uno o más residuos de un anticuerpo con residuos de cisteína. En versiones particulares, los residuos sustituidos ocurren en sitios accesibles del anticuerpo. La sustitución de esos residuos con cisteína hace que los grupos de tiol se posicionen ahí mismo en sitios accesibles del anticuerpo y pueden utilizarse para conjugar el anticuerpo con otras fracciones, como fracciones de medicamentos o fracciones de medicamentos de enlace para crear un inmunoconjugado, como se describe más adelante. En algunas versiones, se puede sustituir con cisteína a uno o más de los siguientes residuos: V205 (numeración Kabat) de la cadena ligera, A118 (numeración de la UE) de la cadena pesada y S400 (numeración de la UE) de la cadena pesada de la región Fc. Es posible generar anticuerpos creados con cisteína de acuerdo a lo descrito en, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N.° 7.521.541.

e. Derivados de anticuerpos

En algunas versiones, se puede introducir una o más modificaciones al anticuerpo anti-CD3 de la invención (p.ej., un anticuerpo anti-CD3 biespecífico de la invención que se une al CD3 y a una segunda molécula biológica, p.ej., a un antígeno de superficie celular, un antígeno tumoral, como un anticuerpo TDB de la invención o sus mismas variantes) para que dispongan de fracciones no protéicas conocidas y disponibles. Las fracciones adecuadas capaces de ser derivadas del anticuerpo incluyen pero no se limitan a polímeros solubles en agua. Ejemplos no restrictivos de polímeros solubles en agua incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/polietilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrán, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, poli-1, 3-dioxolano, poli-1, 3, 6-trioxano, copolímero de anhidro maleico/etileno, poliaminoácidos (ya sean homopolímeros o copolímeros aleatorios) y polietilenglicol de dextrán o poli (n-vinil pirrilidona), homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de etileno/óxido de polipropileno, poliol polioxietilado (p.ej., glicerol), alcohol polivinílico y mezclas correspondientes. Los propionaldehídos de polietilenglicol pueden presentar ventajas en el proceso de fabricación debido a su estabilidad en el agua. El polímero puede presentar un cierto peso molecular y puede estar o no ramificado. El número de polímeros ligados al anticuerpo puede variar y, si se liga más de un polímero, pueden ser la misma o diferentes moléculas. En general, el número y/o tipo de polímeros utilizados para derivar puede determinarse con base en consideraciones que incluyen, pero no se limitan a, las propiedades particulares o funciones del anticuerpo que deben mejorarse, ya sea que el derivado del anticuerpo se

utilizará en una terapia bajo determinadas condiciones, etc.

En otra versión, se proporcionan los conjugados de un anticuerpo y la fracción no proteica que puede ser calentada por selección mediante la exposición a radiación. En una versión, la fracción no proteica es un nanotubo de carbono (Kam et ál., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102: 11600-11605 (2005)). La radiación puede ser de cualquier longitud de onda, pero no se limita a longitudes de onda que no dañan células ordinarias, pero que calientan la fracción no proteica a una temperatura en la que se mata a las células próximas a la fracción no proteica del anticuerpo.

B. Métodos recombinantes y composiciones

Es posible producir con los métodos recombinantes y las composiciones anticuerpos anti-CD3 de la invención (p. ej., los anticuerpos anti-CD3 biespecíficos de la invención que se unen a CD3 y a una segunda molécula biológica como, p. ej., el antígeno de la superficie celular, p. ej., el antígeno de un tumor, como los anticuerpos TDB de la invención o las variantes correspondientes), según lo descrito en la patente de EE.UU. N.° 4.816.567. En una versión, se presenta el ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-CD3 aquí descrito. Tal ácido nucleico puede codificar una secuencia de aminoácidos que incluye el VL y/o una secuencia de aminoácidos que incluye el VH del anticuerpo (p.ej. las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo). En otra versión, se presentan uno o más vectores (p.ej., los vectores de expresión) que incluyen el mencionado ácido nucleico. En otra versión, se presenta una célula huésped que incluye el mencionado ácido nucleico. En una de dichas versiones, una célula huésped consta de (p.ej., fue transformada con): (1) un vector que consta de un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que consta del VL del anticuerpo y una secuencia de aminoácidos que consta del VH del anticuerpo o (2) un primer vector que consta de un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que consta del VL de un anticuerpo y un segundo vector que consta de un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que consta del VH del anticuerpo. En una versión, la célula huésped es eucariota, p.ej., la célula del ovario de un hamster chino (CHO) o una célula linfoide (p.ej., la célula Y0, NS0, Sp20). En una versión, se presenta el método para formar un anticuerpo anti-CD3, donde el método comprende el cultivo de una célula huésped que consta de un ácido nucleico que codifica al anticuerpo, como se presenta arriba, en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo y, de manera optativa, recupera el anticuerpo de la célula huésped (o el medio de cultivo de la célula huésped).

Para la producción recombinante de un anticuerpo anti-CD3, se aísla e inserta ácido nucleico codificante de un anticuerpo, como se describe anteriormente, en uno o más vectores para una clonación y/o expresión adicional en una célula huésped. Es posible aislar y secuenciar dicho ácido nucleico fácilmente por medio de procedimientos convencionales (p. ej., mediante sondas oligonucleótidas que son capaces de unirse específicamente a genes codificantes de las cadenas pesadas y livianas del anticuerpo).

Dentro de las células huésped consideradas apropiadas para la clonación o expresión de

los vectores codificantes de anticuerpos se incluyen las células procariotas y eucariotas que se describen en el presente. Por ejemplo, es posible producir anticuerpos en bacterias, en particular, cuando no se requiere glucosilación ni la función efectora de Fc. Para la expresión de fragmentos de anticuerpos y polipéptidos en bacterias, véase, p. ej., los siguientes números de las patentes de EE.UU.: 5,648,237, 5,789,199, y 5,840,523. (Véase, a su vez, Charlton, *Methods in Molecular Biology, Vol. 248* (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), págs. 245-254, descripción de la expresión de fragmentos de anticuerpos en *E. coli*.) Después de la expresión, es posible aislar el anticuerpo de la pasta de células bacterianas en una fracción soluble y se puede purificar aún más.

Además de las procariotas, los microbios eucariotas tales como los hongos filamentosos o las levaduras son huéspedes adecuados de clonación o expresión para vectores codificantes de anticuerpos como, por ejemplo, cepas de hongos o levaduras cuyas vías de glucosilación se han "humanizado", resultando, así, en la producción de un anticuerpo con un patrón de glucosilación parcialmente o totalmente humano. Véase Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004), y Li et al., *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006).

Las células huésped consideradas apropiadas para la expresión de anticuerpos glicosilados se derivan, a su vez, de organismos pluricelulares (invertebrados y vertebrados). Entre los ejemplos de células de invertebrados se incluyen las células de los insectos y de las plantas. Se han identificado numerosas cepas baculovirales que se pueden usar en conjunción con las células de los insectos, especialmente para la transfección de las células de la *Spodoptera frugiperda*.

A su vez, es posible usar los cultivos de las células vegetales como huéspedes. *Véase, p. ej.*, los siguientes números de las patentes de EE.UU.: 5,959,177, 6,040,498, 6,420,548, 7,125,978, y 6,417,429 (descripción de la tecnología PLANTIBODIES™ para la producción de anticuerpos en plantas transgénicas).

Las células de los vertebrados también se pueden usar como huéspedes. Por ejemplo, las líneas celulares de los mamíferos que se adaptan para crecer en suspensión pueden resultar útiles. Algunos ejemplos de aquellas líneas celulares huésped de los mamíferos que pueden resultar útiles son: una línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7); una línea de riñón embrionario humano (293 o células 293, como se describe, p. ej., en Graham et al., *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); células de riñón de hámster neonato (BHK); células de Sertoli de ratón (células TM4, como se describe, p. ej., en Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1); células de riñón de mono verde africano (VERO-76); células de carcinoma cervical humano (HELA); células de riñón canino (MDCK); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A); células de pulmón humano (W138); células de hígado humano (Hep G2); tumor mamario de ratón (MMT 060562); células TRI, como se describe, p. ej., en Mather et al*., Annals N.Y. Acad. Sci*. 383:44-68 (1982); células MRC 5; y células FS4. Entre otras de las líneas celulares huésped de los mamíferos que pueden resultar útiles se incluyen las células del ovario del hámster chino (CHO), incluidas las células DHFR-CHO (Urlaub et al., Proc. *Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 77:4216 (1980)); y las líneas celulares de mieloma como, por ejemplo, Y0,

NS0 y Sp2/0. Para una revisión de ciertas líneas celulares huésped de los mamíferos que resultan apropiadas para la producción de anticuerpos, véase, p. ej., Yazaki y Wu, *Methods in Molecular Biology, Vol. 248* (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), págs. 255-268 (2003).

C. Ensayos

Es posible identificar, seleccionar o caracterizar los anticuerpos anti-CD3 de la invención (p. ej., los anticuerpos anti-CD3 biespecíficos de la invención que se unen a CD3 y a una segunda molécula biológica como, p. ej., el antígeno de la superficie celular, p. ej., el antígeno de un tumor, como los anticuerpos TDB de la invención o las variantes correspondientes) que se proporcionan en el presente en relación con sus propiedades químicas o físicas y/o las actividades biológicas por medio de varios ensayos conocidos en la materia.

1. Ensayos de unión y demás ensayos

En un aspecto, se prueba un anticuerpo anti-CD3 de la invención en relación con su actividad de unión de antígenos, por ejemplo, a través de métodos tales como ELISA, Western blot, etc.

En otro aspecto, es posible usar ensayos de competencia para identificar un anticuerpo que compite con un anticuerpo anti-CD3 de la invención para la unión con el CD3.

En un ensayo ejemplar de competición, se incuba el CD3 inmovilizado en una solución que comprende un primer anticuerpo etiquetado que se une al CD3 y un segundo anticuerpo no etiquetado que se analiza en relación con su capacidad para competir con el primer anticuerpo en la unión al CD3. El segundo anticuerpo se puede encontrar presente en un hibridoma sobrenadante. A modo de control, se incuba el CD3 inmovilizado en una solución que comprende un primer anticuerpo etiquetado, pero no así el segundo anticuerpo no etiquetado. Después de la incubación bajo condiciones permisivas para la unión del primer anticuerpo al CD3, se elimina el anticuerpo excedente sin unir y se mide la cantidad de etiquetas asociadas al CD3 inmovilizado. Si la cantidad de etiquetas asociadas al CD3 inmovilizado es significativamente más reducida en la muestra de la prueba relativa a la muestra de control, esto indica, entonces, que el segundo anticuerpo compite con el primer anticuerpo en la unión con el CD3. Véase, p. ej., Harlow y Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cap.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

2. Ensayos de actividad

En un aspecto, se proporcionan ensayos para la identificación de los anticuerpos anti-CD3 correspondientes con actividad biológica. La actividad biológica puede incluir, por ejemplo, la unión al CD3 (p. ej., CD3 en la superficie de una célula T) o un fragmento peptídico correspondiente, ya sea *in vivo*, *in vitro*, o *ex vivo*. En el caso de un anticuerpo anti-CD3 multiespecífico (p. ej., biespecífico) de la invención (p. ej., un anticuerpo TDB

con un brazo anti-CD3 y un brazo que reconoce una segunda molécula biológica, p. ej., un antígeno de la superficie celular, p. ej., un antígeno de un tumor), la actividad biológica puede incluir, a su vez, activación de la célula efectora (p. ej., activación de la célula T (p. ej., CD8+ y/o CD4+ célula T)), expansión de la población de células efectoras (es decir, una reducción en la población de las células que expresan la segunda molécula biológica en su superficie celular), y/o matanza de las células objetivo. Se proporcionan los anticuerpos con dicha actividad biológica *in vivo* y/o *in vitro.* En ciertas realizaciones, un anticuerpo de la invención se analiza en relación con dicha actividad biológica, como se describe en detalle en los Ejemplos que se encuentran a continuación.

En algunas representaciones, la actividad comprende la capacidad de sostener la eliminación de células B y/o la activación de células T citotóxicas. En ciertas representaciones, se evalúan las células anti-B que buscan anticuerpos anti-CD3 de la invención (tales como una TDB anti-CD20) para tal eliminación de células B y/o la activación del efecto citotóxico de la actividad de las células T biológicas mediante cualquiera de los métodos aquí descritos, en particular los exjemplos. En algunas representaciones de cualquiera de los ensayos de estas actividades, las PBMC pueden aislarse a partir de sangre entera de donantes saludables por separación Ficoll. Particularmente, la sangre de seres humanos puede extraerse en jeringas con heparina y las PBMC aisladas con Leucosep y Ficoll Paque Plus. De ser necesario, se pueden separar las células CD4+T y CD8+T con kits Miltenyi conforme las instrucciones del fabricante.

Además, las células pueden lavarse en un medio de RPMI con un 10% de FBS, suplementado con GlutaMax, penicilina y estreptomicina; y se agregaron ~0,2 millones de células suspendidas a una placa con fondo en U de 96 pocillos. Las células pueden cultivarse en RPMI 1640 suplementado con 10% de FBS a 37 °C en una incubadora de cultivo de células estándar humidificada. Para los ensayos de eliminación de células BJAB, se pueden incubar 20.000 células BJAB con células efectoras, ya sea células T purificadas o huPBMC, como lo indican las proporciones según el ensayo, en presencia de diversas concentraciones de anticuerpos TDB durante 24 horas. Para los ensayos de eliminación de células B endógenas, se pueden incubar 200.000 huPBMC en diversas concentraciones de anticuerpos TDB durante 24 horas.

Tras el cultivo, las células pueden lavarse con un tampón FACS (BSA al 0.05 %, azida de Na al 0.05 % en PBS) y suspenderse en 100µl de un tampón FACS con 1 µg/ml de yoduro de propidio. Los datos pueden recopilarse en un citómetro de flujo FACSCalibur y analizarse con FlowJo. Las células B vivas pueden descartarse como células PI-CD19 o PI-CD20+B mediante FACS y puede obtenerse el recuento de células absoluto con perlas FITC agregadas a la mezcla de la reacción como control de recuento interno. El porcentaje (%) de eliminación de células puede calcularse con base en los controles no tratados con TDB. Las células T activadas se pueden detectar por la expresión de superficie de CD69 y CD25 mediante el uso de anti-CD69-FITC y anti-CD25-PE.

D. Inmunoconjugados

La invención, a su vez, proporciona inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo

anti-CD3 que se conjuga a uno o más agentes citotóxicos, tales como medicamentos o agentes quimioterapéuticos, agentes inhibidores del crecimiento, toxinas (p. ej., toxinas proteicas, toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal, o animal, o fragmentos de la misma), o isotopos radioactivos.

En una realización, un inmunoconjugado es un conjugado de anticuerpo y fármaco (ADC) donde se conjuga un anticuerpo a uno o más medicamentos, que incluye, pero no se limita a, un maitansinoide (véase los siguientes números de las patentes de EE.UU.: 5,208,020, 5,416,064 y la patente europea EP 0 425 235 B1); una auristatina como, por ejemplo, las fracciones DE y DF del fármaco monometil auristatina (MMAE y MMAF) (véase los siguientes números de las patentes de EE.UU.: 5,635,483 y 5,780,588, y 7,498,298); una dolastatina; una calicheamicina o derivado de la misma (véase los siguientes números de las patentes de EE.UU.: 5,712,374, 5,714,586, 5,739,116, 5,767,285, 5,770,701, 5,770,710, 5,773,001, y 5,877,296; Hinman et al., *Cancer Res.* 53:3336-3342 (1993); y Lode et al., *Cancer Res.* 58:2925-2928 (1998)); una antraciclina como, por ejemplo, daunomicina o doxorrubicina (véase Kratz et al., *Current Med. Chem.* 13:477-523 (2006); Jeffrey et al., *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 16:358-362 (2006); Torgov et al., *Bioconj. Chem.* 16:717-721 (2005); Nagy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 97:829-834 (2000); Dubowchik et al., *Bioorg. & Med. Chem. Letters* 12:1529-1532 (2002); King et al., *J. Med. Chem.* 45:4336-4343 (2002); y el siguiente número de las patentes de EE.UU.: 6,630,579); un metotrexato; una vindesina; un taxano como, por ejemplo, docetaxel, paclitaxel, larotaxel, tesetaxel y ortataxel; un tricoteceno; y CC1065.

En otra realización, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo anti-CD3, como se describe en el presente, conjugado con una toxina enzimáticamente activa o con un fragmento de la misma, que incluye, pero no se limita a, difteria de cadena A, fragmentos activos no vinculantes de la toxina de la difteria, exotoxina de cadena A (a partir de Pseudomonas aeruginosa), ricina de cadena A, abrina de cadena A, modeccina de cadena A, alfa-sarcina, proteínas de Aleurites fordii, proteínas de diantina, proteínas de Phytolacca americana (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de Momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de Saponaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y tricotecenos.

En otra realización, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo anti-CD3, como se describe en el presente, conjugado con un átomo radioactivo para formar un radioconjugado. Se encuentra disponible una variedad de isotopos radioactivos para la producción de radioconjugados. Algunos ejemplos incluyen At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32}, Pb^{212} e isotopos radioactivos de Lu. Cuando el radioconjugado se usa para la detección, puede comprender un átomo radioactivo para los estudios cintigráficos, por ejemplo, tc99m o I123, o una etiqueta de espín para las imágenes por resonancia magnética nuclear (NMR) (también conocida como resonancia magnética (MRI)), como, por ejemplo, iodo-123 nuevamente, iodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

Se puede conjugar un anticuerpo con un agente citotóxico por medio de una variedad de

agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales como, p. ej., N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados de imidoésteres bifuncionales (como, p. ej., dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (como, p. ej., disuccinimidil suberato), aldehídos (como, p. ej., glutareldehído), compuestos bis-azido (como, p. ej., bis (p-azidobenzoil) hexandiamina), derivados bis-diazonio (como, p. ej., bis-(p-diazoniumbenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (como, p. ej., 2,6-diisocianato de tolieno), y compuestos de flúor bis-activos (como, p. ej., 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina según se describe en Vitetta et al., *Science* 238:1098 (1987). El ácido triaminepentaacético 1-isotiocianatobencil-3-metildietileno (MX-DTPA) etiquetado con carbono-14 es un agente quelante ejemplar para la conjugación de radionucleótidos en el anticuerpo. Véase WO94/11026. El enlace puede ser un "enlace escindible" que facilita la liberación de un fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, es posible usar un enlace ácido lábil, un enlace peptídico, un enlace fotolábil, un enlace dimetil o un enlace con contenido de disulfuro (Chari et al., *Cancer Res.* 52:127-131 (1992); Patente de EE.UU. No. 5,208,020).

Los presentes inmunoconjugados o ADCs contemplan expresamente, pero no se limitan a, los conjugados preparados con re-agentes de enlace cruzado, que incluyen, pero no se limitan a, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC, y sulfo-SMPB, y SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfona)benzoato) que se encuentran comercialmente disponibles (p. ej., en Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., EE.UU.).

E. Métodos y composiciones para el diagnóstico y la detección

En ciertas realizaciones, cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 de la invención (p. ej., los anticuerpos anti-CD3 biespecíficos de la invención que se unen a CD3 y a una segunda molécula biológica como, p. ej., un antígeno de la superficie celular, p. ej., el antígeno de un tumor, como los anticuerpos TDB de la invención o las variantes correspondientes) es útil para la detección de la presencia de un CD3 en una muestra biológica. El término "detección", según su uso en el presente, incluye la detección tanto cuantitativa como cualitativa. En ciertas realizaciones, una muestra biológica comprende una célula o un tejido.

En una realización, se proporciona un anticuerpo anti-CD3 para ser usado en un método de diagnóstico o detección. En un aspecto adicional, se suministra un método para la detección de la presencia de un CD3 en una muestra biológica. En ciertas realizaciones, el método implica contactar la muestra biológica con un anticuerpo anti-CD3, según se describe en el presente, bajo condiciones permisivas para la unión del anticuerpo anti-CD3 al CD3, y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo anti-CD3 y el CD3. Dicho método puede ser *in vitro* o *in vivo*.

En ciertas realizaciones, se proporcionan anticuerpos anti-CD3 etiquetados. Las etiquetas incluyen, pero no se limitan a, etiquetas o fracciones que se detectan

directamente (como, por ejemplo, etiquetas fluorescentes, cromofóricas, electrodensas, quimioluminiscentes y radiactivas), como así también fracciones, tales como enzimas o ligandos, que se detectan indirectamente, por ejemplo, a través de una reacción enzimática o de una interacción molecular. Las etiquetas ejemplares incluyen, pero no se limitan a, los radioisótopos ^{32}P, ^{14}C, ^{125}I, ^{3}H, y ^{131}I, fluoróforos como, por ejemplo, quelatos de tierra rara o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, luceriferasas, por ejemplo, la luciferasa de luciérnaga y la luciferasa bacteriana (Patente de EE.UU. No. 4,737,456), luciferina, 2,3-dihidroftalazinedionas, la peroxidasa de rábano rusticano (HRP), la fosfatasa alcalina, la β-galactosidasa, la glucoamilasa, la lisozima, la sacarida, las oxidasas como, por ejemplo, la glucosa oxidasa, la galactosa oxidasa y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, las oxidasas heterocíclicas como, por ejemplo, la uricasa y la xantina oxidasa, acoplada con una enzima que emplea peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor de un tinte como, por ejemplo, HRP, la lactoperoxidasa o la microperoxidasa, biotina/avidina, etiquetas de espín, etiquetas con bacteriófagos, radicales libres estables, y similares.

F. Formulaciones farmacéuticas

Las formulaciones farmacéuticas de un anticuerpo anti-CD3 de la invención (p. ej., el anticuerpo anti-CD3 biespecífico de la invención que se une al CD3 y a una segunda molécula biológica como, por ejemplo, un antígeno de la superficie celular como, p. ej., un antígeno de un tumor, como un anticuerpo TDB de la invención o la variante correspondiente) se preparan al mezclar dicho anticuerpo con el grado deseado de pureza con uno o más portadores farmacéuticamente aceptados de carácter opcional (*Pharmaceutical Sciences de Remington,* 16a edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los portadores farmacéuticamente aceptados son, por lo general, no tóxicos para los receptores en las dosis y las concentraciones empleadas, e incluyen, pero no se limitan a: tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluidos el ácido ascórbico y la metionina, conservantes (como el cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; butil, fenol o alcohol bencílico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m- cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas como, p. ej., albúmina sérica, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos incluyendo glucosa, mañosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; iones formadores de sales como el sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos proteicos de Zn), y/o agentes tensoactivos no iónicos tales como el polietilenglicol (PEG). Los presentes portadores farmacéuticamente aceptables de carácter ejemplar incluyen, a su vez, agentes intersticiales para la dispersión farmacológica tales como glicoproteínas

hialuronidasa solubles activas a pH neutro (sHASEGP), por ejemplo, glicoproteínas hialuronidasa PH-20 solubles en humanos tales como rHuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.). Ciertas sHASEGPs ejemplares y los métodos de uso, incluido rHuPH20, se describen en los siguientes números de las publicaciones de las patentes de EE.UU.: 2005/0260186 y 2006/0104968. En un aspecto, una sHASEGP se combina con uno o más glicosaminoglicanos adicionales como, por ejemplo, las condroitinas.

Las formulaciones de anticuerpos liofilizadas de carácter ejemplar se describen en la patente de EE.UU. No. 6,267,958. Las formulaciones de anticuerpos acuosas incluyen las descriptas en la patente de EE.UU. No. 6,171,586 y WO2006/044908, las últimas formulaciones incluyen un tampón de histidina-acetato.

La presente formulación puede contener, a su vez, más de un ingrediente activo según sea necesario en relación con la indicación específica que se esté tratando, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no se afectan negativamente entre sí. Por ejemplo, podría resultar deseable proporcionar un agente terapéutico adicional (p. ej., un agente quimioterapéutico, un agente citotóxico, un agente inhibidor del crecimiento, y/o un agente anti-hormonal, como los mencionados anteriormente). Dichos ingredientes activos se encuentran presentes de manera apropiada en combinación en cantidades que son efectivas para los propósitos previstos.

Los ingredientes activos se pueden atrapar en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacilato), respectivamente; en sistemas coloidales de suministro de fármacos (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se describen en *Pharmaceutical Sciences de Remington,* 16a edición, Osol, A. Ed. (1980).

Es posible elaborar preparaciones de liberación sostenida. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el anticuerpo, matrices que están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas.

Las formulaciones a usar para la administración *in vivo* son, por lo general, estériles. La esterilidad se puede lograr con facilidad, por ejemplo, por medio de la filtración a través de membranas de filtración estériles.

G. Métodos y composiciones terapéuticos

Es posible usar cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 de la invención (p. ej., los anticuerpos anti-CD3 biespecíficos de la invención que se unen a CD3 y a una segunda molécula biológica como, p. ej., el antígeno de la superficie celular, p. ej., el antígeno de un tumor, como los anticuerpos TDB de la invención o las variantes correspondientes) en los métodos terapéuticos.

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-CD3 para ser usado como un medicamento. En otros aspectos, se proporciona un anticuerpo anti-CD3 para ser usado

en el tratamiento o en el retraso correspondiente al progreso de un trastorno de proliferación celular (p. ej., cáncer) o de un trastorno autoinmunitario (p. ej., artritis). En ciertas realizaciones, se proporciona un anticuerpo anti-CD3 para ser usado en un método de tratamiento. En ciertas realizaciones, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD3 para ser usado en un método de tratamiento de un individuo con un trastorno de proliferación celular o con un trastorno autoinmunitario que comprenda la administración a dicho individuo de una cantidad efectiva del anticuerpo anti-CD3. En una realización de la antes mencionada naturaleza, el método comprende, a su vez, la administración al individuo de una cantidad efectiva de, al menos, un agente terapéutico adicional, según se describe anteriormente. En otras realizaciones, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD3 para ser usado en la mejora de la función inmunitaria de un individuo que padezca un trastorno de proliferación celular o un trastorno autoinmunitario. En ciertas realizaciones, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD3 para ser usado en un método para la mejora de la función inmunitaria de un individuo que padezca un trastorno de proliferación celular o un trastorno autoinmunitario que comprenda la administración al individuo de una cantidad efectiva del anticuerpo anti-CD3 para activar las células efectoras (p. ej., células T, p. ej., CD8+ y/o CD4+ células T), expandir (incrementar) una población de células efectoras, reducir una población de células objetivo (p. ej., una célula que expresa una segunda molécula biológica reconocida por un anticuerpo anti-CD3 de la invención como, por ejemplo, un anticuerpo TDB biespecífico de la invención), y/o matar una célula objetivo (p. ej., célula objetivo de un tumor). Un “individuo”, conforme a cualquiera de las realizaciones anteriores, puede ser un humano.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD3 para ser usado en la fabricación o preparación de un medicamento. En una realización, el medicamento se usa para el tratamiento de un trastorno de proliferación celular (p. ej., cáncer) o de un trastorno autoinmunitario (p. ej., artritis). En una realización adicional, el medicamento es para ser usado en un método de tratamiento de un trastorno de proliferación celular o de un trastorno autoinmunitario que comprenda la administración a un individuo con un trastorno de proliferación celular o con un trastorno autoinmunitario de una cantidad efectiva del medicamento. En una realización de la antes mencionada naturaleza, el método comprende, a su vez, la administración al individuo de una cantidad efectiva de, al menos, un agente terapéutico adicional, según se describe anteriormente. En una realización adicional, el medicamento se usa para activar las células efectoras (p. ej., células T, p. ej., CD8+ y/o CD4+ células T), expandir (incrementar) una población de células efectoras, reducir una población de células objetivo (p. ej., una célula que expresa una segunda molécula biológica reconocida por un anticuerpo anti-CD3 de la invención como, por ejemplo, un anticuerpo TDB biespecífico de la invención), y/o matar células objetivo (p. ej., célula objetivo de un tumor) en el individuo. En una realización adicional, el medicamento es para ser usado en un método para la mejora de la función inmunitaria de un individuo que padezca un trastorno de proliferación celular o un trastorno

autoinmunitario que comprenda la administración al individuo de una cantidad efectiva del medicamento para activar las células efectoras (p. ej., células T, p. ej., CD8+ y/o CD4+ células T), expandir (incrementar) una población de células efectoras, reducir una población de células objetivo (p. ej., una célula que expresa una segunda molécula biológica reconocida por un anticuerpo anti-CD3 de la invención como, por ejemplo, un anticuerpo TDB biespecífico de la invención), y/o matar una célula objetivo (p. ej., célula objetivo de un tumor). Un "individuo", conforme a cualquiera de las realizaciones anteriores, puede ser un humano.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para el tratamiento de un trastorno de proliferación celular (p. ej., cáncer) o de un trastorno autoinmunitario (p. ej., artritis). En una realización, el método comprende la administración al individuo que padezca un trastorno de proliferación celular o un trastorno autoinmunitario de una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-CD3. En una realización de la antes mencionada naturaleza, el método comprende, a su vez, la administración al individuo de una cantidad efectiva de, al menos, un agente terapéutico adicional, según se describe anteriormente. Un "individuo", conforme a cualquiera de las realizaciones anteriores, puede ser un humano.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para la mejora de la función inmunitaria de un individuo que padezca un trastorno de proliferación celular o un trastorno autoinmunitario en un individuo con un trastorno de proliferación celular o con un trastorno autoinmunitario. En una realización, el método comprende la administración al individuo de una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-CD3 para activar las células efectoras (p. ej., células T, p. ej., CD3+ y/o CD8+ células T), expandir (incrementar) una población de células efectoras, reducir una población de células objetivo (p. ej., una célula que expresa una segunda molécula biológica reconocida por un anticuerpo anti-CD4 de la invención como, por ejemplo, un anticuerpo TDB biespecífico de la invención), y/o matar una célula objetivo (p. ej., célula objetivo de un tumor). En una realización, un "individuo" es un humano.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para el tratamiento de un cáncer hematológico tal como un cáncer de células B (por ejemplo, linfoma de células B maduras) por medio de la administración de una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-CD3 de la invención, como un anticuerpo anti-CD3 biespecífico de la invención, como una TDB que busca células anti-B, como un CD20-TDB con un brazo anti-CD3 y un brazo anti-CD20. En un aspecto adicional de la realización, el linfoma de células B maduras es un linfoma no Hodgkin (NHL). En un aspecto adicional de la realización, el NHL es seleccionado del grupo que comprende: linfoma difuso de células B grandes semejantes a las del centro germinal (GCB), linfoma difuso de células B grandes semejantes a la célula B activada (ABC), linfoma folicular (FL), linfoma de células de manto (MCL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfoide crónica (CLL), linfoma de zona marginal (MZL), leucemia linfocítica de célula pequeña (SLL), linfoma linfoplasmacítico (LL), macroglobulinemia de Waldenstrom (WM), linfoma del sistema nervioso central (CNSL),

linfoma de Burkitt (BL), leucemia prolinfocítica de células B, linfoma esplénico de zona marginal, leucemia de células vellosas, linfoma o leucemia esplénico, inclasificable, linfoma esplénico difuso de células B pequeñas de la pulpa roja, variante de leucemia de células vellosas, macroglobulinemia de Waldenstrom, enfermedades de cadenas pesadas, enfermedad de cadenas pesadas alfa, enfermedad de cadenas pesadas gamma, enfermedad de cadenas pesadas μ, mieloma de células plasmáticas, plasmocitoma óseo solitario, plasmocitoma extraóseo, linfoma de zona marginal nodal de tejido linfoide asociado a mucosa (linfoma MALT), linfoma de zona marginal nodal, linfoma de zona marginal nodal pediátrico, linfoma folicular pediátrico, linfoma primario cutáneo de células del centro folicular, linfoma de células grandes B rico en células T/histiocitos, linfoma primario del sistema nervioso central, linfoma cutáneo primario, linfoma tipo pierna, linfoma difuso de células B grandes positivo al virus de Epstein-Barr del anciano, linfoma difuso de células B grandes asociado con la inflamación crónica, granulomatosis linfomatoide, linfoma primario mediastinal de células B (tímico), linfoma de células B grandes intravascular, linfoma de células B grandes positivo al ALK, linfoma plasmablástico, linfoma de células B grandes tras enfermedad de Castleman asociada a infección por virus HHV8, linfoma primario de efusión: linfoma de células B, inclasificable, con características intermedias entre linfoma difuso de células B grandes y linfoma de Burkitt, y linfoma de células B, inclasificable, con características intermedias entre linfoma difuso de células B grandes y linfoma clásico de Hodgkin. En una realización preferente de la invención, el método abarca el tratamiento de un cáncer que comprende linfoma difuso de células B grandes semejantes a las del centro germinal (GCB), linfoma difuso de células B grandes semejantes a la célula B activada (ABC), linfoma folicular (FL), linfoma de células de manto (MCL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfoide crónica (CLL), linfoma de zona marginal (MZL), leucemia linfocítica de célula pequeña (SLL), linfoma linfoplasmacítico (LL), macroglobulinemia de Waldenstrom (WM), linfoma del sistema nervioso central (CNSL), linfoma de Burkitt (BL).

En una realización, el método comprende la administración a un individuo que padezca dicho cáncer hematológico (como un cáncer de células B, por ejemplo, linfoma de células B) de una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-CD3 de la invención, como un anticuerpo TDB biespecífico, como un CD20-TDB que comprende un brazo dirigido a anti-CD20 y un brazo dirigido a anti-CD3. En una realización, un CD20 TDB es co-administrado con rituximab y obinutuzumab.

En una realización adicional, el anticuerpo anti-CD3 de la invención (por ejemplo, el CD20 TDB), con o sin un anticuerpo monoclonal CD20, es administrado con un agente quimioterapéutico y/o un conjugado de anticuerpo y fármaco (ADC). En otra realización, el agente terapéutico es un modificador biológico.

En un aspecto adicional de la invención, el tratamiento adicional comprende un anticuerpo anti-CD20. En una realización, el anticuerpo anti-CD20 es rituximab. En una realización, el anticuerpo anti-CD20 es un anticuerpo B-Ly 1 humanizado. En una

realización, el anticuerpo B-Ly 1 humanizado es obinituzumab. En una realización, el anticuerpo anti-CD20 es ofatumumab, ublituximab, o ibritumomab tiuxetan.

En un aspecto adicional de la invención, el tratamiento adicional comprende un agente alquilante. En una realización, el agente alquilante es 4-[5-[Bis(2-cloroetil)amino]-1-metilbenzimidazol-2-il]ácido butanoico y las sales del mismo. En una realización, el agente alquilante es bendamustina.

En un aspecto adicional de la invención, el tratamiento adicional comprende un inhibidor de BCL-2. En una realización, el inhibidor de BCL-2 es 4-(4-{[2-(4-clorofenil)-4,4-dimetilciclohex-1-en-1-il]metiyl}piperazin-1-il)-N-({3-nitro-4-[(tetrahidro-2H-piran-4-ilmetil)amino]fenil}sulfonil)-2-(1H-pirrolo[2,3-b]piridin-5-iloxi)benzamida y las sales de la misma. En una realización, el inhibidor de BCL-2 es venetoclax (CAS n.°: 1257044-40-8).

En un aspecto adicional de la invención, el tratamiento adicional comprende un inhibidor de fosfoinositida 3-quinasa (PI3K). En una realización, el inhibidor de PI3K inhibe la isoforma delta de PI3K (p.ej. P110δ). En algunas realizaciones, el inhibidor de PI3K es 5-fluoro-3-fenil-2 - [(1S) -1- (7H-purin-6-ilamino) propil] -4 (3H) -quinazolinona y las sales de la misma. En algunas realizaciones, el inhibidor de PI3K es idelalisib (CAS n.°: 870281-82-6). En una realización, el inhibidor de PI3K inhibe las isoformas alfa y delta de PI3K. En algunas realizaciones, el inhibidor de PI3K es 2-{3-[2-(1-isopropil-3-metil-1H-1,2–4-triazol-5-il)-5,6-dihidrobenzo[f]imidazo[1,2-d][1,4]oxazepin-9-il]-1H-pirazol-1-il}-2-metilpropanamida y las sales de la misma.

En un aspecto adicional de la invención, el tratamiento adicional comprende un inhibidor de tirosina quinasa de Bruton (BTK). En una realización, el inhibidor de BTK es1-[(3R)-3-[4-amino-3-(4-fenoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il]piperidin-1-il]prop-2-en-1-ona y las sales de la misma. En una realización, el inhibidor de BTK es ibrutinib (CAS n.°: 936563-96-1).

En un aspecto adicional de la invención, el tratamiento adicional comprende talidomida o un derivado de la misma. En una realización, la talidomida o un derivado de la misma es (RS)-3-(4-amino-1-oxo 1,3-dihidro-2H-isoindol- 2-il) piperidina-2,6-diona y las sales de la misma. En una realización, la talidomida o un derivado de la misma es lendalidomida (CAS n.°: 191732-72-6).

En un aspecto adicional de la invención,el tratamiento adicional comprende una o más de ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina o prednisolona (CHOP). En una realización, el tratamiento adicional comprende además un anticuerpo anti-CD20 según lo antes descrito (p.ej. GA-101 o Rituxan®). Puede utilizarse, sin limitación, cualquiera de los métodos y tratamientos anteriores para cualquier tipo de cáncer, que incluye, por ejemplo, el tratamiento de un cáncer de células B o cáncer de mama.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para el tratamiento de cánceres HER2 positivos. En una realización, el método comprende la administración a un individuo que padezca dicho cáncer de una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-HER2 de la invención, como un anticuerpo TDB biespecífico, con un brazo dirigido anti-

HER2 y un brazo dirigido anti-CD3. En una realización preferente, el HER2-TDB posee un perfil de toxicidad aceptable cuando se lo administra en una dosis efectiva al paciente. En una realización, el brazo CD3 del HER2-TDB con un perfil de toxicidad aceptable es un brazo CD3 de baja afinidad. En una realización, el brazo CD3 del HER2-TDB con un perfil de toxicidad aceptable es 40G5c.

En una realización preferente, el cáncer HER2 positivo es un cáncer de mama HER2 positivo o cáncer gástrico HER2 positivo. En una realización, un HER2 TDB es co-administrado con uno o más agentes terapéuticos adicionales que se dirigen a la vía HER. En una realización, el agente terapéutico que se dirige a la vía HER es seleccionado de un inhibidor EGFR, un inhibidor HER2, un inhibidor HER3, y/o un inhibidor HER4. En una realización, un HER2 TDB es co-administrado con uno o más agentes terapéuticos adicionales seleccionados de trastuzumab (Herceptin®), T-DM1 (Kadcyla®) y pertuzumab (Perjeta®). En una realización, un HER2 TDB es co-administrado con trastuzumab. En una realización, un HER2 TDB es co-administrado con T-DM1. En una realización, un HER2 TDB es co-administrado con pertuzumab. En una realización, un HER2 TDB es co-administrado con trastuzumab y pertuzumab. En una realización, un HER2 TDB es co-administrado con T-DM1 y trastuzumab.

En un aspecto adicional, la invención proporciona formulaciones farmacéuticas que comprenden alguno de los anticuerpos anti-CD3 previstos en el presente, p.ej. para utilizar en alguno de los métodos clínicos anteriores. En una realización, una fórmula farmacéutica comprende alguno de los anticuerpos anti-CD3 previstos en el presente y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización, una formulación farmacéutica comprende alguno de los anticuerpos anti-CD3 previstos en el presente y, al menos, un agente clínico adicional, por ejemplo, según lo descrito en el presente.

Los anticuerpos de la invención pueden utilizarse solos o en combinación con otros agentes en un tratamiento. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención puede coadministrarse con, al menos, un agente clínico adicional. En ciertas realizaciones, un agente clínico adicional es un agente quimioterapéutico, agente inhibidor del crecimiento, agente citotóxico, agente utilizado en terapia de radiación, agente anti-angiogénesis, agente apoptótico, agente anti-tubulina, u otro agente, tal como un antagonista del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (p.ej. un inhibidor de tirosina quinasa), inhibidor de HER1 / EGFR (p.ej. erlotinib (Tarceva*TM*), inhibidor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (p.ej. Gleevec*TM* (mesilato de imatinib)), un inhibidor de la COX-2 (p.ej. celecoxib), interferón, citoquinas, anticuerpos que no sean el anticuerpo anti-CD3 de la invención, como un anticuerpo que se une a uno o más de los siguientes receptores ErbB2, ErbB3, ErbB4, PDGFR-beta, BlyS, APRIL, BCMA VEGF, o VEGF objetivo, TRAIL/Apo2, PD-1, PD-L1, PD-L2, u otro agente bioactivo o de química orgánica.

En algunas modalidades, la invención proporciona un método en el que el agente clínico adicional es un glucocorticoide. En una realización, el glucocorticoide es dexametasona.

Dichas terapias de combinación indicadas anteriormente abarcan la administración

combinada (donde dos o más agentes clínicos se incluyen en las mismas formulaciones o formulaciones separadas) y la administración separada, en cuyo caso, se pueden producir la administración del anticuerpo de la invención antes, simultáneamente, o después de la administración del agente o agentes clínicos adicionales. En una realización, la administración del anticuerpo anti-CD3 y la administración de un agente clínico adicional se producen en un mes o en el plazo de aproximadamente una, dos o tres semanas, o en aproximadamente uno, dos, tres, cuatro, cinco, o seis días, el uno del otro. También se puede usar cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 de la invención (p. ej., los anticuerpos anti-CD3 biespecíficos de la invención que se unen a CD3 y a una segunda molécula biológica como, p. ej., el antígeno de la superficie celular, el antígeno de un tumor, como el anticuerpo TDB de la invención o la variante correspondiente) en combinación con el tratamiento de radiación.

Un anticuerpo de la invención (o cualquier agente clinico adicional) se puede administrar por cualquier medio adecuado, que incluye parenteral, intrapulmonar e intranasal, y, si se desea para el tratamiento local, la administración intralesional. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, o subcutánea. En algunas representaciones, el anticuerpo se administra por vía subcutánea. En algunas representaciones, el anticuerpo anti-CD3 que se daministra mediante inyección subcutánea exhibe una respuesta menos tóxica en el paciente en que el mismo anticuerpo anti-CD3 le es administrado por inyección intravenosa. La dosis puede administrarse por cualquier vía adecuada, por ejemplo, mediante inyecciones, como inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica. En el presente se contemplan varios cronogramas de administración de la dosis que incluyen, por ejemplo, administraciones únicas o múltiples, en diversos puntos de tiempo, administración en bolo e infusión de pulso.

Los anticuerpos de la invención se formularían, dosificarían y administrarían de manera coherente con la buena práctica médica. Los factores a considerar en este contexto incluyen el trastorno particular a tratar, el mamífero específico que se trata, la condición clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de suministro del agente, el método de administración, el cronograma de la administración y otros factores conocidos por los médicos. El anticuerpo no necesariamente debe ser, pero se formula opcionalmente con uno o más agentes utilizados en la actualidad para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad del anticuerpo presente en la formulación, el tipo de trastorno o tratamiento y otros factores analizados anteriormente. En general, se utilizan en las mismas dosis y vías de administración que se describen en el presente, o aproximadamente del 1 al 99% de las dosis descritas en el presente, o en cualquier dosis y por cualquier vía que se determine que es empíricamente/clínicamente adecuada.

Para la prevención o el tratamiento de la enfermedad, la dosis adecuada de un anticuerpo de la invención (cuando se usa solo o en combinación con uno o más de otros

agentes clínicos adicionales) dependerá del tipo de enfermedad a tratar, el tipo de anticuerpo, la gravedad y el curso de la enfermedad, si el anticuerpo se administra con fines preventivos o clínicos, tratamiento previo, la historia clínica del paciente y la respuesta al anticuerpo, y la discreción del médico tratante. El anticuerpo se administra convenientemente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos.

Como propuesta general, la cantidad clínicamente eficaz del anticuerpo anti-CD3 administrada a humanos estará en el rango de alrededor de 0,01 a 100 mg/kg del peso corporal del paciente ya sea mediante una o más administraciones. En algunas realizaciones, el anticuerpo utilizado es de alrededor de 0,01 a 45 mg/kg, alrededor de 0,01 a 40 mg/kg, alrededor de 0,01 a 35 mg/kg, alrededor de 0,01 a 30 mg/kg, alrededor de 0,01 a 25 mg/kg, alrededor de 0,01 a 20 mg/kg, alrededor de 0,01 a 15 mg/kg, alrededor de 0,01 a 10 mg/kg, alrededor de 0,01 a 5 mg/kg, o alrededor de 0,01 a 1 mg/kg administrador diariamente, por ejemplo. En una realización, un anticuerpo anti-CD3 descrito en el presente se administra a humanos a una dosis de alrededor de 100 mg, alrededor de 200 mg, alrededor de 300 mg, alrededor de 400 mg, alrededor de 500 mg, alrededor de 600 mg, alrededor de 700 mg, alrededor de 800 mg, alrededor de 900 mg, alrededor de 1000 mg, alrededor de 1100 mg, alrededor de 1200 mg, alrededor de 1300 mg o alrededor de 1400 mg el día 1 de los ciclos de 21 días. La dosis puede administrarse como una dosis única o con dosis múltiples (p.ej. 2 o 3 dosis), como infusiones. Para las dosis repetidas durante varios días o más, según la condición, el tratamiento se mantendría, en general, hasta que se produzca una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Una dosis ejemplar del anticuerpo estaría en el rango de alrededor de 0,05 mg/kg a alrededor de 10 mg/kg. Por lo tanto, una o más dosis de alrededor de 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas) podría administrarse al paciente. Dichas dosis pueden administrarse intermitentemente, por ejemplo, cada semana o cada tres semanas (p.ej. de modo tal que el paciente reciba de aproximadamente dos a unas veinte o, por ejemplo, alrededor de seis dosis del anticuerpo anti-CD3). Puede administrarse una dosis de carga inicial más elevada, seguida de una o más dosis más bajas. El avance de este tratamiento se monitoriza fácilmente a través de técnicas y ensayos convencionales.

En algunas realizaciones, los métodos pueden comprender además un tratamiento adicional. El tratamiento adicional puede ser terapia de radiación, cirugía, quimioterapia, terapia genética, terapia de ADN, terapia viral, terapia de ARN, inmunoterapia, trasplante de médula osea, nanoterapia, terapia de anticuerpo monoclonal o una combinación de los anteriores. El tratamiento adicional puede ser en forma de tratamiento adyuvante o neoadyuvante. En algunas realizaciones, el tratamiento adicional es la administración del inhibidor de molécula pequeña enzimática o del agente anti-metastásico. En algunas realizaciones, el tratamiento adicional es la administración de agentes limitantes de efectos secundarios (p.ej. agentes destinados a disminuir la ocurrencia o gravedad de los efectos secundarios del tratamiento, como los agentes antinauseosos, etc.). En algunas realizaciones, el tratamiento adicional es la terapia de radiación. En algunas

realizaciones, el tratamiento adicional es cirugía. En algunas realizaciones, el tratamiento adicional es una combinación de terapia de radiación y cirugía. En algunas realizaciones, el tratamiento adicional es la irradación gamma. En algunas realizaciones, el tratamiento adicional puede ser una administración separada de uno o más de los agentes clínicos antes descritos.

H. Artículos de fabricación

En otro aspecto de la invención, se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento, la prevención o el diagnóstico de los trastornos antes descritos. El artículo de fabricación comprende un envase y una etiqueta o un inserto del empaque en o asociado con el envase. Los envases adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas, bolsas de solución IV, etc. Los envases pueden estar formados de diversos materiales como vidrio o plástico. El envase contiene una composición que es por sí misma o combinada con otra composición eficaz para tratar, prevenir o diagnosticar la condición y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el envase puede tener una bolsa de infusión o un vial que tiene un tapón perforable con una aguja de inyección hipodérmica). Por lo menos un agente activo de la compoisición es un anticuerpo de la invención. La etiqueta o el inserto del empaque indica que la composición se utiliza para tratar la condición de elección. Por otra parte, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer envase con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un anticuerpo de la invención; y (b) un segundo envase con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un agente citotóxico o de otro modo clínico adicional. El artículo de fabricación en esta realización de la invención puede comprender, además, un inserto del empaque que incique que la composiciones pueden utilizarse para tratar una condición especíica. Opcional o adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo (o tercer) envase que comprende una solucíoon amortiguadora farmacéuticamente aceptable, como agua bacteriostática para inyección (BWFI), solución salina amortiguada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, que incluyen otras soluciones amortiguadoras, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

III. EJEMPLOS

Los siguientes son ejemplos de métodos y composiciones de la invención. Se entiende que pueden ponerse en práctica otras diversas versiones, dada la descripción general proporcionada anteriormente.

Ejemplo 1. Generación de Anticuerpos Anti-CD3

Antígenos CD3ε

A. CD3ε humano y macaco biespecíficos+ CD3γ fusionado con IgG2a-Fc de ratón (CD3εγ-muFc)

El ADNc que codifica porciones extracelulares de CD3ε humano o de mono cynomolgus (macaco) o CD3γ se fusionó en el C-terminal con un IgG2a de ratón en Fc para generar fusiones de CD3-Fc. Los ADNc que codifican los dominios extracelulares de CD3ε y CD3γ humano o macaco se generaron con ARN total de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) activada con anti-CD3/anti-CD28. Las PBMC normales se activaron mediante anti-CD3 y anti-CD28 inmovilizados por placa en RPMI complementado con un 10% de FBS durante 72 h. El ARNm total se aisló con un mini kit RNeasy de Qiagen. Se clonó el ADNc con iniciadores específicos de genes por RT-PCR en vectores TOPO con productos de PCR amplificados con polimerasa Taq siguiendo el protocolo proporcionado con el kit de clonación TOPO TA de Invitrogen. Los fragmentos resultantes se introdujeron en un vector de expresión mamífero que contiene un dominio Fc de IgG2a murino por subclonación libre de restricciones con polimerasa de ADN de alta fidelidad Phusion (New England Biolabs, Catálogo n.° M0530L). Los fragmentos de CD3 se amplificaron de esta manera con la superposición de las regiones contenidas en el plásmido de la plantilla para orientarlos directamente en forma descendente de la secuencia de la señal y el N-terminal al Fc murino.

Tanto para las construcciones humana como de macaco, el CD3ε-Fc que contiene el plásmido se co-expresó temporalmente con el CD3γ-Fc que contiene el plásmido en las células CHO mamíferas. Los heterodímeros de CD3ε/γ se purificaron con sefarosa de proteína A (Pharmacia Biotech).

B. Conjugados de KLH de péptido de N-terminal (CD3ε-KLH)

Se sintetizaron fragmentos de péptidos que contienen secuencias de N-terminal de CD3ε de macaco y humano. Los fragmentos destinados a la inmunización se conjugaron con hemocianina de lapa californiana (KLH), una proteína portadora ampliamente utilizada para generar una respuesta inmune importante. Al añadir la cisteína de origen natural en la posición 28 para el CD3ε de macaco y humano permitía el acoplamiento de KLH activada por maleimida a la cisteína de C-terminal que contiene tiol.

*C. CD3ε-26mero-CD3*γ de cadena sencilla *(CD3εγ)*

Los ADNc que codifican porciones extracelulares de subunidades CD3ε y CD3γ humanas fueron generados por RCP. Los aminoácidos 1-97 de CD3ε humano y los aminoácidos 1-81 de CD3γ humano se conectaron con un conector peptídico flexible de 26 aminoácidos para formar una construcción de CD3ε-26mero-CD3γ (CD3εγ) (Figura 1). La construcción se clonó en un vector de expresión con un His-tag para la secreción de *E. coli* con el promotor de fosfatasa alcalina y la secuencia de la señal de secreción STIII. CD3εγ se purificó en una columna Ni y posteriormente se volvió a plegar. A continuación, el CD3εγ debidamente plegado se purificó luego con una columna de afinidad OKT3.

Además, para algunos experimentos de aglutinación, se compró CD3ε comercial a Creative Biomart, Shirley, New York 11967 (Número de catálogo CD3E-2194H).

Inmunizaciones

A. Inmunizaciones de ratón

Se inmunizó a ratones BALB/c o C57BL/6 (2 µg o 10 µg/inyección por ratón). Los antígenos, suspendidos en adyuvante de monofosforil lípido A /trehalosa dicorinomicolato, se inyectaron en la almohadilla de la pata a intervalos de 3 a 4 días por un total de 12-15 refuerzos. Tres días después del refuerzo previo a la infusión final, se recolectaron linfocitos de bazos y nódulos linfáticos de ratones inmunizados. Los linfocitos de los ratones aislados se fusionaron con células de mieloma SP2/0-Ag14 (Recolección de cultivo tipo estadounidense) con el aparato Cyto Pulse CEEF-50 (Cyto Pulse Sciences). Brevemente, después de lavar dos veces con medio C de Citofusion (N.° de cat. LCM-C), las células del bazo y las células SP2/0-Ag14 aisladas se mezclaron en una proporción de 1:1 y luego se suspendieron a 10 millones de células/ml en medio C de Citofusion, se realizó electrofusión de acuerdo con la instrucción del fabricante. Las células fusionadas se cultivaron en medio C de ClonaCell-HY (N.° de cat. 03803) durante la noche a 37 °C en una incubadora de CO_2 al 7%. Al día siguiente, las células fusionadas se centrifugaron y luego se suspendieron en 10 ml de medio C de ClonaCell-HY y luego se mezclaron suavemente con 90 ml de medio D basado en metilcelulosa ClonaCell-HY (N.° de cat. 03804) que contiene componentes de HAT. Las células se colocaron en placas OmniTray (Thermo Scientific) y se permitió su crecimiento a 37 °C en una incubadora de CO_2 al 7%. Después de 6 a 7 días de incubación, se recogieron clones de hibridoma individuales con ClonePix FL (Molecular Devices) y se transfirieron en placas de cultivo de células de 96 pozos (N.° 353075, Becton Dickinson) con medio E de 200 µl/pozo de ClonaCell-HY (N.° de cat. 03805). Los medios de cultivo de hibridoma se cambiaron antes de la evaluación ELISA.

B. Inmunizaciones de conejo

Se realizaron inmunizaciones en conejos con 0,5 mg/inyección con CD3ε-KLH humano y de macaco CFA/IFA cada 2 semanas por 5 inyecciones (d0, d14, d28, d42, d56). Se tomaron sangrados los días 52 y 66.

Las fusiones y selecciones de PEG se realizaron de la siguiente manera: Se evaluaron los clones para unión a la porción N-terminal de CD3ε conjugada con tiroglobulina (THY) con ELISA. Se determinó que todos los clones positivos tienen una reacción cruzada con CD3ε de macaco mediante ELISA y se seleccionaron 16 clones únicos para subclonación. Se extrajo el ARN total del sedimento celular congelado y se purificó con un kit RNeasy de Qiagen siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADNc de primera cadena se sintetizó con un paso de RT-PCR (Qiagen). Los dominios VH y VL de conejo se amplificaron aún más con PCR con un protocolo descrito para generar genotecas inmunes de conejo (Kontermann y Dubel. *Antibody Engineering*. 1: 115-123, 2010). Se

designó la degeneración moderada para representar los genes de inmunoglobulina de la línea germinal del conejo común.

Selección de anticuerpos

A. Selección de hibridoma de ratón

3 días después del cambio de medios, se seleccionaron supernadantes de hibridoma mediante ELISA para la unión con CD3ε tanto humano como de macaco, como se describe a continuación. Todos los clones positivos de ELISA se seleccionaron además mediante citometría de flujo para la unión a células T Jurkat humanas, PBMC humanas y PBMC de macaco (Figuras 2 y 3). Se purificaron supernadantes de hibridoma mediante cromatografía de afinidad de Proteína A, luego se realizó una filtración estéril (tamaño de poro de 0,2-µm, Nalge Nunc International, NY, EE.UU.) y se almacenaron a 4°C en PBS. Se confirmaron mAbs purificados mediante ELISA antes de la evaluación en ensayos funcionales. Se determinó el isotopo mAb con un kit para isotipos de anticuerpos monoclonales de ratón de Roche Diagnostics Corporation.

La Figura 4A muestra las secuencias de aminoácidos de dominios variables de cadena ligera y pesada de los anticuerpos anti-CD3 13A3, 72H6 y 19B1. La Figura 4A también delimita las secuencias de HVR para cada uno de los tres anticuerpos. Las Figuras 4B, 4C, 5A y 5B muestran las secuencias de aminoácidos de dominios variables de cadena ligera y pesada de otros anticuerpos anti-CD3.

B. Selección después de las inmunizaciones de conejo

Se clonaron ocho secuencias de cadena pesada individuales y seis secuencias de cadena ligera individuales de las líneas de células de hibridoma. La Figura 7 muestra las secuencias de cadena pesada y ligera para uno de estos anticuerpos, Rab17. Debido a la gran similitud en la secuencia se decidió enfocarse en 6 pares pesados y ligeros. Los 6 anticuerpos resultantes se expresaron como IgG quiméricos de conejo/humano a pequeña escala (cultivos de 100 ml de 293S) y se seleccionaron para la unión a CD3 epsilon mediante ELISA.

Caracterización de anticuerpos: ensayos de afinidad de unión y actividad de activación de células T

A. Ensayo ELISA de unión de CD3εγ

El ensayo ELISA de unión de CD3εγ se llevó a cabo en placas ELISA de microtitulación de 96 pozos (Greiner, Alemania) recubiertos con aminoácidos de N-terminal de CD3ε ya sea humano/de macaco conjugados con THY o CD3ε/γ ya sea humano/de macaco fusionado con Fc murino a 2 µg/ml en una solución amortiguadora de carbono de 0,05 M (pH 9,6), 4°C durante la noche. Después de lavar tres veces con solución amortiguadora de lavado (0,05% Tween 20 en PBS), las placas se bloquearon con 200 µL de diluyentes de ensayo ELISA con BSA. Se añadieron e incubaron 100 µL de supernadantes cultivados o mAb purificados diluidos durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres

veces y se incubaroncon IgG Fc anti ratón de cabra conjugado con HRP durante 1 hora. Después de lavar tres veces, se detectó una enzima ligada al agregar 100 µL/pozo de sustrato de TMB (BioFX Laboratories, MD, EE.UU.) durante 5 minutos. Se detuvieron las reacciones al agregar 100 µL/pozo de reactivo de detención (BioFX Laboratories, MD, EE.UU.) y la detección de color a A_{630} *nm*.

B. Análisis de citometría de flujo

Células T Jurkat humanas, PBMC humanas o PBMC de macaco se lavaron dos veces con solución amortiguadora de tinción de FACS (solución salina amortiguada con fosfato que contiene un 1% de suero fetal bovino) y luego se suspendieron en solución amortiguadora de tinción de FACS hasta una concentración final de 5 x 10^6 celulas/ml. Se agregaron células de 100 µl a la placa de cultivo de tejido de 96 pozo con fondo en U (#353077, Becton Dickinson) y se agregaron 100 µl de supernadantes de hibridoma o mAbs purificados diluidos. Después de 30 minutos de incubación en hielo, se lavaron las células dos veces con solución amortiguadora de tinción de FACS y se tiñeron posteriormente con anticuerpo IgG anti ratón de cabra conjugado con FITC o aloficocianina (APC)(#1012-11, Southern Biotech) a una dilución de 1:300 durante 30 minutos. Después de lavar dos veces con solución amortiguadora de tinción de FACS, las células se analizaron mediante citometría de flujo FACSCalibur (BD Biosciences). Los datos se analizaron con el software FlowJo (Tree Star, Inc.).

C. Ensayo de activación de célula T humana

Se recolectó sangre humana en jeringas heparinizadas y se aisló PBMC con Leucosep (Greiner Bio-one, n.° de cat. 227290P) y Ficoll Paque Plus (GE Healthcare Biosciences, n.° de cat. 95038-168), según lo recomendado por la fabricación. Las células se lavaron en medio RPMI que contiene un 10% de FBS, complementado con GlutaMax (Gibco, n.° de cat. 35050-061), penicilina y estreptomicina (Gibco, n.° de cat.15140-122), y se agregaron ~0,2 millones de células suspendidas a una placa con fondo en U de 96 pocillos. Se agregaron anticuerpos anti-CD3 entre 0,01 y 10 µg/ml. Después cultivar durante ~ 20 horas, se lavaron las células con solución amortiguadora FACS (0,5% BSA, 0,05% azida de Na en PBS). Luego se tiñeron las células con anti-CD69-FITC (BD, cat n.° 555530), anti-CD25-PE (BD, cat n.° 555432) anti-CD4-APC (BD, cat n.° 555349) o anti-CD8-APC (BD, cat n.° 555369) en solución amortiguadora FACS, se lavaron con solución amortiguadora FACS y se suspendieron en 100 ul de solución amortiguadora de FACS que contiene 1µg/ml de yoduro de propidio. Se recopilaron los datos en un citómetro de flujo FACSCalibur y se analizaron con FlowJo. Se determinó el grado de activación de las células T comparando el porcentaje de población CD69 + y CD25 + en las células CD4 + o CD8 + T.

D. Ensayo de activación de células T en macacos

Se extrajo sangre de macaco en tubos heparinizados. Se lisaron glóbulos rojos dos veces

con tampón de lisis de glóbulos rojos ACK (0,874% de NH4Cl, 0,1% de KHCO3, 0,00368 de EDTA de disodio). Las células se lavaron en medio RPMI que contiene un 10% de FBS, complementado con GlutaMax (Gibco, n.° de cat. 35050-061), penicilina y estreptomicina (Gibco, n.° de cat.15140-122), y se agregaron ~0,2 millones de células suspendidas a una placa con fondo en U de 96 pocillos. Se agregaron anticuerpos anti-CD3 a 10 µg/ml. Después cultivar durante ~ 20 horas, se lavaron las células con solución amortiguadora FACS (0,5% BSA, 0,05% azida de Na en PBS). Luego se tiñeron las células con anti-CD69-FITC (BD, n.° de cat. 555530), anti-CD25-PE (BD, n.° de cat. 555432) anti-CD4-APC (BD, n.° de cat. 551980) en solución amortiguadora FACS, se lavaron con solución amortiguadora FACS y se suspendieron en 100 µg de solución amortiguadora de FACS que contiene 1 µg/ml de yoduro de propidio. Se recopilaron los datos en un citómetro de flujo FACSCalibur y se analizaron con FlowJo. Se determinó el porcentaje de activación de células T al comparar el porcentaje de la población de CD69+ y CD25+ en las células T CD4+.

Generación de variantes de anticuerpos anti-CD3

A. Clonación y secuenciación de hibridomas de reacción cruzada humano/macoco de ratón CD3εγ

Se extrajo el ARN total de células de hibridoma de ratón con el kit RNeasy (Qiagen) y se sintetizó ADNc de primera cadena con un kit SuperScript III RT (Invitrogen). Se amplificaron genes de anticuerpo con RCP de polimerasa Taq con corrección de errores con una mezcla de cebadores 5' degenerados y cebadores 3' Cγ□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□Se purificaron los productos RCP y se obtuvieron las regiones variables de los anticuerpos de cadenas ligeras y pesadas mediante la secuenciación del producto de RCP. Se digirieron las regiones variables de anticuerpo de cadenas ligeras y pesadas con enzimas de restricción adecuadas y se clonaron en los vectores de expresión pRK respectivos. Los anticuerpos murinos se expresaron en 293 células.

B. Humanización

Se alinearon las secuencias de hibridomas de reacción cruzada de humano/macaco CD3εγ hasta lograr el consenso humano o los dominios variables pesados o ligeros de la línea germinal más homólogos posibles (Figura 7). Se derivó una secuencia de consenso llamada mu40G5c de los dominios variables de cadena pesada o ligera de los clones de hibridona relacionados (Figura 7). Se diseñaron regiones hipervariables (HVR) en marcos humanos de selector para generar injertos de CDR humanizados (consulte, por ejemplo, las figuras 8A-8F). Variantes humanizadas se evaluaron en forma de fragmentos Fab o como IgG. Las posiciones de dominio VL 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) y las posiciones de dominio VH 26-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) se utilizaron para los injertos (Figuras 8A-8F). También se generaron variantes adicionales que incluyeron varias combinaciones de una o más posiciones de vernier de ratón y se evaluaron para

determinar la afinidad de unión (consulte, p.ej., las Figuras 9A-9F). Se incorporaron residuos de dominio de variables murinas en posiciones seleccionadas de *vernier* en una secuencia humanizada final con base en su capacidad para mejorar la afinidad de unión. La Figura 10 muestra las afinidades de unión monovalentes para los anticuerpos humanizados seleccionados para los diferentes antígenos CD3ε. La Figura 11 muestra las afinidades de unión para las variantes de afinidad del anticuerpo anti-CD3 humanizado 38E4 (38E4v1-38E4v9) y 40G5c.

C. Mapeo parátopo

Cada residuo en HVR-L3 y HVR-H3 de hu38E4 se mutó por separado a la alanina con la mutagénesis Kunkle. Además, la posición 95 en HVR-H3 también se mutó a serina, treonina o glutamato. Se expresaron la variantes con estas mutaciones puntuales como Fab en células HEK293 y se seleccionaron inicialmente con un método de cinética de ciclo único en un Biacore T100. También se aumentaron las variantes seleccionadas y se purificaron para un método convencional de cinética por multiciclo. Para la cinética de ciclo único, se inmovilizaron chips de sensor Biacore serie S CM5 con anticuerpos Fab anti-humanos (kit de captura de Fab humana, GE Healthcare). Cada Fab fue capturado de sobrenadante de cultivo y las concentraciones crecientes (que van desde 3 nM a 250 nM en tampón de IESE) de CD3εγ humano fueron inyectados secuencialmente con un caudal de 30 µl/min en un solo ciclo de análisis sin regeneración de la superficie entre las inyecciones; se adquirió una disociación de 10 min para cada ciclo. Para el ciclo múltiple de cinética convencional, se inmobilizaron CD3εγ humano, CD3εγ macaco o un 27-mer péptido sobre chip sensor Biacore serie S CM5 con el uso del kit de acoplamiento amino de Biacore. Diluciones seriadas 3 veces de cada variante Fab se inyectaron con un caudal de 30 µl/min. Cada muestra se analizó con un protocolo de Asociación de 3 minutos y disociación de 3 minutos. En ambos métodos, los chips Biacore se regeneraron mediante 10 mM glicina (pH 1.7). Se corrigió la respuesta de unión mediante sustracción en blanco y se utilizó un modelo de Languir 1:1 de colocación simultánea de k_{on} y k_{off} para el análisis de la cinética. Los efectos de estas mutaciones, resumidos en la figura 12, indican residuo de la cadena ligera R96 y residuos de cadena pesada Y97, R99 y F100b juegan un papel crítico en el enlace a CD3εγ.

D. Mapeo epítopo CD3

Se introdujeron mutaciones de la alanina en CD3ε1-27-Fc para evaluar el reconocimiento de epítopos de anticuerpos de anti-CD3ε N-terminal vinculante. Se inmovilizó cada variante de CD3ε1-27-Fc en placas Nunc Maxisorp de un día para el otro en PBS a 2 µg/ml a 4 °C. Tras bloquear las placas con leche en polvo al 2% en PBS con 0,05% de Tween 20 durante 1h, se agregó 100 µl de 3 nM anti-CD3ε a cada uno bueno y se dejó enlazar durante 1h a 25 °C. Después de 6 lavados con PBS con un 0,05% Tween 20, se detectó la unión de anticuerpos por la adición de anti-ratón IgG-HRP de anticuerpo secundario, como se muestra en la figura 13A.

CD3εγ se sub clonó en un Fagémido M13 que contiene una etiqueta de gD C-terminal seguido de un codón de parada ámbar, para que pueda aparece en fago o expresarse en una cepa no supresora de *E. coli*. Se utilizó este Fagémido CD3εγ como una plantilla para hacer las mutaciones individuales de alanina en CD3ε mediante mutagénesis Kunkel. Cada mutante de alanina CD3ε que aparece en Fago, se confirmó por secuenciación del ADN aislado de una sola colonia, crecido durante la noche en 2YT/Carb plus fago KO7 ayudante y se purificó mediante la precipitación de PEG. El efecto de la mutación de alanina en CD3εγ en la unión de anticuerpos anti-CD3 se evaluó mediante un fago ELISA. Se inmovilizó cada anticuerpo anti-CD3 en una placa maxisorp NUNC a 2 µg/ml de tampón PBS durante la noche a 4 °C. Se agregó el sobrenadante fago purificado que muestra una variante de alanina CD3εγ (1.0 OD450) a la placa y se dejó enlazar a temperatura ambiente con agites durante 1 h. Después del lavado, se detectó fago ligado con anti-M13-HRP (GE Healthcare cat. # 45-001-419). Se comparó el ligado de cada variante de alanina CD3εγ con el ligado fago CD3εγ tipo salvaje (figura 13B). También se caracterizaron las variantes de alanina que afectaron enlace con anticuerpos anti-CD3, por la evaluación de enlace como una función de la concentración de fago (Figura 13C).

Para cuantificar el impacto de las mutaciones de alanina en CD3 en la unión de anticuerpos, se expresaron mutantes de alanina de CD3 en una cepa de no supresora de *E. coli*. Las variantes CD3εγ secretadas fueron capturadas de la fracción periplásmica cruda mediante el uso del anticuerpo anti-CD3 UCHT1v9. Se inmobilizó a UCHT1v9 en un chip serie S CM5 a través del acoplamiento de amina mediante el uso del kit de captura del anticuerpo anti-humano IgG (Fc) (BR-1008-39) de GE Healthcare. Se realizaron mediciones SPR en el instrumento Biacore 4000, mediante el software de evaluación cinética. Para medir las afinidades vinculantes monovalentes, se utilizaron anticuerpos anti-CD3 biespecíficos, en los cuales un brazo era el anti-CD3 a ser probado y el brazo reconoció un antígeno irrelevante. Los anticuerpos anti-CD3 biespecíficos se transmitieron por el sobrenadante capturado en una serie de concentración de diluciones dobles de 0,39 a 100 nM. La cinética resultante (figura 13D) se midió y calculó con el software de Biacore 4000 BIAevaluation (código de producto 28-9664-57).

E. Mapeo estructural del lugar de unión de CD3ε

1. Hu38E4.v1 Fab

Se mezcló Hu38E4.v1 Fab, disuelto en NaCl 0,15 M, 25 mM tris, pH 7,5 a 10 mg/ml y un doble exceso molar (1 mg) de péptido CD3ε, QDGNEEMGGITQTPYK (N.° de ID de SEC.: 284) (Figura 14A) y se sometió a ensayos de cristalización. Se realizó la proyección inicial con una matriz rala de precipitados en formato de difusión de vapor por gota sentada. Los cristales optimizados se desarrollaron en una mezcla 1:1 con una solución de depósito con 70% de v/v de metilpentano, y 0,1 m de tampón HEPES a un pH de 7,5. El depósito se utilizó como crioprotector. Los cristales se transferirieron a temperatura criogénica por inmersión súbita en nitrógeno líquido.

Los datos de difracción de co-cristales péptidos hu38E4.v1 y CD3ε se recopilaron en

línea de haz del Advanced Photon Source hu38E4, con un detector CCD v1. Luego, se integraron las defracciones registradas pueden y se ampliaron con el uso del programa HKL2000.

La estructura se escalonó mediante el método de reemplazo molecular (MR) utilizando el programa Phaser. El modelo de búsqueda de MR fue una sub-unidad Fab derivada de una estructura cristalina del complejo HGFA/Fab (código PDB: 2R0L). El péptido de complejo CD3ε se desarrolló en la estructura basada en un mapa Fo-Fc. Como consecuencia, la estructura se refinó con los programas REFMAC5 y PHENIX, implementando las funciones objetivo de probabilidad, el método de refinamiento de factor-B individual anisotrópico y el método de refinamiento TLS, para lograr la convergencia. Las estadísticas de datos y el refinamiento se muestran en la tabla 3A.

TABLA 3A. Recopilación de datos y estadísticas de refinamiento para el complejo hu38E4.v1/CD3ε

Grupo de espacio	P3221
Células unitarias	a=73,2Å, b=73,2Å,c=183,7Å α=90° β=120° γ=90°
Resolución	50,0 - 1,95 Å
Cantidad total de reflejos	42632 (4188)[1]
Integridad (%)	100 (100)
Redundancia	19,7 (8,3)
I/σ	7,1 (3,0)
Rsym[2]	0,112 (0,812)
Rango de resolución	50 - 1,95 Å
Rcryst[3] / Rfree[4]	0,152/0,185
Atomos que no son de hidrógeno	3960
Moléculas de agua	446
Promedio B, General	21,97
Promedio B, Proteína	20,63
Promedio B, Agua	32,27
longitudes de enlace r.m.s.d.	0,009 Å
ángulos r.m.s.d.	1,258°

[1]Los valores entre paréntesis son para la cubierta con resolución más alta, que es 2,02 Å–1,95 Å.

[2]Rsym = $\Sigma|I_{hi} - I_h|/ \Sigma I_{hi,}$ donde I_{hi} es la intensidad aumentada de la observación relacionada con la simetría *i*th del reflejo *h e* I_h es el valor medio.

[3]Rcryst = $\Sigma_h|F_{o,h} - F_{c,h}| / \Sigma_h F_{o,h}$, donde $F_{o,h}$ y $F_{c,h}$ son las amplitudes de factor estructural observadas y calculadas para el reflejo *h*.

[4]El valor de R_{libre} se calcula para el 5% de las reflexiones escogidas de forma aleatoria en el perfeccionamiento.

La estructura cristalina del complejo péptido Fab/CD3ε hu38E4.v1 se determinó a una resolución del 1.9Å. La estructura reveló que el péptido CD3ε hace un pequeño giro y se inserta profundamente en la hendidura entre las cadenas pesadas y ligeras de Fab 38E4.v1 (figuras 14B y 14C). La unión entierra 666 Å2 del área de superficie accesible de solvente entre el péptido y el fragmento Fab y consiste en una intrincada red de enlace interacciones iónicas, hidrofóbicas y de hidrógeno (Figura 14D). El anillo de piroglutamato (pyroglu) N-terminal se empaca contra la cadena pesada Tyr33 y hace un enlace de hidrógeno con la cadena pesada His35 en RHV-H1. La cadena lateral abultada del residuo F100b en HVR-H3 empuja a His35 en una orientación adecuada para su interacción con pyroglu y explica la pérdida de enlace observada cuando F100b muta a alanina, un residuo de la cadena lateral pequeño. Además, en consonancia con los resultados del análisis de alanina, el R96 en CDR-L3 hace una unión hidrógena crítica con el grupo carboxilo en el pyroglu, mientras que Y97 en CDR-H3 hace una unión hidrógena con el Met7 del péptido CD3ε (figura 14E). Curiosamente, mientras que la substitución de alanina en R99 en CDR-H3 tiene un impacto dramático en la unión del antígeno, la estructura revela que esta cadena apunta fuera del péptido CD3ε y no se involucra en las interacciones con el péptido. En cambio, R99 hace amplios contactos con varios residuos en CDR-H3, entre ellos un enlace de hidrógeno con D101 y un empaque hidrofóbico contra Y100a que también impacta en el residuo vernier, Y49 LC (figura 14F). Estas interacciones son, probablemente, importantes para el apoyo y la disposición general de los bucles CDR en el 38E4.v1 Fab organizando la crítica hendidura central entre las cadenas pesadas y ligeras para permitir el enlace de péptido CD3ε.

La Figura 14G identifica todos los residuos de la 38E4.v1 Fab que estaban decididos a residir dentro de 5 Å desde el péptido CD3ε. Estos residuos de contacto antígeno son idénticos entre hu38E4.v1 y hu40G5c, con la excepción que ese residuo G96 de hu38E4.v1 es un residuo de serina (S96) en hu40G5 (ver figura 14 H, que representa la ubicación del residuo de contacto G96 de hu38E4.v1).

Los contactos entre anti-CD3 (38E4.v1) y el péptido $CD3_{\varepsilon\gamma}$ se calculan con base en el análisis de alanina. Los epítopos reconocidos por el 38E4v1 anti-CD3 son contactos con una distancia de 3,5 Angstroms o menos, como en la siguiente tabla 3B. De este análisis, se descubrió que los epítopos CD3 Gln1 (PCA1, ácido piroglutámica), Asp2, Glu6 y Met7 son un contacto importante que forman residuos con la paratopes de la cadena ligera y las regiones variables de la cadena pesada del anticuerpo CD3.

TABLA 3B. Contactos de CD3 para el complejo hu38E4.v1/CD3ε

Cadena de anticuerpos	**Residuos**	**Nombre del átomo**	**Átomo**	**Péptido CD3**	**Residuos**	**Nombre del átomo**	**Átomo**	**Distancia**
/L/	96(ARG)	NH2	N	**/A/**	**1(PCA)**	**O**	**O**	2,76
/H/	35(HIS)	NE2	N	/A/	1(PCA)	OE	O	2,85*
/L/	96(ARG)	NH1	N	**/A/**	**1(PCA)**	**O**	**O**	2,9
/L/	96(ARG)	CZ	C	/A/	1(PCA)	O	O	3,24
/H/	33(TYR)	CG	C	/A/	1(PCA)	OE	O	3,27
/L/	96(ARG)	NH2	N	/A/	1(PCA)	OE	O	3,28
/H/	100(TYR)	CD1	C	/A/	1(PCA)	O	O	3,33
/H/	33(TYR)	CB	C	/A/	1(PCA)	OE	O	3,34
/L/	96(ARG)	NH2	N	/A/	1(PCA)	CD	C	3,35
/H/	33(TYR)	CD2	C	/A/	1(PCA)	OE	O	3,44
/H/	50(TRP)	CH2	C	/A/	1(PCA)	N	N	3,45
/H/	33(TYR)	CD2	C	/A/	1(PCA)	CD	C	3,47
/H/	50(TRP)	CZ3	C	/A/	1(PCA)	N	N	3,48
/L/	**94(LEU)**	**N**	**N**	/A/	2(ASP)	OD1	O	2,71
/H/	50(TRP)	CH2	C	/A/	2(ASP)	OD1	O	3,23
/L/	92(PHE)	O	O	/A/	2(ASP)	CB	C	3,44
/H/	100(TYR)	CE1	C	/A/	2(ASP)	O	O	3,48

/L/	**91(SER)**	**O**	**O**	**/A/**	**3(GLY)**	**N**	**N**	2,88
/L/	27(ASN)d	ND2	N	**/A/**	**3(GLY)**	**O**	**O**	2,96
/L/	**92(PHE)**	**O**	**O**	**/A/**	**3(GLY)**	**N**	**N**	3,22
/L/	32(TYR)	OH	O	/A/	3(GLY)	O	O	3,3
/L/	32(TYR)	CZ	C	/A/	3(GLY)	O	O	3,42
/L/	32(TYR)	CE2	C	/A/	3(GLY)	O	O	3,42
/L/	91(SER)	O	O	/A/	3(GLY)	CA	C	3,49
/L/	**92(PHE)**	**O**	**O**	**/A/**	**4(ASN)**	**N**	**N**	2,81
/L/	27(ARG)f	NH1	N	**/A/**	**4(ASN)**	**O**	**O**	3,06
/L/	92(PHE)	O	O	/A/	4(ASN)	CB	C	3,11
/L/	92(PHE)	CZ	C	/A/	4(ASN)	OD1	O	3,43
/L/	32(TYR)	OH	O	/A/	6(GLU)	OE1	O	2,58*
/L/	30(LYS)	NZ	N	/A/	6(GLU)	OE2	O	2,74*
/L/	27(ARG)f	NH1	N	**/A/**	**6(GLU)**	**O**	**O**	2,77
/L/	27(ASN)d	ND2	N	**/A/**	**6(GLU)**	**O**	**O**	3,04
/L/	30(LYS)	NZ	N	/A/	6(GLU)	OE1	O	3,2
/L/	30(LYS)	CD	C	/A/	6(GLU)	OE1	O	3,35
/L/	30(LYS)	NZ	N	/A/	6(GLU)	CD	C	3,36
/H/	100(TYR)	CE2	C	/A/	6(GLU)	OE1	O	3.4
/H/	98(SER)	CA	C	/A/	6(GLU)	OE2	O	3,42
/H/	100(TYR)	OH	O	/A/	6(GLU)	CB	C	3,44
/L/	32(TYR)	CZ	C	/A/	6(GLU)	OE1	O	3,47
/H/	97(TYR)	OH	O	**/A/**	**7(MET)**	**N**	**N**	2,87
/L/	27(ARG)f	NE	N	**/A/**	**7(MET)**	**O**	**O**	2,95
/H/	97(TYR)	OH	O	/A/	7(MET)	CB	C	3,49
/L/	27(ARG)f	CD	C	/A/	7(MET)	O	O	3,5

*Representa la vinculación de hidrógeno entre dos cadenas laterales.
Las células sombreadas grises representan los contactos de la vinculación de hidrógeno confiables.
Los contactos en negrita son enlaces del hidrógeno formados entre las cadenas laterales y la columna vertebral de la cadena principal.

2. SP34v52 Fab

SP34v52 Fab se disolvió en 0,25 M NaCl, pH de MES 25 mM 5,5 a 10 mg/mL. La proyección de cristalización inicial se realizó con una matriz rala (PEGII, Qiagen) en un formato de difusión de vapor por gota sentada. Se encontró un hit de cristalización en una gota con el depósito que contiene 0,2 M $CaCl_2$; 0,1M HEPES pH 7,5 y 30% w/v PEG 4000. Se desarrollaron cristales optimizados de una mezcla de proteína µL 2 y 2 µL de la solución de depósito que contiene 20-23% w/v PEG 3350; 0,1M, pH HEPES 7,2, 0,1 M de $CaCl_2$. Se utilizó el método de difusión de vapor por gota colgante y la caída final de cristalización se incubó a 18 °C.

Se recolectaron los datos de difracción de SP34v52 Fab en línea de haz de Stanford Synchrotron Light Source 12-2, con un detector de PILATUS. Luego, se integraron las defracciones registradas con un programa XDS y se ampliaron con el uso del programa SCALA. La estructura se escalonó mediante el método de reemplazo molecular (MR) utilizando el programa Phaser. El modelo de búsqueda de MR es una sub-unidad Fab derivada de una estructura cristalina del complejo HGFA/Fab (código PDB: 2R0L). El péptido de complejo CD3ε se desarrolló en la estructura con base en un mapa Fo-Fc. Como consecuencia, la estructura se refinó con los programas REFMAC5 y PHENIX, implementando las funciones objetivo de probabilidad, el método de refinamiento de factor-B individual anisotrópico y el método de refinamiento TLS, para lograr la convergencia. Las estadísticas de datos y el refinamiento se muestran en la tabla 4.

TABLA 4. Recopilación de datos y estadísticas de refinamiento para SP34v52

Grupo de espacio	P622
Células unitarias	a=b=146.3Å, c=80.1Å α=90° β=90° γ=120°
Resolución	50,0 - 2,50 Å
Cantidad total de reflejos	18004 (170)[1]
Integridad (%)	100 (100)
Redundancia	19,3 (19,7)
I/σ	24,0 (3,6)
Rsym[2]	0,127 (0,896)
Rango de resolución	50 - 2,50 Å
Rcryst[3] / Rfree[4]	0,152/0,185
Atomos que no son de hidrógeno	3451
Moléculas de agua	123

Promedio B, General	29,59
Promedio B, Proteína	29,81
Promedio B, Agua	22,47
longitudes de enlace r.m.s.d.	0,007 Å
ángulos r.m.s.d.	1,163°

[1]Los valores entre paréntesis son para la cubierta con resolución más alta, que es 2,51 Å–2,50 Å.

[2]Rsym = $\Sigma|I_{hi} - I_h|/ \Sigma I_{hi,}$ donde I_{hi} es la intensidad aumentada de la observación relacionada con la simetría *i*th del reflejo *h e* I_h es el valor medio.

[3]Rcryst = $\Sigma_h|F_{o,h} - F_{c,h}| / \Sigma_h F_{o,h}$, donde $F_{o,h}$ y $F_{c,h}$ son las amplitudes de factor estructural observadas y calculadas para el reflejo *h*.

[4]El valor de R_{libre} se calcula para las reflexiones de 5% escogidas de forma aleatoria no incluidas en el refinamiento.

En las figuras 14I-14L, las estructuras de cristal de los Fabs hu38E4.v1 y SP34v52 se comparan en la misma orientación. Cuando el péptido CD3ε fue superpuesto en el Fab SP34v52 con la misma orientación que en el hu38E4.v1, se observaron choques evidentes del péptido con SP34v52 (Figura 14L). Los residuos HVR-H2, R50 y R52 de SP34v52, que no estaban presentes en hu38E4.v1 ni en hu40G5c, se hallaron importantes para la unión de CD3 por SP34v52 (Figura 14L). Estos datos demuestran que hu38E4.v1 y hu40G5c se unen con CD3 de una forma distinta que SP34v52.

La estructura de cristal de hu38E4.v1 en el complejo con el péptido N-terminal de CD3Εγ se encuentra ilustrada en las Figuras 14M y 14N. La Figura 14M proporciona una vista ampliada de las interacciones intermoleculares clave involucradas en el contacto del sexto residuo en $CD3_{\varepsilon\gamma}$. Con una vista alejada, la Figura 14N muestra un modelo de llenado de espacio del complejo del péptido Fab/CD3, donde el quinto residuo está apuntando por completo hacia afuera del sitio de interacción. El sexto residuo, como se muestra, está involucrado en las interacciones con Fab y los puntos dentro del sitio activo.

Ejemplo 2. Generación y selección de Anticuerpos biespecíficos dependientes de células T (TBD)

Un método para emplear el alto potencial citotóxico de las células T para erradicar las células tumorales ha sido el uso de los anticuerpos biespecíficos dependientes de linfocitos T (TBD). Se han informado respuestas clínicas alentadoras con moléculas como blinatumomab dirigidas a células B, el anticuerpo BiTE CD19/CD3-biespecífico. Sin embargo, la promesa clínica de muchas modalidades de anticuerpos biespecíficos informadas ha sido limitada por las responsabilidades, que incluyen farmacocinética desfavorable, toxicidad y/o problemas de producción. En consecuencia, inicialmente, hemos generado y caracterizado anticuerpos TBD anti-CD3 con combinaciones variadas de los grupos de antígeno antitumoral y anti-CD3 (p. ej., anti-CD20, anti-FcRH5, anti-HER2, anti-LYPD1, anti-LY6E, anti-LY6G6D, anti-PMEL17, anti-CD19, anti-CD22, anti-CD33, anti-CD79A, anti-CD79B, anti-EDAR, anti-GFRA1, anti-MRP4, anti-RET, anti-Steap1, anti-TenB2), producidos como anticuerpos de cuerpo entero en el formato de botón en el ojal (knob-into-hole). Inesperadamente, observamos que ciertas combinaciones (pares) particulares de grupos de antígeno antitumoral y anti-CD3 resultaron en TDB que presentan una actividad favorable en relación con los otros TDB.

Los anticuerpos TBD se produjeron como anticuerpos de longitud completa en el formato de botón en ojal (knob-into-hole) como IgG1 humana, como se describió previamente (Atwell y otros. *J. Mol. Biol.* 270: 26-35, 1997). La mitad de los anticuerpos se expresaron en *E. coli* o en células de ovarios de hámster chino (CHO), purificados por cromatografía de afinidad de proteínas A, y los pares adecuados de anticuerpos medios se hibridaron *in vitro* como se describió anteriormente (Spiess y otros. *Nat. Biotechnol.* 2013). Si la producción de anticuerpos TDB se llevó a cabo en células CHO, el anticuerpo puede incluir una mutación de glicosilación, por ejemplo, en el residuo N297 (p. ej., N297G), de manera tal que el anticuerpo TDB era una variante sin efector e incapaz de iniciar citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC). La Figura 15 muestra una visión general esquemática de la producción de TDB CD3/CD20.

Luego de la hibridación, los TBD CD3/CD20 se purificaron mediante cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) y se caracterizaron por filtración analítica en gel, espectrometría de masas y electroforesis en gel de poliacrilamida. Los anticuerpos

purificados funcionan como un pico único (>99% de la señal) en la filtración en gel con menos del 0,2% de agregados. No se detectaron homodímeros por medio de la espectometría. Los grupos anti-CD20 analizados en la generación de TDB CD3/CD20 incluyeron 2H7v16, 2H7v114, 2H7v511, y GA101. Los grupos anti-CD3 analizados en la generación de TDB CD3/CD20 incluyeron UCHT1v1, UCHT1v9, UCHT1vM1, 72H6, 13A3, 30A1, 41D9a, SP34v52, 40G5c, 38E4v1-38E4v9, 21B2, 125A1 y 21A9. Los TDB CD3/CD20 se analizaron en relación con la unión con CD3, así como con la actividad, según lo evaluado por los ensayos de destrucción de células B *in vitro* y ensayos de activación de células T.

A. Afinidad de unión

Las afinidades de unión para cada uno de los TDB CD3/CD20 se examinaron por medio de análisis FACS o Biacore, como se describió anteriormente para los anticuerpos anti-CD3. En resumen, para los ensayos de unión de Biacore, se inmobilizó CD3εγ humano en el chip sensor Biacore CM5 Serie S, utilizando el kit de acoplamiento de amino de Biacore y los TDB CD3/CD20 o variantes de Fab presentes estaban en el flujo. Para los ensayos de unión de FACS, se incubaron células Bjab (para antígenos de células B) o células Jurkat (para antígenos CD3) con varias concentraciones de anticuerpos TDB a 4 °C durante 30 minutos. Luego, las células fueron enjuagadas e incubadas con el segundo anticuerpo (anti-huIgG-PE; BD Bioscience) durante otros 15 minutos, antes de ser enjuagadas nuevamente y preparadas para el análisis de FACS. La figura 16 muestra los resultados de ensayos de unión de FACS *in vitro* de los TDB CD3/CD20. Los resultados demuestran que las combinaciones particulares del grupo de anticuerpo anti-CD3 y el grupo del antígeno antitumoral (p. ej., grupo anti-CD20) resultan en anticuerpos TDB con propiedades de unión más favorables. La figura 17 muestra las afinidades de unión monovalentes y bivalentes para estos TDB CD3/CD20 particulares. La combinación particular de 2H7v16 con los grupos anti-CD3 (p.ej., UCHT1v9), por ejemplo, resultó en un TDB CD3/CD20 que mostró una unión sorprendentemente fuerte con las células Bjab y Jurkat en comparación con otros TDB CD3/CD20 analizados con diferentes grupos anti-CD20. La afinidad de unión de otros TDB CD3/CD20 con un grupo anti-CD20 2H7v16 y varios grupos anti-CD3 también fueron analizados (observe las Figuras 18-24).

B. Ensayos in vitro de activación de células T y eliminación de células B.

Los TDB CD3/CD20 generados también se analizaron para determinar su capacidad para soportar la eliminación de células B y la activación del efecto citotóxico de las células T. En estos ensayos, se obtuvieron líneas de células tumorales B (Bjab) a partir de ATCC y se aislaron las PBMC de la sangre completa de los donantes sanos por medio de separación Ficoll. De se necesario, se separaban las células CD8+T y CD4+T con los kits Miltenyi, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células fueron cultivadas en RPMI1640 complementado con 10% FBS (Sigma-Aldrich) a 37 °C en un incubador de cultivos celulares humidificado estándar. Para los ensayos de eliminación de células Bjab,

20.000 células Bjab fueron incubadas con células efectoras ya sea como huPBMCs o células T purificadas, en relaciones indicadas por el ensayo, en presencia de varias concentraciones de anticuerpos TDB durante un período de tiempo indicado por el ensayo. Para los ensayos de eliminación de células B endógenas, se incubaron 200.000 huPBMCs con varias concentraciones de anticuerpos TDB durante la cantidad de horas indicada en el ensayo. Al final de cada ensayo, las células B vivas fueron separadas como células PI-CD19+ o PI-CD20+ B por medio de FACS, se obtuvo un recuento de células absoluto, con perlas FITC agregadas a la mezcla de la reacción como control de recuento interno. El porcentaje de eliminación de células se calculó con base en los controles no tratados con TDB. Las células T activadas fueron detectadas por la expresión de superficie de CD69 y CD25.

Las eficacias variadas de los anticuerpos TDB generados con biespecificidad para CD3 y una segunda molécula biológica (en esta instancia, CD20), enfatizan las contribuciones impredecibles y críticas de ambos grupos de anticuerpos en la generación de un TDB ejemplar de alta eficacia (consulte Figuras 25-49).

Ejemplo 3. Caracterización de TDB CD3/CD20 ejemplares (TDB CD20)

Caracterizamos en más detalle dos de los TDB CD3/CD20 (TDB CD20) ejemplares descritos anteriormente, que mostraron una alta eficacia en los ensayos *in vitro* de eliminación de células B y activación de células T. El grupo CD20 de cada anticuerpo TDB era el clon 2H7.v16 de anti-CD20 (observe la figura 50), mientras que el grupo CD3 era el clon UCHT1v9 (consulte, p-ej, Zhu, et ál *Int. J. Cancer*. <62> 62 319-324, 1995) o el clon 40G5c de macaco de reacción cruzada (consulte, p.ej., Figura 51), que comparte actividades comparables.

Materiales y métodos

A. Producción de anticuerpos

Los anticuerpos biespecíficos dependientes de células T (TDB) se produjeron como anticuerpos de longitud completa en el formato de botón en ojal (knob-into-hole) como IgG1 humana, como se describió previamente (Atwell y otros. *J. Mol. Biol.* 270: 26-35, 1997). La mitad de los anticuerpos se expresaron en *E. coli, y por lo tanto aglicosilados, purificados por cromatografía de afinidad de proteína A, y los pares adecuados de anticuerpos medios se hibridaron* in vitro como se describió anteriormente (Spiess et al. *Nat. Biotechnol.* 2013). Luego de la hibridación, los anticuerpos se purificaron mediante cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) y se caracterizaron por filtración analítica en gel, espectrometría de masas y electroforesis en gel de poliacrilamida. Los anticuerpos purificados funcionan como un único pico (>99% de la señal) en la filtración en gel sin agregados detectados (figura 52A) y no se detectaron homodímeros con la espectrometría de masas (figura 52B).

B. Ensayos in vitro de activación de células T y eliminación de células B.

Se obtienen líneas de células tumorales B a partir de ATCC y se aislaron las PBMC de la sangre completa de los donantes sanos por medio de separación Ficoll. Se separaban las células CD8+T y CD4+T con los kits Miltenyi, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células se cultivaban en RPMI1640 complementado con 10%FBS (Sigma-Aldrich). Para los ensayos de eliminación de células B, las células B vivas fueron separadas como células PI-CD19+ B por medio de FACS, se obtuvo un recuento de células absoluto con perlas FITC agregadas a la mezcla de la reacción como control de recuento interno. Las células T activadas fueron detectadas por la expresión de superficie de CD69 y CD25. La inducción de la granzima B intracelular fue detectada por medio de FACS. La concentración de perforina en el medio se detecta por medio de ELISA (eBioscience). Todos los anticuerpos se adquirieron en BD Bioscience.

C. Estudios de eficacia in vivo en modelos murinos

Los ratones SCID y NSG humanizados fueron adquiridos en Jackson Labs. Los ratones transgénicos con CD20 humano y los ratones transgénicos con CD3 humano fueron producidos como se describe anteriormente (Gong et ál. *J. Immunol.* 174. 817-826, 2005 y de la Here et ál. *J. Exp. Med.* 173: 7-17, 1991), y los ratónes trasgénicos dobles con CD20/CD3 humanos fueron producidos cruzando los dos ratones transgénicos simples. Los modelos de linfoma humano en ratones fueron generados inyectando 5 x 10^6células Bjab-luciferase solas o mezcladas con 10 x 10^6 PBMC de donante humano en HBSS de manera subcutánea en los flancos derechos de 40 ratones hembra. Se trató a los ratones por vía intravenosa con vehículo o TDB CD20 0,5 mg/kg una hora después de la inoculación y una semana después del tratamiento inicial. Los tumores se medían 1-2 veces por semana, y los pesos corporales dos veces por semana después de hasta 7 días a partir del tratamiento final. Si no se observaba pérdida de peso, se dejaba de medir el peso de cierto animal. Si la pérdida de peso era de más del 15% del peso total del cuerpo, los ratones afectados se pesaban a diario, y si excedía el 20%, se sacrificaban (o se dejaban a cargo del personal veterinario). Las observaciones clínicas se realizaron dos veces por semana a lo largo de todo el estudio, para monitorear la salud de los animales, y se sacrificaron todos los animales con tumores de un tamaño o condición que pudiera interferir con la salud o la actividad del mismo. De lo contrario, los animales se sacrificaban 6 meses después del tratamiento inicial o en caso de ulceración del tumor o si el volumen de este excedía 2500 mm^3.

Los modelos de ratones con leucemia linfocítica crónica (CLL) derivada de pacientes se generaron según la descripción anterior (Bagnara et ál. *Blood.* 117 5463-5472, 2011). En resumen, las 5 x 10^5 células T activadas fueron purificadas de PBMC de CLL e inyectadas de manera retro-orbital en los ratones NSG. Después del injerto de la célula T, 2 x 10^7 PBMC CLL se inyectaron de manera retro-orbital. Después de 14 días, la circulación de las células B y T trasplantadas fue confirmada por el análisis FACS. Los animales implantados exitosamente fueron tratados posteriormente, 3,5 semanas después, con

anticuerpos TDB administrados por vía intravenosa, inyectados en la vena de la cola. Los animales fueron sacrificados 6 o 14 días después del tratamiento. Se extrajo la sangre completa por punción del seno retro-orbital utilizando pipetas heparinizadas, y fue trasferida de inmediato a tubos heparinizados, mientras los animales estaban anestesiados, o por punción cardíaca terminal, con una jeringa heparinizada, después de la eutanasia con CO2. Después de la eutanasia con CO2, se recolectaron los bazos. Para todos los estudios, se realizaron observaciones clínicas dos veces por semana para supervisar la salud de los animales. Se medía el peso corporal de los animales al menos una vez por semana. Se aislaron las PBMC después de la lisis celular de glóbulos rojos, y se analizaron por medio de FACS para células B (muCD45+CD19+) y células T (muCD90.2+CD4+, o muCD90.2+CD8+). Todos los anticuerpos utilizados son adquiridos en BD Biosciences o eBiosciences.

D. Estudio PKPD en monos cynomolgus

Todos los estudios en monos cynomolgus se realizaron utilizando monos cynomolgus criados con esa finalidad, no tratados previamente, de origen chino. Para el estudio de PKPD de dosis única, se administró a 3 monos cynomolgus machos una dosis única en bolo lento IV de 1mg/kg de TDB CD20; para la repetición del estudio de dosis, se administró a 4 monos cynomolgus una dosis en bolo lento IV de 1mg/kg de TDB CD20 una vez por semana, por un total de 4 dosis. Se recolectó la sangre completa o los tejidos en los momentos seleccionados para el recuento de células B y células T por medio de FACS. Se recolectó el suero y se almacenó a -70 °C hasta que se analizó por medio de ELISA para determinar la cantidad de artículo de prueba en cada muestra de suero. Se usaron los perfiles de tiempo-concentración sérica de cada animal para estimar los parámetros farmacocinéticos (PK) utilizando el software WinNonlin (Pharsight; Mountain View, CA).

TDB CD20 de alta calidad producido como un IgG de cuerpo completo, humanizado, con propiedad PK de anticuerpo convencional

Para explorar las propiedades objetivo que pueden afectar la potencia de TDB dirigido a células B, que incluyen la identidad del antígeno, tamaño del dominio extracelular y la distancia de epítopo de la membrana, creamos más de 40 TDB dirigidos a epítopes en CD3Ɛ, CD19, CD20, CD22, CD79a y CD79b diferentes. Los resultados representativos se muestran en la Figura 56I. Hallamos que los TDB más potentes fueron aquellos dirigidos a los antígenos para el cáncer con dominios extracelulares pequeños (ECD) y epítopes cercanos a la membrana de la célula objetivo. Entre los mejores objetivos, se encontraron CD20, CD79a y CD79b, con potencias de alrededor de 10 ng/ml o 67 pM para la eliminación de células B de donante normal por parte de las células T autólogas.

TDB anti-CD20/CD3 (CD20-TDB) se describe aquí como una prueba del concepto de molécula, que exhibe la actividad farmacológica de estos TDB dirigidos a células B. Los TDB CD20 fueron producidos como IgG de cuerpo completo, totalmente humanizados,

con arquitectura de anticuerpo natural de bacterias, libres de homodímeros y agregados (Figura 52). La propiedad farmacocinética (PK) de TDB CD20 en ratas, una especie no vinculante, se asemeja a la de otros anticuerpos IgG humanos, con una vida media de cerca de 7 días (Figura 53).

La eliminación de células B con TDB CD20 depende de las células T a lo largo de la vía de granzima-perforina.

Para evaluar TDB CD20 como tratamiento potencial para trastornos proliferativos de células, tales como neoplasias de células CD20 + B, primero investigamos su mecanismo de acción como un anticuerpo biespecífico identificador de células T. A diferencia de la actividad de ADCC, que es el principal mecanismo de acción del tratamiento clásico del anticuerpo monoclonal, TDB CD20 no requiere la región Fc para su actividad. La porción F(ab')2 de TDB CD20 retuvo la misma potencia que el TDB CD20 IgG de cuerpo completo en la eliminación de células B (Figura 54A). TDB CD20 es un agonista condicional, que requiere expresión de objetivo, células T y anticuerpos para la actividad. La actividad de eliminación de células B de TDB CD20 depende de las células T, dado que no se detectó eliminación de células B con PBMC agotadas de células CD3+ T (Figura 54B). Se requiere la expresión del objetivo para la activación de células T, dado que la falta de expresión de CD20 resulta en la ausencia de células T activadas (Figura 54). TDB CD20 es capaz de activar a las células CD4+ y CD8+T, como se mide por la inducción de CD69 y CD25 en las células T (Figura 54D). Se puede lograr una eliminación de células B comparable con células T como efectores, mientras que las células CD8+T parecen más potentes en la eliminación de células BJAB, dado que las células CD8+T resultaron en un mayor rango de eliminación celular que la misma cantidad de células CD4+T (Figura 54C). Sin embargo, la sobreregulación de granzima es más frecuente dentro de las células CD8+T (Figura 54E), así como se detectaron niveles más altos de liberación de perforina y granzimas A y B (no mostradas) asociada con las células CD8+T en el medio, por medio de ELISA (Figura 54F). Las células T activadas son capaces de proliferación (Figura 55). El recuento general de células T, sin embargo, no aumentó de manera significativa después de 24 horas en presencia de TDB CD20 y de células B sin suplemento de citoquinas *in vitro*, probablemente debido a las condiciones del cultivo. De hecho, se observó una expansión robusta de células B *in vivo* en los estudios de eficacia con modelos murinos y en monos cynomolgus (Figuras 58A y 67C).

Potencia de TDB CD20 para la eliminación de las células B de leucemia/linfoma y de las células B autólogas *in vitro*

También se analizó la potencia de TDB CD20 para la eliminación de células B con más de una docena de líneas de células B de leucemia/linfoma *in vitro*. Para evaluar la potencia de CD20-TDB, se seleccionaron 8 líneas que representaran las células con un amplio rango de nivel de expresión de CD20 (Figura 56B). Las curvas de dosis-respuesta de eliminación de células B se muestran con las 8 líneas celulares, con PBMC aisladas, de

donante sano, como células efectoras (figura 56A). Significativamente, CD20-TDB no ha presentado actividad contra las células SU-DHL1, desprovistas de expresión de CD20. La potencia de CD20-TDB se correlacionó con los varios niveles de superficie CD20 detectados mediante la citometría de flujo (56A).. No obstante, TDB CD20 resulta potente en la eliminación de las 8 líneas, de forma dependiente de dosis, con EC50 que oscila entre 0,38 y 11 ng/ml para el ensayo de 24 horas. El alcance de eliminación celular varía entre 60% y 90% con hasta 1000 ng/ml de TDB en un ensayo de 24 horas (Figura 56C). En general, la eliminación completa de células B se logra con una mayor concentración del anticuerpo o un tiempo de ensayo prolongado. Las células SU-DHL-1 se incluyen en el ensayo de eliminación como control negativo de CD20, donde no se observa eliminación celular, lo que demuestra la necesidad de la expresión de objetivo para la actividad de TDB CD20. La actividad de TDB CD20 parece necesitar un nivel muy bajo de expresión de objetivo, como las células Nalm-6 y SC-1 que se muestran aquí tienen muy baja expresión de superficie de CD20 (Figura 56B). La afinidad de unión monovalente de TDB CD20 para CD20 es más débil que la afinidad de unión bivalente del anti-CD20 parental, con un K_D de 54 nM, determinado por Scatchard. Tomados en conjunto, el valor KD y la potencia de eliminación de células B de TDB CD20, la ocupación de receptores necesaria para la actividad de TDB CD20 es solamente menor que 0,1%. Los TDB generados para atacar diferentes antígenos de células B, también son efectivos en la mediación de la eliminación de células B, como se muestra en la figura 56D, donde los TDB dirigidos a 5 antígenos de células B diferentes, entra ellos, un TDB CD20 (TDB A: 2H7v16/UCHT1v9), eliminaron el 75% a 90% de las células B. El TDB CD20 también puede mediar en la eliminación de líneas de linfoma B adicionales con expresión del antígeno de superficie CD20 variable (figura 56E).

El TDB CD20 también resulta muy potente en la eliminación de células B autógenas, comprobado con PBMC humanas aisladas de la sangre periférica, de donantes sanos (figura 56F). En la figura 56F se muestran las curvas de dosis-respuesta de eliminación para 8 donantes aleatorios, así como un resumen de EC50 y el alcance de eliminación de células B (figura 56G) con 1000 ng/ml de anticuerpo en un ensayo de 24 horas, en 30 donantes. De las 30 muestras analizadas, del 57% al 96% de las células B fueron eliminadas con hasta 1000 ng/ml de anticuerpo en el plazo de 24 horas, con EC50 oscilando entre 0,43 y 135 ng/ml, con un valor promedio de menos de 3 ng/ml. El grado de eliminación de células B en el plazo de 24 horas por TDB CD20 es altamente comparable, o aún mayor, que la eliminación de células B por un scFv anti-CD3/anti-CD19 (Figura 56H).

El TDB CD20 resulta potente en provocar el agotamiento de células B *in vivo* en los modelos murinos.

Dado que nuestro TDB CD20 analizado no reconoce los antígenos murinos CD20 y CD3, utilizamos los ratones transgénicos con CD20 humano y CD3 humano (descritos anteriormente) para producir ratones transgénicos dobles con CD3/CD20 humanos para

estudios de eficacia *in vivo* subsiguientes. Como se muestra en la Figura 57A, los ratones transgénicos dobles con CD3/CD20 humanos expresan huCD3$_\varepsilon$ en la superficie de las células CD4+ y CD8+ T, además de huCD20 en la superficie de las células CD19+ B, en niveles detectables, en comparación con las células B y T derivadas humanas. Con ratones transgénicos con CD20 humano, solamente rituximab es capaz provocar el agotamiento de las células B, dado que TDB CD20 no puede captar células T murinas sin expresión de CD3 humano (figura 57B). Mientras que con los ratones transgénicos dobles con CD3/CD20 humanos, TDB CD20 es capaz de captar células T murinas que expresan huCD3 y además resulta potente para provocar el agotamiento de células B murinas que expresan huCD20 (figura 57C). El TDB CD20 parece ser más potente para provocar el agotamiento de las células B *in vivo*, dado que se detectan menos células B en los bazos de ratón 7 días después de una dosis única IV de TDB CD20 de 0,5 mg/kg que después de la administración de una dosis única de rituximab de 10 mg/kg. Aquí se usó como un control del isotipo un TDB HER2, que tiene el mismo grupo de CD3 mientras que con el otro grupo se une a HER2, y no mostró actividad alguna en la disminución celular.

Para explorar la menor dosis eficaz con la cual el TDB CD20 puede agotar las células B en ratones transgénicos dobles con CD3/CD20 de origen humano, los ratones fueron tratados con una dosis única de TDB CD20 que comenzó en 0,5 mg/kg y terminó en 0,00005 mg/kg. Luego, se monitoreó el recuento de células B en la sangre en el D1 (24 horas después de la dosis), el D8 y el D15. Se observó una disminución en el recuento de células B en el D1, y el agotamiento de las células B continuó hasta el D15 luego del tratamiento con TDB CD20 (Figura 58A). De manera coherente con esta observación en el recuento de células B en la sangre, se logró el agotamiento casi completo de las células B en el bazo de ratones en el D7 tras una dosis única de 0,5 mg/kg, mientras que una dosis más baja de 0,05 mg/kg provocó el agotamiento parcial de las células B en el bazo y un nivel aproximado de dosis de ED50 (Figura 58B). Un estudio de evolución temporal realizado con los ratones transgénicos dobles reveló que el agotamiento de las células B es casi completo en el bazo tan solo 3 días después del tratamiento de dosis única de 0,5 mg/kg, sin signos de recuperación significativa de las células B hasta el D14 (Figura 58A). Como se ve en la Figura 58C, el TDB CD20 media el agotamiento de las células B en la periferia de los huCD20/huCD3 transgénicos dobles, lo cual se detecta en la sangre tan solo dos horas después del tratamiento y se mantiene durante hasta siete días después del tratamiento. Además, las células T CD8+ y CD4+ activadas son detectables en la sangre en el plazo de dos horas desde la administración del TDB CD20 y disminuyen dos días después del tratamiento (Figura 58D).

Además, el TDB CD20 agotó las células B de la zona marginal (MZB, por sus siglas en inglés) (Figura 59A y Figura 59B) tan eficientemente como las células B foliculares (FOB, por sus siglas en inglés) (Figura 59A y Figura 59C) en el bazo de ratones, luego de una sola dosis IV de 0,5 mg/kg. Observamos que las células B del bazo disminuyeron ~ 50% con respecto al valor basal hasta el día 1 (24 horas después de la dosis) y continuaron

disminuyendo hasta alcanzar el punto más bajo en el día 3, que se mantuvo durante todo el estudio. Aparentemente, esto difiere de un informe previo con rituximab, donde se piensa que el microambiente cumple una función en la eficacia de rituximab, lo cual sugiere un modo de acción para el TDB CD20 *in vivo* diferente al de rituximab. La activación de las células T murinas suele observarse a los 30 minutos de la administración del tratamiento de TDB CD20 en la sangre, y en el plazo de las primeras 24 horas en el bazo en la mayoría de los casos (Figuras 59D y 59E). Luego de la activación de las células T, se observó un incremento del recuento de las células T en los D2 a D3 aproximadamente (Figura 59D y 59E), como resultado de la proliferación celular. Para el día 2, la mayoría de las células T ya no eran positivas para CD69, aunque los niveles de células CD69+CD8+ siguieron oscilando entre el 10% y el 30% durante el resto del estudio de dos semanas. No obstante, posiblemente debido a la muerte celular inducida por la activación, los recuentos de las células T tienden a disminuir tras la fase de expansión. El recuento de células T finalmente se recuperará luego del tratamiento con TDB, lo cual sugiere que el tratamiento con TDB CD20 no tiene un efecto inhibitorio de la regeneración de las células T murinas.

También se usaron ratones NSG humanizados para continuar con la validación de la potencia del TDB CD20 para el agotamiento de las células B en modelos murinos y en el marco de una dosis repetida. Los ratones reales inscriptos en el estudio que se muestran en las Figuras 60A-60D tenían 35-80% de células CD45+ humanas en la sangre periférica, y los rangos de las células CD4+, CD8+ y CD20+ fueron 12-25, 2,1-8,7 y 32-60% respectivamente (porcentaje informado como fuera de una ventana viable de leucocitos). En la Figura 60E, se muestran ejemplos representativos de este valor inicial. Los niveles de los antígenos objetivo CD3 y CD20 de estos ratones se compararon con los de donantes humanos normales y no se halló que fueran significativamente diferentes (Figura 60F). Los ratones NSG humanizados que se muestran en la Figura 59 fueron tratados con 3 dosis semanales de TDB CD20 de 0,5 mg/kg. Las células B se agotaron en la sangre en el D7, y no se detectó casi ninguna célula B en el D21 (Figura 60A). También se observó un agotamiento sólido de las células B en el bazo de los ratones tratados con TDB en el D21 (Figura 60B). Además, el tratamiento de los ratones NSG humanizados con TDB CD20 estimuló la proliferación de las células T y condujo al agotamiento de las células B, como se muestra en la Figura 60C. El recuento de las células T CD8+ se incrementó hasta 10 veces en la sangre en el D7 y retornó al valor basal o a un valor inferior en el D14 y en el D21 (Figura 60D). Se observó una tendencia similar en las células T CD4+.

CD20 TDB es potente para eliminar las células B de la CLL *in vitro* e *in vivo*

También realizamos pruebas para determinar la potencia del TDB CD20 para eliminar las células B de la leucemia con células T autólogas de pacientes con CLL, donde la carga tumoral B suele ser alta mientras que el recuento de células T es bajo y la función de las células T podría estar potencialmente deprimida (Riches et al. *Semin. Cancer Biol.* 20(6):

431-438, 2010). Las PBMC aisladas de la sangre periférica de nueve pacientes con CLL fueron incubadas con una sola dosis elevada de 1000 ng/mL de TDB CD20 durante hasta 48 horas. Como se muestra en la Figura 61A, TDB CD20 es potente en la eliminación de las células B de la CLL con células T autólogas. Para las 2 muestras que se ven, la carga tumoral de la leucemia de células B es del 70% con el 8,4% de las células T CD8+ en las PBMC para la muestra de paciente n.º 1, y del 80% con el 4,4% de las células T CD8+ para la muestra de paciente n.º 2. TDB CD20 aparentemente puede lograr una eliminación eficiente de células B con relaciones efector/objetivo muy bajas (1:8 y 1:18 con las 2 muestras que se ven aquí). La eliminación de las células B de la CLL con células T autólogas que produce TDB CD20 tiene una alta correlación con el recuento de células T CD8+ (Figura 61B). Descubrimos que el contenido de las células T variaba de manera significativa (entre el 0,4% y el 8% de las células mononucleares), y cabe destacar que observamos que el alcance de la citólisis de las células B en comparación con los valores previos al tratamiento se correlacionaba en gran medida con el contenido de las células T. Al suplementar con las células T CD8+ purificadas a las PBMC de la CLL, donde hay muy pocas células T análogas disponibles, las células B de la leucemia fueron eliminadas eficientemente por TDB CD20 de una forma dependiente de las células T (Figura 61C).

TDB CD20 también es potente para provocar el agotamiento de las células de leucemia CLL injertadas en ratones (Figura 62A). En resumen, se injertaron células de leucemia de pacientes a los ratones NSG luego de injertar células T autólogas activas obtenidas de los pacientes y el tratamiento se inició luego de confirmar que el injerto de leucemia se había establecido. La tinción de IHC de ejemplos representativos de bazos de ratones mostró el injerto exitoso de las células B de leucemia y de células T autólogas de pacientes con CLL en ratones NSG. Luego de una dosis única de 0,1 o 0,5 mg/kg del tratamiento con TDB CD20, se pudieron detectar pocas células B. El agotamiento de las células B también se observó con el tratamiento de rituximab, mientras que no se detectó agotamiento alguno de las células B con el TDB HER2 como control del isotipo. (Figura 62B).

En el contexto de la progresión del tumor, el tratamiento con TDB CD20 es efectivo para prevenir el crecimiento de tumores tipo linfoma de células B en presencia de un donante humano de PBMC. Los ratones SCID (inmunodeficiencia severa combinada) con trasplantes de células Bjab humanas desarrollaron tumores detectables cuando fueron tratados con el vehículo o con TDB CD20 solo para el día 12 luego de la inoculación. Además, el trasplante solo de las PBMC demoró la excrecencia de tumores, aunque estos ratones desarrollaron tumores detectables para el día 25 luego de la inoculación. Por lo tanto, TDB CD20 también es efectivo para prevenir el crecimiento de tumores *in vivo* en presencia de células efectoras PBMC (Figura 63).

La potencia de TDB CD20 requiere un muy bajo nivel de expresión de CD20.

Además del requisito diferente para la región de anticuerpo Fc para la actividad de TDB CD20 comparada con un anti-CD20 convencional, y de la posible dependencia del

microambiente del tumor, TDB CD20 también parece requerir un menor nivel de antígeno para la eliminación eficiente de las células B. Para las células Bjab, que tienen un alto nivel de expresión de CD20 (Figura 64A), se logró una eliminación de células comparable con rituximab y TDB CD20 (Figura 64B). Sin embargo, las células Nalm-6, SC-1 y OCI-Ly19, que tienen un nivel de expresión de CD20 mucho más reducido (Figura 64A) solamente fueron eliminadas con TDB CD20 mientras que no se detectó eliminación de estas células con rituximab (Figura 64C). El número estimado de copias de CD20 para estas líneas celulares bajas de CD20 es menor que 500, en base a los datos de scatchard y de la unión de FACS en comparación con las células BJAB (no se muestran los datos). Además, la afinidad de unión monovalente de TDB CD20 para CD20 es ~50-100 nM, significativamente menor que la afinidad de 1-5 nM de rituximab (ambas medidas con scatchard). En conjunto, la potencia de CD20-TDB es coherente con la noción de que la activación de TCR solamente requiere una ocupación de receptores baja de 10-100 moléculas (Purbhoo, M.A., et al. *Nat Immunol* 5:524-530, 2004; Irvine, D.J.,et al. *Nature* 419:845-849, 2002; Sykulev, Y., et al. *Immunity* 4:565-571, 1996).

TDB CD20 es activo en presencia de rituximab y esteroides

Como rituximab y su combinación con la quimioterapia se utilizan ampliamente para tratar neoplasias de células B en la práctica clínica, es importante explorar cómo se puede utilizar TDB CD20 en este contexto, dado que tanto TDB CD20 como rituximab se enfocan en el mismo antígeno. Aprovechamos al rituximab-DANA, una variante no efectora de rituximab (rituximab con sustituciones de los residuos 265 y 297 a la alanina (mutaciones DANA descritas en las patentes de EE. UU. n.º 7,332,581 y 8,219,149)), la cual solamente se une a CD20 sin actividad de eliminación de células B, según las pruebas realizadas en ratones transgénicos dobles con CD20/CD3 humanos (Figura 64D). El tratamiento previo de células B objetivo de donantes normales con esta molécula inerte de rituximab que compite con la unión de TDB CD20 tuvo un efecto extraordinariamente mínimo en la reducción de la actividad de TDB CD20. En concentraciones de hasta 250 µg/ml rituximab-DANA (5000 veces en exceso sobre el nivel del dosis EC50 de 42 ng/ml), observamos solamente pequeños cambios en las curvas de respuesta a la dosis *in vitro* (un cambio menor a 7 veces en la EC50, 42 en comparación con 320 ng/ml). Cabe destacar que TDB CD20 sigue siendo activo en este marco. Aunque la EC50 para TDB CD20 se incrementó hasta ~7 veces con la concentración más elevada de rituximab-DANA, el grado de eliminación de células B no cambió significativamente (Figura 65A). Esto es coherente con nuestros hallazgos previos, según los cuales, para la potencia de TDB CD20, se requiere un nivel muy bajo de expresión del antígeno, o una ocupación muy baja de receptores. Las observaciones *in vitro* se recapitularon *in vivo* en ratones transgénicos duales CD3/CD20 que fueron tratados previamente con 2 o 10 mg/kg de la proteína rituximab-DANA y posteriormente recibieron TDB CD20. Aquí, mostramos *in vivo* que TDB CD20 sigue provocando el agotamiento de células B en ratones tratados previamente con rituximab-DANA (Figura

66). Estos resultados indican una gran versatilidad en las combinaciones prospectivas de tratamientos para neoplasias de células B.

TDB CD20 es un anticuerpo que recluta células T, y su potencia depende de la activación de las células T. También se realizaron exploraciones para ver si el tratamiento previo con esteroides, que potencialmente podría tener un impacto en la respuesta inmune de las células T, afectaría la actividad de TDB CD20. *In vitro,* TDB CD20 seguía eliminando las células B en presencia de una alta concentración de dexametasona (Figura 65B).

Validación preclínica de TDB CD20 como tratamiento potencial para neoplasias de células B CD20+ en monos cynomolgus

También se realizó un estudio piloto PKPD para TDB CD20 en monos cynomolgus. En un estudio de dosis única, en el cual 3 animales fueron tratados una vez de forma intravenosa con 1mg/kg de TDB CD20, se observó el agotamiento completo de las células B en la sangre (Figura 67A), así como también en el bazo y en los nódulos linfáticos (Figuras 67B y 67C), 7 días después del tratamiento con el anticuerpo. Los controles históricos del vehículo se muestran como la media y la desviación estándar de 4 animales tratados con vehículo (Figura 67D). No se observó una pérdida de células aparente, ya que tanto las células T CD8+ como las células T CD4+ tenían niveles comparables o más elevados que los de los controles, cuando se calcularon como % de linfocitos. Se detectó la activación de las células T en la sangre 4 horas después de la administración de la dosis. No se detectó pérdida de células T, y se detectó un recuento de células T CD8+ aparentemente más elevado en la sangre 7 días después del tratamiento (Figura 67A).

El efecto a largo plazo del tratamiento con TDB CD20 en células inmunes también se examinó en un estudio de dosis repetida de 4 semanas seguido de un período de recuperación de 8 semanas. En la sangre de 4 animales tratados con una dosis semanal de 1mg/kg, los recuentos delas células B y T, así como también la concentración sérica de TDB CD20, se midieron y se graficaron para cada animal individual durante 77 días (Figura 68A). En los 4 animales, las células B no se detectaron en la sangre poco tiempo después del tratamiento y no regresaron mientras la concentración sérica de TDB CD20 permaneció por encima de 100 ng/ml (animal 4502 en comparación con los animales 4001, 4002 y 4503). Los recuentos de células T CD8+, así como también los de las células T CD4+ en menor medida, se incrementaron significativamente luego de la primera dosis y retornaron gradualmente al 25-150% de los valores basales. Si se consideran juntas, TDB CD20 es altamente activo en producir el agotamiento de las células B, sin comprometer a las células T.

La propiedad PK de TDB CD20 también se resumió en la Figura 68B, con las mediciones de la concentración sérica de TDB CD20 de ambos estudios. Como se mostró para el estudio de dosis repetidas, TDB CD20 mantuvo una buena exposición durante todo el estudio, con una eliminación de aproximadamente 17 ml/día/kg durante la primera dosis (D0-D7). La eliminación mediada por el objetivo parece ser más elevada durante la primera dosis (D0-D7), ya que el valor de eliminación disminuyó hasta

aproximadamente 6 ml/día/kg durante la cuarta dosis (D21-28).

Combinación de TDB CD20 con un antagonista de PD-L1 es un modelo tumoral singeneico

También se examinó la eficacia in vivo de un TDB CD20 en combinación con un antagonista de PD-L1 (un anticuerpo anti-PD-L1 isotipo IgG2a murino, 25A1, con mutaciones DANA) en un modelo tumoral singeneico. En este estudio, se utilizaron células de linfoma B A20-huCD20 de ratones que expresan el CD20 humano y un PD-L1 de ratón sobre su superficie celular para generar un modelo tumoral singeneico (consulte, p.ej., la Figura 69A). El TDB CD20 utilizado fue un isotipo IgG2a murino 2H7v16/2C11 TDB producido en formato "botón en ojal" (K&H, consulte, p.ej., Atwell et al., *J Mol Biol.*, 270:26-35, 1997), donde el grupo "botón" es anti-CD20 2H7v16 y el grupo "ojal" es anti-CD3 2C11 (Leo et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 84:1374-8, 1987). El antagonista de PD-L1 utilizado fue un isotipo IgG2a murino anti-PD-L1 con mutaciones Fc DANA (sustitución de los residuos 265 y 297 a la alanina; consulte, p.ej., las patentes de EE. UU. n.º 7,332,581 y 8,219,149).

En el Día -7, 65 ratones Balb/C fueron inoculados simultáneamente en el área torácica unilateral derecha con 2,5 millones de células A20pRK-CD20-GFP en HBSS en un volumen de 100 µl (que no debía exceder los 200 µl). Se permitió que los ratones desarrollaran tumores. Luego, los ratones fueron pesados y medidos de 1 a 2 veces por semana hasta que los tumores alcanzaron un volumen medio tumoral de aproximadamente 100 a 200 mm^3 (aproximadamente 7 días después de la inoculación). Los animales luego fueron divididos en los siguientes grupos de tratamiento: Grupo 1: 2,5 millones de A20/CD20, Vehículo, qwx3, IV, n=9; Grupo 2: 2,5 millones de A20/CD20, anti-CD20xCD3 K&H TDB (2H7v16-2C11 IgG2 murino), 0,5 mg/kg, qwx3, IV, n=9; Grupo 3: 2,5 millones de A20/CD20, aPDL1 (25A1, mIgG2a DANA), 10 mg/kg, tiwx3, IP, n=9; y Grupo 4: 2,5 millones de A20/CD20, aPDL1 (25A1, mIgG2a DANA), 10 mg/kg, tiwx3, IP + anti-CD20xCD3 K&H TDB (2H7-2C11 IgG2 murino), 0,5 mg/kg, qwx3, IV, n=9. A los ratones que no se reunieron en uno de los grupos de tratamientos mencionados debido a tumores disimilares, se les practicó la eutanasia. El tratamiento comenzó el Día 0, y todas las dosis de anticuerpos se administraron por vía intravenosa en un volumen de 100 ml como se describió más anteriormente.

Los tumores se midieron de 1 a 2 veces por semana. El peso corporal de los animales se midió dos veces por semanas hasta 7 días después del tratamiento final. Si no se observaba pérdida de peso, se dejaba de medir el peso. Si se observaba que la pérdida de peso era >15%, los ratones afectados se pesaban diariamente y se les practicaba la eutanasia si la pérdida de peso era mayor o igual al 20%. Durante todo el estudio, las observaciones clínicas se realizaron dos veces por semana para monitorear la salud de los animales, y se le practicó la eutanasia a todo animal que tuviera un tumor de un tamaño o condición que pudiera interferir con su salud o actividad.

Como se muestra en la Figura 69B, el tratamiento combinado de TDB CD20 con el

anticuerpo anti-PD-L1 (Grupo 4) exhibió un efecto sinérgico inesperado en la inhibición del crecimiento tumoral cuando se comparó con el tratamiento con TDB CD20, anticuerpo anti-PD-L1 o vehículo solos.

Combinación de TDB CD20 con un antagonista de PD-1 es un modelo tumoral singeneico

Adicionalmente, se probó también la eficacia *in vivo* de un CD20 TDB en combinación con un antagonista de PD-1 (un anticuerpo anti-PD1 con isotipo IgG2 murino, 8F11, con mutaciones DANA) en el modelo sinérgico de ratón B con linfoma A20/huCD20. En este estudio, el CD20 TDB usado fue un isotipo isotype 2H7v16/2C11 TDB IgG2a murino y el antagonista PD-1 usado fue un anticuerpo anti-PD-1 con isotipo IgG2 con mutaciones DANA Fc.

Se transfectaron células B de los ratones A20 para expresar CD20 y GFP humano y posteriormente se clasificó una única célula para determinar la selección clonal y la expansión para la implementación. Ratones Balb/c hembra (Charles River; Hollister, CA) de 8-10 semanas fueron inoculados subcuténeamente en la región torácica unilateral derecha con 2,5 millones de células A20.hCD20-GFPCuando los tumores alcanzaron un volumen medio de 100-200 mm^3, los ratones se seleccionaron y colocaron aleatoriamente en los siguientes cuatro grupos de tratamiento n=9 ratones/grupo) y el tratamiento con anticuerpo comenzó al día siguiente 1: Grupo 1 2,5 millones A20/CD20, vehículo, qwx3, IV); Grupo 2 (2,5 millones A20/CD20, anti-CD20xCD3 K&H TDB (2H7v16-2C11 IgG2 murino), 0,5 mg/kg, qwx3, IV); Grupo 3 (2,5 millones A20/CD20, anti-PD1 (8F11, mIgG2a DANA), 10 mg/kg, tiwx3, IP) y Grupo 4 (2,5 millones A20/CD20, anti-PD1 (8F11, mIgG2a DANA), 10 mg/kg, tiwx3, IP + anti-CD20xCD3 K&H TDB (2H7v16-2C11 IgG2 murino), 0,5 mg/kg, qwx3, IV).

Los ratones se trataron con vehículo o CD20 TDB a 0,5mg/kg semanalmente IV durante 3 semanas, y/o anticuerpo anti-PD-1 a 10mg/kg IV para la primera dosis, seguido de dosificación IP 3 veces por semana durante 3 semanas. (N=9 ratones/grupo)

Como se muestra en las Figuras 108A y 108B, el tratamiento combinado de CD20 TDB con anticuerpo anti-PD-1 (Grupo 4) mostró un efecto inesperado y sinergístico al mostrar el crecimiento del tumor al compararlo con el tratamiento con el anticuerpo CD20 TDB, anti-PD-1 o con vehículo solamente.

Ejemplo 4. Generación y caracterización de los TDB CD3/FcRH5 ejemplares. (TDB FcRH5)

Además, exploramos la capacidad de anticuerpos de TDB para reclutar las actividades citotóxicas de las células T de extirpación de las células tumorales mediante el reconocimiento de un antígeno de superficie celular diferente, FcRH5. Para ello, generamos y caracterizamos anticuerpos anti CD3 que tienen un brazo anti-CD3 y un brazo anti-FcRH5 (TDB de FcRH5). Como se describió anteriormente, los TBD FcRH5 se

produjeron como anticuerpos de longitud completa en el formato de botón en ojal (knob-into-hole) como IgG1 humana, como se describió previamente (Atwell et al. *J. Mol. Biol.* 270: 26-35, 1997). La mitad de los anticuerpos se expresaron en *E. coli*, purificados por cromatografía de afinidad de proteínas A, y los pares adecuados de anticuerpos medios se hibridaron *in vitro* como se describió anteriormente (Spiess et al. *Nat. Biotechnol.* 2013). Luego de la hibridación, los TBD FcRH5 se purificaron mediante cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC, por sus siglas en inglés) y se caracterizaron por filtración analítica en gel, espectrometría de masas y electroforesis en gel de poliacrilamida, como se describió anteriormente. Un grupo anti-FcRH5 utilizado en la generación de los TDB FcRH5 fue el del anticuerpo anti-FcRH5 1G7, que comprende: (a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos con n.° de ID de SEC.: 268 y (b) un dominio de VL que comprende una secuencia de aminoácidos con n.º de ID de SEC.: 269. Los grupos anti-CD3 examinados en la generación de los TDB FcRH5 incluían a UCHT1v9, 40G5c, 38E4v1 y 38E4v1.

Los TDB FcRH5 específicos se examinaron para detectar la unión de células T CD8+ (unión CD3), así como también la actividad, según lo evaluado por ensayos de citotoxicidad *in vitro* y ensayos de activación de células T.

A. Afinidad de unión

Las afinidades de unión para cada uno de los TDB FcRH5 se examinaron mediante análisis FACS, como se describió anteriormente para los TDB CD20. Brevemente, para ensayos de unión FACS, se incubaron células T CD8+ con distintas concentraciones de anticuerpos de TDB FcRH5 a 4 °C durante 30 minutos, luego las células se lavaron e incubaron con el segundo anticuerpo (anti-huIgG-PE, BD Bioscience) durante otros 15 minutos, antes de que las células fueran lavadas nuevamente y estuvieran listas para el análisis FACS. La figura 70 muestra los resultados de ensayos de unión de FACS *in vitro* de los TDB FcRH5. Los resultados demuestran que la combinación particular del grupo del anticuerpo anti-CD3, 38E4v1, emparejado con el grupo del anti-FcRH5, 1G7, da como resultado un anticuerpo FcRH5 con una afinidad de unión mayor con las células efectoras.

B. Ensayos in vitro de activación de células T y eliminación de células diana MOLP-2

Los TDB FcRH5 también se examinaron para determinar su capacidad para respaldar la eliminación de las células diana MOLP-2 que expresan FcRH5 y la activación del efecto citotóxico de las células T. *La citotoxicidad* in vitro se monitoreó mediante citometría de flujo. Las células diana se marcaron con CFSE de acuerdo con el protocolo del fabricante (Invitrogen, n.º C34554). Las células diana marcadas con el éster de succinimidilo de carboxifluorescenía (CFSE) y las células T CD8+ purificadas de PBMC humanas se mezclaron en una relación 3:1, con o sin TDB durante 48 horas. Las células se resuspendieron en un volumen igual de PBS + 2% FBS + 1 mM EDTA + yoduro de propidio (PI). El análisis de citometría de flujo se realizó en un FACSCalibur en formato

de automatización. El número de células diana vivas se contó mediante la apertura o cierre de las células negativas CFSE+/PI. El porcentaje de citotoxicidad se calculó de la siguiente manera: % de citotoxicidad (número de células diana vivas sin TDB, número de células diana vivas con TDB) / (número de células diana vivas sin TDB) x 100. Como se representa en las Figuras 71A y 71B, los TDB FcRH5 con UCHT1v9 o 38E4v1 para su grupo anti-CD3 mostraron una eliminación de células diana MOLP-2 sólida *in vitro* en comparación con el TDB FcRH5 que tiene 40G5c como su grupo anti-CD3.

Al realizar las pruebas para los ensayos de activación de las células T, las Figuras 72A a 72D, muestran que los TDB FcRH5 con UCHT1v9 o 38E4v1 para su grupo anti-CD3 eran capaces de inducir fuertemente la actividad de las células T *in vitro*, en comparación con el TDB FcRH5 que tiene 40G5c como su brazo anti-CD3. En estos ensayos, las células diana y las células T CD8+ purificadas se mezclaron en presencia o ausencia de TDB y se analizó la activación de las células T mediante la citometría de flujo. Al final de la incubación, las células se tiñeron con CD8-FITC (BD Bioscience, 555634) CD69-PE (BD Bioscience, 555531) y CD107a-Alexa-Fluor647 (eBioscience, 51-1079). Opcionalmente, después de que la superficie se tiñó con CD8-FITC y CD69-PE, las células se fijaron y se permeabilizaron con una solución de Cytofix/Cytoperm (BD Bioscience, 554722) y se tiñeron de forma intracelular con anti-granzima B-Alexa-Fluor647 (BD Bioscience, 560212). La activación de las células T se evaluó a través del porcentaje de células CD8+CD69+, CD8+CD107a+ y CD8+CD69+GranzymaB+.

Ejemplo 5. Generación y caracterización de los TDB CD3/HER2 ejemplares. (TDB HER2)

Además, exploramos la capacidad de anticuerpos de TDB para reclutar las actividades citotóxicas de las células T de extirpación de las células tumorales mediante el reconocimiento de un antígeno de superficie celular diferente, HER2. Para ello, generamos y caracterizamos anticuerpos anti CD3 que tienen un brazo anti-CD3 y un brazo anti-HER2 (TDB HER2). Como se describió anteriormente, los TDB HER2 se produjeron como anticuerpos de longitud completa en el formato de botón en ojal como IgG1 humana, como se describió previamente (Atwell et al. *J. Mol. Biol.* 270: 26-35, 1997). La mitad de los anticuerpos se expresaron en *E. coli* o en células de ovarios de hámster chino (CHO), purificados por cromatografía de afinidad de proteínas A, y los pares adecuados de anticuerpos medios se hibridaron *in vitro* como se describió anteriormente (Spiess et al. *Nat. Biotechnol.* 2013). Si la producción de anticuerpos TDB se llevó a cabo en células CHO, el anticuerpo incluyó una mutación de glicosilación, por ejemplo, en el residuo N297 (p. ej., N297G), de manera tal que el anticuerpo TDB era una variante sin efector e incapaz de iniciar citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés). Luego de la hibridación, los TBD HER2 se purificaron mediante cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC, por sus siglas en inglés) y se caracterizaron por filtración analítica en gel, espectrometría de masas y electroforesis en gel de poliacrilamida, como se describió anteriormente. Un grupo anti-

HER2 utilizado en la generación de los TDB HER2 fue el del anticuerpo anti-HER2 hu4D5, que comprende: (a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 270 y (b) un dominio de VL que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 271. Los TDB HER2 adicionales se generaron para dirigirse a diferentes regiones del dominio extracelular (ECD, por sus siglas en inglés) de HER2. Un anticuerpo anti-HER2, 2C4, se utilizó como un grupo anti-Her2 que consta de: (a) un dominio de VH que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 593 y (b) un dominio de VL que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 594. Otro anticuerpo anti-HER2 utilizado como un grupo anti-HER2 fue el del anticuerpo anti-HER2, 7C2, que consta de: (a) un dominio de VH que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 595 y (b) un dominio de VL que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 596. Otros grupos anti-HER2 utilizados en la generación de los TDB HER2 incluyeron variantes de afinidad hu4D5, hu4D5.91A y hu4D5.Y100A (descrito en US 7,435,797).

Los TDB HER2 específicos se examinaron para la unión de células T CD8+ (unión CD3) y células SKBR3 (unión Her2), así como para la actividad, según lo evaluado por ensayos de toxicidad *in vitro* y ensayos de activación de células T.

A. Afinidad de unión

Las afinidades de unión para cada uno de los TDB HER2 se examinaron mediante análisis FACS, como se describe anteriormente para los TDB CD20. Brevemente, para ensayos de unión FACS, se incubaron células Jurkat (para el antígeno CD3), células CD8+ humanas (para el antígeno CD3) o SKBR3 (para el antígeno Her2) con distintas concentraciones de anticuerpos de TDB HER2 a 4 °C durante 30 minutos, luego las células se lavaron e incubaron con el segundo anticuerpo (anti-huIgG-PE, BD Bioscience; o anti-huIgG-AlexaFluor647, Southern Biotech) durante otros 15 minutos, antes de que las células se lavaran nuevamnte y estuvieran listas para el análisis FACS. La media geométrica de fluorescencia se leyó mediante citometría de flujo. Las Figuras 73, 76A, 78A-78C, 79A y 80A-80B muestran los resultados de los ensayos de unión FACS *in vitro* de los TDB HER2.

Los múltiples grupos HER2 que se unen a diferentes regiones de HER2 se examinaron en combinación con múltiples grupos CD3 que se unen a distintas regiones de CD3ε para caracterizar las propiedades de unión de cada combinación. La Figura 76A proporciona la estructura cristalina del ECD HER2 y la del $CD3_{\varepsilon}$ y resalta las regiones a las que se unen los diferentes grupos HER2 y CD3. El anticuerpo HER2 hu4D5 se conoce como trastuzumab y se une a un epítopo en el dominio IV de HER2 que es la región proteica que está más cerca de la membrana celular. El anticuerpo monoclonal recombinante humanizado 2C4 (rhuMAb 2C4) también se conoce como pertuzumab, que se une a un epítopo en el dominio II de HER2 que está a 50 angstromios del lugar donde se une hu4D5. Pertuzumab (PERJETA®, Genentech, Inc, South San Francisco) representa el primero de una nueva clase de agentes conocidos como inhibidores de la dimerización de HER (HDI, por sus siglas en inglés) y de funciones para inhibir la capacidad de HER2

de formar heterodímeros u homodímeros activos con otros receptores HER (tales como EGFR/HER1, HER2, HER3 y HER4) (Harari and Yarden. *Oncogene* 19:6102-6114, 2000; Yarden and Sliwkowski. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2:127-137, 2001; Sliwkowski. *Nat. Struct. Biol.*

10:158-159, 2003; Cho et al. *Nature* 421:756-60, 2003; and Malik et al. *Pro. Am. Soc. Cancer Res.* 44:176-177, 2003). El anticuerpo murino anti-HER2 7C2 se une a un epítopo en el dominio I de HER2 (publicación de PCT N.° WO 98/17797) que está a 100 angstromios de la región de HER2 unido por hu4D5 (Figura 76A).

Además, la afinidad de unión del TDB HER2 se probó con múltiples grupos anti-CD3. Uno de los grupos anti-HER2 proporcionados se combinó con grupos de alta afinidad dirigidos a CD3 humanos, tales como SP34 y 38E4v1. Otras combinaciones de TDB HER2 incluyó los grupos de baja afinidad dirigidos a CD3 humanos 40G5c o el grupo de 2C11 dirigido al CD3 murino. UCHT1v9 por su grupo anti-CD3 y hu4D5 por su grupo anti-HER2, referido en este documento como TDB HER2 (UCHT1v9/hu4D5) o TDB HER2, se comparó con el anticuerpo anti-HER2, trastuzumab y los fragmentos trastuzumab Fab en un ensayo de Scatchard competitivo (Ramirez-Carrozzi et al. *Nature Immunology*. 12: 1159-1166, 2011). En este ensayo, la unión a SKBR-3 se determinó por la competencia de unión de ^{125}I-trastuzumab Fab con trastuzumab, trastuzumab Fab o TDB HER2 bioespecíficos. La Figura 74A muestra los resultados del competitivo ensayo de Scatchard *in vitro* de TBD HER2.

B. Ensayos in vitro sobre la eliminación de células diana SKBR3 y MCF7 y la activación de células T

Las combinaciones de TDB HER2 de uno de los tres grupos anti-HER2 (hu4D5, 2C4 y 7C2) con el grupo anti-CD3 de alta afinidad 38E4v1 o con el grupo de baja afinidad 40G5c se examinaron *in vitro* por su capacidad de mediar en la eliminación de células diana de células SKBR3 o MCF7 que expresan HER2 (Figura 77). La actividad *in vitro* de los TDB hu4D5 con cualquier grupo anti-CD3 demostró ser más eficaz que los TDB 2C4 y 7C2 en la mediación de la eliminación celular máxima de las células SKBR3 y MCF7 como se mide por su EC50 (Figura 78). Esta actividad de eliminación también dependía del grupo CD3 utilizado. La combinación del grupo anti-CD 3 38E4v1 con cualquiera de los grupos anti-HER2 hu4D5, 2C4 o 7C2 fue más eficaz que las combinaciones de TDB HER2 40G5c (Figura 79). La prueba adicional de las 6 combinaciones de TDB HER2 reveló que su actividad de eliminación de células diana no depende del nivel de la expresión de HER2 en las células diana. La figura 80 muestra que los TDB HER2 no eran selectivos para los altos HER2 que expresan las células diana SKBR3 sobre los bajos HER2 que expresan las células diana MCF7. La actividad del TDB HER2 era, en cambio, dependiente de la afinidad del grupo anti-HER2 de HER2 (Figura 81). Los TDB de baja afinidad HER2 retuvieron la actividad en células MCF7 que expresan HER2 bajos y no pudieron matar selectivamente a las células SKBR3 amplificadas de HER 2 (Figura 82).

Los TDB HER2 también se ensayaron para determinar la especificidad del grupo anti-HER2 para sus respectivos epítopos HER2. La actividad de eliminación del TDB HER2

hu4D5-40G5c se limitó cuando se combinó con concentraciones crecientes de Trastuzumab (hu4D5). Sin embargo, la eficacia de trastuzumab no se ve afectada por la combinación del TDB hu4D5 con el anticuerpo hu4D5 (Figura 83). Por el contrario, la eliminación de las células diana mediada por 2C4-40G5c o 7C2 38E4v1 bloqueada por la coadministración de los anticuerpos monoespecíficos bivalentes pertuzumab (2C4) o 7C2, respectivamente (Figura 83). Cuando los grupos anti-HER2 se probaron en múltiples ensayos de afinidad, todos los clones que demostraban actividad alta o media de TDB HER2 competían con trastuzumab o pertuzumab (Figura 84). Para la identificación de los TDB candidatos para el ensayo *in vivo*, los grupos CD3 de alta (38E4v1, 38E4 y SP34) y baja (40G5c y 2C11) afinidad se probaron *in vitro* con células T CD3+ humanizadas derivadas de ratones en combinación con los grupos anti-HER2 hu4D5, 2C4 y 7C2 (Figuras 85-86). A partir de este ensayo, se seleccionaron tres TDB candidatos según su actividad de eliminación para una mayor caracterización *in vivo*: hu4D5-SP34, hu4D5-2C11 y 2C4-38E4. El tratamiento de animales con tumores con expresión HER2 con el TDB HER2 hu4D5-2C11 resultó en un aumento en las células CD45+ y CD8+ en el tumor tan pronto como a las 4 horas luego del tratamiento. Tras un análisis adicional, los tumores tratados TDB HER2 revelaron un aumento en las células T IFNγ+ y PD1+ CD8+ y un aumento en presencia de células T reguladoras (Treg) (Figura 87B). La detección de un aumento de infiltrados inmunes en tumores también se relacionó con una disminución del volumen del tumor de los animales tratados TDB HER2, en comparación con el tratamiento de control del vehículo (Figura 87A). En la figura 88A, el grupo anti-HER2 hu4D5 se combinó con el grupo anti-CD3 de baja afinidad, 2C11 o con el grupo anti-CD3 de alta afinidad, SP34, y ambos resultaron en la regresión del tumor en ratones HER2 transgénicos. Sin embargo, esta respuesta no se observó con el grupo anti-GER2 2C4 de baja afinidad combinado con el grupo anti-CD3 de alta afinidad 38E4 (Figuras 88A-88B).

El TDB HER2 también se comparó con fragmentos de trastuzumab y trastuzumab Fab bivalentes por su capacidad de inhibir directamente la proliferación de SKBR3. Las células dianas que expresan HER2 se incubaron en placas de 96 pocillos a una densidad de 5×10^3 células/posillo y se incubaron durante la noche para la fijación celular antes del tratamiento con el anticuerpo o fragmento de anticuerpo designado. Se analizó la proliferación/viabilidad celular después de 6 días de tratamiento mediante el Ensayo de viabilidad celular luminiscente CELLTITERGLO® (Promega, Madison, WI). En la Figura 74B se muestran los resultados de este ensayo. Además, se realizó un ensayo *in vitro* de toxicidad con trastuzumab, trastuzumab producida en *E. coli* y TDB HER2 para medir su capacidad para inducir la citotoxicidad NK mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC) (Jefferis *Trends in Pharmacological sciences.* 30: 356-362, 2009; Simmons et al. *Journal of Immunological Methods*. 263: 133-147, 2002). Los anticuerpos producidos en E. *coli* no están glicosilados, lo que resulta en deterioro de la unión FcyR, que se necesita para mediar la ADCC. El ensayo de citotoxicidad se realizó como en Junttila et al. (*Cancer Research.* 70: 4481-4489, 2010) con un a kit de detección de

citotoxicidad; LDH (Roche, Mannheim, Alemania). Brevemente, las células lisadas se detectaron mediante la liberación de la deshidrogenasa láctica (LDH, por sus siglas en inglés) después de 4 horas de tratamiento con el anticuerpo especificado. Los resultados se muestran en la Figura 74C.

Los TDB HER2 también se probaron para determinar su capacidad para soportar la eliminación de las células diana SKBR3 que expresan HER2 y la activación del efecto citotóxico de las células T. *La citotoxicidad* in vitro se controló mediante citometría de flujo. Las células dianas se marcaron con éster de succinimidilo de carboxifluoresceína (CFSE, por sus siglas en inglés) de acuerdo con el protocolo del fabricante (Invitrogen, # C34554). Las células diana marcadas con CFSE y las células T CD8+ purificadas de PBMC humanos se mezclaron en cierta proporción E:T (como se indica en las leyendas de la figura), con o sin TDB por 24 horas. Al final de la incubación, las células se levantaron con tripsina y se juntaron de la placa. Las células se resuspendieron en un volumen igual de PBS + 2% FBS + 1 mM EDTA + yoduro de propidio (PI). El análisis de citometría de flujo se realizó en un FACSCalibur en formato de automatización. El número de células diana vivas se contó mediante la apertura o cierre de las células negativas CFSE+/PI. El porcentaje de citotoxicidad se calculó de la siguiente manera: % de citotoxicidad (número de células diana vivas w/o TDB, número de células diana vivas w/TDB) / (número de células diana vivas w/o TDB) x 100. Como se muestra en la Figura 75, el TDB HER2 mostró una eliminación de células diana SKBR3 *in vitro* fuerte comparada con el TDB HER2 que tenía una variante de afinidad hu4D5 91A o Y100A como su grupo anti-HER2 (EC50 de hu4D5/ UCHT1v9 TDB = 0,1 ng/ml; hu4D5.91A/ UCHT1v9 TDB = 25,5 ng/ml; hu4D5.Y100A/ UCHT1v9 TDB = no se puede determinar).

Además, la afinidad de unión de la variante hu4D5 de anti-HER2 (0,4 nM) al dominio extracelular de HER2 (ECD) es mayor que los grupos HER2 2C4 (2,0 nM) y 7C2 (1,7 nM), que se muestra en la Figura 76B. Además, la Figura 76C muestra que el TDB HER2 hu4D5 es un mediador más potente de la eliminación de las células diana MCF7 que el TDB HER2 2C4 y el TDB HER2 7C2. La cinética de la eliminación inducida por el TDB HER2 se ensayó adicionalmente. Como se observa en la Figura 94A, no se detectó actividad de eliminación significativa a las 4-12 horas. La eliminación fuerte se detectó a las 24 horas y la eliminación aumentó con el paso del tiempo. Como se muestra en las figuras 90A, 90C y 92C, la comparación adicional de los grupos anti-CD3 del TDB HER2 hu4D5 demostró la eficacia de los diferentes clones en la mediación de la eliminación de células SKBR3 que expresan HER2. En particular, dos TDB Her2, hu4D5/38E4c y hu4D5/40G5c, fueron sorprendentemente tan o más eficaces en la mediación de la eliminación de las células dianas que el TDB HER2 hu4D5/SP34 (Figuras 90B y 90C).

Cuando se probó para ensayos de activación de células T, la Figura 89 muestra que el TDB HER2 fue capaz de inducir sólidamente la actividad de la células T *in vitro*, en comparación con el TDB HER2 que tiene variante de afinidad hu4D5 91A o Y100A como su grupo anti-HER2. Tres grupos anti-CD3 (SP34, 38E4c y 40G5c) del TDB HER2 hu4D5 ensayados mostraron diferentes afinidades de unión para el antígeno CD3 en células T

CD8+ humanas, como se observa en la Figura 91A. No obstante, los tres TDB HER2 pudieron mediar la activación de células T CD8+ (Figura 91B). En la Figura 92D, se muestra un análisis adicional de la capacidad de los grupos anti-CD3 38E4 y 38E4c del TDB HER2 hu4D5 para mediar la activación de células T CD8+. Se ensayó aún más la cinética de la activación de células T mediante TDB HER2. Aparecieron signos tempranos de activación de células T (CD69) 4 horas después del inicio del tratamiento de TDB HER2. Sin embargo, los marcadores de activación tardía (CD107a extracelular) se detectaron más tarde en el punto temporal de 24 horas (Figura 94A). Además, la activación de células T no se detectó después de 48 horas cuando las células CD8+ se incubaron con TDB HER2 o células diana que no expresan HER2 humana (células BJAB). Se observó una sólida activación de células T cuando las células HER2+ SKBR3 se utilizaron como dianas acompañadas por la liberación de gránulos citotóxicos (Figura 93A).

También probamos la capacidad de TDB HER2 para inducir la eliminación de células diana BT474 y se ensayó la activación de células T para las siguientes cinco relaciones de células T CD8+ efectoras a las células diana: 1:5, 1:2, 1:1, 3:1, y 5:1. Este experimento revela que la citotoxicidad medida por la liberación de LDH se redujo significativamente mediante la titulación de células efectoras. Sin embargo, incluso con una relación E: T de 1: 1, se detectó una señal de LDH débil y la sólida activación de las células T (Figura 94B).

En estos ensayos, las células diana y las células T CD8+ purificadas se mezclaron en presencia o ausencia de TDB y se analizó la activación de células T mediante la citometría de flujo. Al final de la incubación, las células se tiñeron con CD8-FITC (BD Bioscience, 555634) CD69-PE (BD Bioscience, 555531) y CD107a-Alexa-Fluor647 (eBioscience, 51-1079). Opcionalmente, las células se tiñeron con CD8-FITC y CD69-PE, donde la activación de células T se evaluó por el porcentaje de CD8+CD69+ en las células CD8+. Alternativamente, después de que la superficie se tiñó con CD8-FITC y CD69-PE, las células se fijaron y se permeabilizaron con una solución de Cytofix/Cytoperm (BD Bioscience, 554722) y se tiñeron de forma intracelular con anti-granzima B-Alexa-Fluor647 (BD Bioscience, 560212). La activación de células T se evaluó por el porcentaje de células CD8+CD107a+.

Otro índice para la citotoxicidad mediada por células T para TDB HER2 (UCHT1v9 / hu4D5) medido es un ensayo de exocitosis de los gránulos. La Figura 93B muestra los resultados para la perforina soluble (Cell Sciences), granzima A y granzima B (eBioscience) detectados a partir del medio de crecimiento por el método ELISA de acuerdo con los protocolos del fabricante. En este ensayo, se utilizó un TDB control (10 ng/ml), uno que comparte el mismo grupo AD3 como TDB HER2 pero que tiene un grupo para la diana irrelevante, o TDB HER2 (10 ng/ml). Los anticuerpos se incubaron de manera individual por 18 horas con células diana SKBR3 y células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés) efectoras, que se separaron de la sangre de voluntarios sanos a través del medio de separación de linfocitos (MP

Biomedicals, Solon, OH). *La citotoxicidad* in vitro se midió mediante la liberación de LDH, como se describe anteriormente. Se realizó una serie de ensayos de apoptosis con TDB HER2 (1 ng/ml), PBMC efectoras y células diana SKBR3. Después de 24 horas de tratamiento, la exocitosis de gránulos coincidió con una significativa elevación inducida de TDB HER2 de la actividad de la caspasa 3/7 (CASPASE-GLO® ensayo 3/7, Promega), apoptosis (ensayo Cell Death Detection ELISAplus, Roche) y citotoxicidad tal como se midió por la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH), como se describe anteriormente (Figura 93C).

La capacidad de TDB HER2 para inducir la eliminación de HER2 o células 3T3 transfectadas con el vector se midió mediante el ensayo de citotoxicidad de LDH antes mencionado, donde no se detectó ninguna eliminación de células 3T3 transfectadas con el vector después de 19 horas. En cambio, las células 3T3 transfectadas HER2 se eliminaron de manera muy eficiente (Figura 93D). El ensayo de eliminación se modificó para bloquear la unión del grupo HER2 mediante trastuzumab Fab (1µg/ml) o el dominio extracelular HER2 soluble (HER2 ECD) (1 mg/ml) y dio lugar a la inhibición eficaz de la actividad de eliminación después de 24 horas (Figura 93E). Para confirmar que las células T dependen de la eliminación, se mermaron las células CD3+ del OPBMC mediante microperlas CD3+ de Miltenyi (# 130-050-101). La Figura 93F muestra la disminución que resultó en la pérdida de la actividad de eliminación de células diana después de 19 horas, tal como se evaluó mediante análisis de FACS en presencia de TDB HER2.

TDB HER2 induce la proliferación de células T

Para investigar si TDB HER2 induce la proliferación de células T, se co-cultivaron células T CD8 +, células diana (SKBR3) y TDB HER2 de 0,1 µg/ml, seguido por el cultivo de células T en ausencia de células diana y TDB HER2. La proliferación de células T se midió en el día 3 mediante citometría de flujo como una dilución de CFSE en las células CD8+/PI con divisiones celulares. Después de 3 días, el 75% de las células T pulsadas con TDB HER2 y las células diana se habían sometido a una división celular como se muestra en la Figura 95A. El número de células T inducidas TDB HER2 se ensayó mediante el etiquetado de células T CD8+ purificadas con CFSE de acuerdo con el protocolo del fabricante (Invitrogen, # C34554). Las células T CD8+ marcadas con CFSE se incubaron con células dianas en presencia o ausencia de TDB por 19 horas. Las células T se recogieron, lavaron y cultivaron de 2 a 7 días (RPMI+10% FBS). El número de células CD8+ vivas (CD8+/PI-) y el porcentaje de células dim CFSE se detectaron mediante FACS. En la Figura 95B, el número de células no aumentó. Complementar aún más el medio de crecimiento con IL-2 (20 ng/ml) proporcionó una señal de supervivencia para las células CD8 + y se detectó una sólida proliferación de células T en las células T, pero sólo si estaban expuestas al TDB HER2 y a las células diana (Figura 95C). Es importante destacar que no se detectó ningún efecto espectador en las células de expresión no dianas en condiciones donde la mayoría de las células HER2+ en la misma cultura

resultaron eliminadas. TDB HER2 indujo la proliferación y la expansión policlonal de células T, lo que puede ser crítico para la amplificación de los linfocitos infiltrantes de tumor.

La actividad TDB HER2 se relaciona con el nivel de expresión HER de la célula diana

Para investigar la relación entre el número de copias de la diana y la actividad TDB, se seleccionó un panel de líneas celulares de cáncer con un número predeterminado de HER2-receptores en la membrana celular (Aguilar et al. *Oncogene*. 18:6050-62, 1999). Se detectaron niveles de expresión de proteínas HER2 en una línea celular negativa HER2 (BJAB LUC), 3 líneas de células bajas 3 HER2 (MDA435, MDA231, MCF7) y 3 líneas celulares amplificadas/de sobreexpresión HER2 (MD453, SKBR3, BT474) mediante Western blot (Figura 96A). Las líneas celulares de HER2 negativos, HER2 bajos y sobreexpresión de HER2 se incubaron con TDB HER2 y con PBMC efectoras en una relación E:T 25:1 durante 26 horas. En este punto de tiempo, la citotoxicidad se detectó a través del ensayo de liberación de LDH. La Figura 96B muestra que las células amplificadas/de sobreexpresión HER2 fueron significativamente más sensibles a la eliminación mediada por TDB (p = 0,015, t-test) y se lisaron eficientemente a femtomolar a bajas concentraciones picomolares (EC50 = 0,8-3 pM). Las líneas celulares que expresan niveles bajos de HER2 fueron significativamente menos sensibles al anticuerpo TDB HER2 (EC50=33-51 pM). Una cantidad de <1000 copias de antígeno diana fue suficiente para apoyar la eliminación de células T.

Para los estudios realizados en las Figuras 96C-96D, la línea celular MCF7 o la línea celular BJAB estaba co-dirigida con células SKBR3 en presencia de TDB HER2 en el mismo ensayo de eliminación. En este ensayo, las células MCF7 o BJAB se marcaron con CFSE y se mezclaron con SKBR3 y PBMC (E:T 20:1), seguido de 19 horas de tratamiento con TDB HER2. Las células se tiñeron con APC y PI anti-HER2. La Figura 96C muestra el porcentaje de las células vivas SKBR3 (HER2 alto, PI-) y MCF7 (CFSE+. PI-) detectado mediante FACS y normalizado a perlas fluorescentes. No se detectó la eliminación de las células MCF7 en el EC50 para la eliminación de SKBR3. Se muestra el porcentaje de células vivas de SKBR3 (HER2 elevado, PI-) y BJAB (CFSE+ PI-) detectadas por FACS y normalizadas por perlas fluorescentes. No se detectó ninguna muerte importante de células de BJAB en cualquier concentración de TDB HER2 (Figura 96D).

La ocupación objetivo baja es suficiente para la actividad de TDB

Luego, se calculó la ocupación de HER2 en EC50 para TDB HER2 mediante la utilización de la fórmula [D]/[D]+K_D (donde D = medicamento y K_D para TDB HER2 era 5,4 nM). Se informó el número de copia de HER2 (Aguilar et ál. Oncogene. 18: 6050-6062, 1999). Los valores de EC50 se calcularon de los datos de respuesta de la dosis en la Figura 97B. La Figura 96E muestra que en todas las líneas celulares probadas inferiores al 1 % de la ocupación diana era suficiente para una eliminación eficiente. En caso del

HER2 elevado que expresa líneas celulares, la ocupación requerida era incluso inferior (0,01-0,05 %). El número absoluto calculado de TBD HER2 ligado a HER2 en el EC50 era tan solo 10-150 en las líneas celulares bajas expresadas. Estos resultados muestran la extrema potencia de TDB HER2 y son coherentes con los estudios del desencadenante de TCR, que sugiere tan solo 1-15 TCR que deben involucrarse para desencadenar las respuestas a las células T (Irvine et ál. *Nature*. 419: 845-849, 2002; Purbhoo et ál. *Nature Immunology*. 5: 524-530, 2004; Sykulev et ál. *Immunity*. 4: 565-571, 1996). La potencia de TDB HER2 era coherente en el rango bajo de picomolar a femtomolar. Además, tan solo 10-500 TDB ligados a HER2 eran suficientes para inducir una citotoxicidad importante *in vitro*. Tan solo ~1000 copias de HER2 en la membrana plasmática eran suficientes para inducir la muerte. Estos estudios también demostraron una correlación entre los niveles de expresión objetivo y la sensibilidad *in vitro* a los TDB HER2.

El TDB HER2 es eficiente en la muerte de las células cancerígenas de HER2+ resistentes a los tratamientos anti-HER2.

Luego, se examinaron las líneas celulares que se han mostrado previamente para expresar niveles elevados de HER2 pero que son insensibles a los efectos celulares directos de trastuzumab y lapatinib *in vitro* (Junttila et ál., *Cancer Cell*, 15:429-40, 2009; Junttila et ál. *Breast Cancer Res Treat*, 2010). Para algunas líneas celulares, la activación de la vía de PI3K debido a las mutaciones de activación adquiridas en la subunidad catalítica de PI3K (KPL4, HCC202) o por la pérdida de PTEN (HCC1596) puede provocar resistencia. Un panel de seis líneas celulares (5 mamas, 1 pulmón) se analizó para la liberación de LDH como medición de citotoxicidad en presencia de PBMC efectores en una proporción de 10:1 y TDB HER2 durante 19 horas. El EC50 para la muerte mediada de TDB HER2 estaba en el rango femtomolar o picomolar bajo (Figura 97A). Los clones BT474-M1 resistentes a T-DMI1 y parentales se trataron con T-DMI1 durante 3 días. En este punto temporal, se midió la viabilidad celular con CELLTITERGLO® (Figura 97B). Se ha informado con anterioridad la sensibilidad de las líneas celulares a T-DM1 (Junttila et ál. *Breast Cancer Res Treat*. 2010; Lewis Phillips et ál. *Cancer Research.* 68: 9280-9290, 2008). En comparación, los clones de BT474-M1 resistentes a T-DM1 y parentales se trataron con TDB HER2 en presencia de las células CD8+ T efectoras en una proporción de 3:1 durante 24 horas. Se detectó citotoxicidad con el ensayo FACS (Figura 97C). Además, TDB HER2 era eficaz en la muerte de las células cancerígenas del pulmón HER2+. Con dos modelos de líneas celulares independientes KPL4 y BT474, (Figura 97B-97C), la resistencia adquirida a T-DM1 no afectó la sensibilidad a TDB HER2.

La identificación de la actividad de eliminación de células T con TDB HER2 depende de la expresión HER2, pero es independiente de la vía de señalización de HER2, que sugiere que TDB HER2 pueda ser eficiente en el tratamiento de tumores que son resistentes a los tratamientos actuales anti-HER2. Además, los datos demostraron actividad igual en el tratamiento de las líneas celulares resistentes a trastuzumab/lapatinib múltiples en comparación con las células sensibles. La resistencia

en estas células se genera mediante diversos mecanismos que afectan la vía de HER2. Los datos presentados aquí sugieren que el cambio al mecanismo alternativo de acción mediante la utilización de TDB HER2 puede permitir ampliamente superar la resistencia a los conjugados del medicamento del anticuerpo (p. ej., T-DM1), inhibidores de moléculas pequeñas objetivo (p. ej., lapatinib) y anticuerpos monoclonales clínicos que bloquean la señalización de la vía (p. ej. trastuzumab).

Farmacocinética de TDB HER2 en la rata

Para evaluar el perfil de la farmacocinética (PK) de TDB HER2, se utilizaron ratas Sprague Dawley. Los animales se separaron en los dos grupos mencionados a continuación: Grupo 1: TDB HER2 (10 mg/kg, IV única, n = 4); Grupo 2: trastuzumab (10 mg/kg, IV única, n = 4). Las muestras se tomaron de 4 ratas por grupo en puntos temporales durante 35 días posteriores a la dosis. Aproximadamente se recolectó 0,2 ml de sangre completa a través de la vena yugular (bajo anestesia de CO_2/O_2). Se dejaron coagular y centrifugar las muestras bajo refrigeración (5 °C durante 10 minutos a 2000 x g) a fin de obtener suero. Las muestras de suero se analizaron para IgG humano mediante ELISA, donde se utilizó un burro anti-huFc recubierto con placa de microtitulación para capturar los anticuerpos anti-HER2 humanizados en circulación y una cabra anti-huFc-HRP (adsorbida por el ratón) para la detección. Los parámetros de PK se determinaron con un método de 2 compartimientos (Modelo 7) con WINNONLIN®, versión 5.2.1 (Pharsight Corp., Mountain View, CA). El TDB HER2 no reacciona con CD3 de ratas o HER2 de ratas y mostró una disposición bifásica típica de un IgG1 con una fase de distribución corta y una fase de eliminación lenta (Figura 98). Tanto la depuración como la vida media de TDB HER2 eran similares para trastuzumab, y dentro del rango esperado de un IgG1 típico en ratas.

TDB HER2 inhibe el crecimiento del tumor *in vivo* en ratones inmunodeprimidos

La eficacia in vivo de TDB HER2 se probó en ratones NOD-SCID, que carecen de células T y B funcionales endógenas y han reducido los niveles de tipos celulares de NK, DC y macrófagos. En este experimento, los ratones NOD/SCID (NOD.CB17-*Prkdcscid*/J, Jackson Labs West) se implantaron con 0,36 mg, gránulos de estrógenos de liberación sostenida por 60 días (Innovative Research of America) 1 a 3 días antes de la inoculación celular, de manera subcutánea sobre el costado opuesto de la inoculación tumoral. En el Día 0, las células MCF7-neo/HER2 5 x 10^6 se inyectaron solas o juntas con PBMC humano no estimulado 10×10^6 de uno de dos donantes sanos (PBMC 1, 2) en HBSS-matrigel en la almohadilla de grasa mamaria derecha de 2/3. Los ratones inoculados se dividieron en los siguientes cinco grupos: Grupo 1: Vehículo (TDB de control, 0,5 mg/kg, qwk x 3, IV, comenzando el día 0, n=5-10); Grupo 2: PBMC(1) (PBMC (1) + TDB de control, 0,5 mg/kg, qwk x 3, IV, comenzando el día 0, n=5-10); Grupo 3: PBMC (1) + TDB HER2 (PBMC (1) + TDB HER2, 0,5 mg/kg, qwk x 3, IV, comenzando el día 0, n=5-10); Grupo 4: PBMC(2) (PBMC (2) + TDB de control, 0,5 mg/kg, qwk x 3, IV, comenzando el día 0, n=5-

10); Grupo 5: PBMC (2) + TDB HER2 (PBMC (2) + TDB HER2, 0,5 mg/kg, qwk x 3, IV, comenzando el día 0, n=5-10). Los primeros tratamientos se administraron 2 horas después de la inoculación. Los volúmenes de los tumores de ratones individuales y los volúmenes de los tumores adaptados de los grupos terapéuticos se presentan en la Figura 99A, donde TDB HER2 evitó el crecimiento de los tumores que expresan HER2.

La dependencia de TDB HR2 en los PBMC humanos además se probó en un modelo de ratones inmunodeprimidos similares. Nuevamente, las células MCF7-neo/HER2 5 x 10^6 se inyectaron solas o juntas con PBMC humano no estimulado 10×10^6 de un donante sano (PBMC 3) en HBSS-matrigel en la almohadilla de grasa mamaria derecha de 2/3, y los primeros tratamientos se administraron 2 horas después de la inoculación. En la Figura 100A, los ratones inoculados se dividieron en los siguientes dos grupos: Grupo 1: Sin tratar (n=7); Grupo 2: TDB HER2 (TDB HER2, 0,5 mg/kg, qwk x 3, IV, comenzando el día 0, n=7). En la Figura 100B, los ratones inoculados se dividieron en los siguientes tres grupos: Grupo 1: Sin tratar (n=7); Grupo 2: PBMC(3) (PBMC (3) + vehículo, 0,5 mg/kg, qwk x 3, IV, comenzando el día 0, n=7); Grupo 3: PBMC(3) + TDB de control (PBMC(3) + TDB-2C11 de control, 0,5 mg/kg, qwk x 3, IV, comenzando el día 0, n=7). Las mediciones del volumen del tumor resultante no revelan ningún efecto en el crecimiento del tumor en animales tratados con TDB de control.

El TDB HER2 provoca regresión de los tumores mamarios grandes en ratones transgénicos huHER2

Para modelar la actividad de TDB HER2 en ratones inmunocompetentes, se utilizaron ratones transgénicos MMTV-huHER2 humanos (Finkle et ál. *Clinical Cancer Research*. 10: 2499-2511; 2004), y un TDB HER2 sustituto que comprende un clon del anticuerpo del reactivo CD3 IgG2A murino 2C11 (Leo et ál. *Proc Natl Acad Sci USA*. 84: 1374-1378, 1987) se generó para evitar una respuesta inmunitaria hacia el TDB. Para la expresión como mulgG2a, las mutaciones equivalentes del botón en ojal (Atwell et ál. *J Mol Biol.* 270: 26-35, 1997) se introdujeron en la región Fc, así como D265A y N297G (numeración UE) para eliminar la función efectora. En TDB HER2 mulG2a el brazo "botón" es hu4D5 anti-HER2 murino y el "ojal" es CD3 2C11 anti-murino quimérico (Leo et ál. *Proc Natl Acad Sci USA*. 84: 1374-1378, 1987) (TDB 2C11/hu4D5) o CD3 SP34 anti-hu del ratón (Pessano et ál. *La Publicación de EMBO.* 4: 337-344, 1985) (TDB SP34/hu4D5). Los anticuerpos biespecíficos DE mulG2a se expresaron en células CHO y se ensamblaron mediante un ensamble *in vitro*. Los anticuerpos biespecíficos se purificaron de contaminantes mediante cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) como se describe en otro lugar (Speiss et ál. *Nat Biotechnology.* 31: 753-758, 2013). El material resultante se analizó para los niveles de endotoxinas con un sistema de prueba portátil ENDOSAFE® (Charles River, EE.UU.) y cuando sea necesario, el contenido de la endotoxina se redujo mediante el lavado de la proteína con 0,1 % de TRITON™ X-114. La actividad *in vitro* de TDB hu4D5/2C11 era similar a TDB HER2 reactivo de CD3 humano (Figura 101).

En la Figura 99B-99D, los animales transgénicos MMTV-99D con tumores mamarios establecidos se dividieron en los siguientes dos grupos: Grupo 1: Vehículo (0,5 mg/kg, qwk x 5, IV, comenzando el día 0, n=7); y el Grupo 2: TDB HER2 (TDB HER2 (2C11/hu4D5), 0,5 mg/kg, qwk x 5, IV, comenzando el día 0, n=7). La figura 99B muestra una regresión detectada en 57 % de los ratones y el 43 % de los ratones no tenían ningún tumor detectable tras el tratamiento. La figura 99C muestra que TDB HER2 (2C11/hu4D5) dio lugar a más de 50 % de regresión tumoral, salvo un tumor. Los participantes incluían tumores que eran >1000 mm^3 al comienzo del tratamiento como se observa en la Figura 99D. En un experimento similar dos TDB de control se utilizaron donde uno es un TDB de control del brazo de CD3 con el brazo de CD3 específico murino cambiado al brazo de CD3 específico humano (TDB HER2 (SP34/hu4D5)), y uno es un TDB de control, uno que comparte el mismo brazo de CD3 que el TDB HER2 (2C11/hu4D5) pero tiene un brazo diana irrelevante (CTRL TDB-2C11). En la Figura 99E, los animales transgénicos MMTV-huHER2 con tumores mamarios establecidos se dividieron en los siguientes dos grupos: Grupo 1: TDB de control del brazo de CD3 (TDB HER2 (SP34/hu4D5), 0,5 mg/kg, qwk x 5, IV, comenzando el día 0, n=5); y el Grupo 2: TDB de control (TDB-2C11 de control, 0,5 mg/kg, qwk x 5, IV, comenzando el día 0, n=5). El crecimiento de los tumores transgénicos MMTV-huHER2 no se vio afectado por los TDB de control.

El TDB HER2 además se probó para la eficacia *in vivo* en ratones transgéncios huCD3. Los ratones transgénicos humanos CD3ε se han descrito anteriormente ((huCD3 transgénico), de la Hera et ál. *J Exp Med.* 173: 7-17, 1991). En este estudio, 0,1 millones de células de CT26-HER2 se inyectaron subcutáneamente en ratones transgénicos huCD3. Una vez que se establezcan los tumores CT26-HER2, los animales se dividieron en los siguientes dos grupos: Grupo 1: Vehículo (0,5 mg/kg, qwk x 3, IV, comenzando el día 0, n=7); Grupo 2: TDB HER2 (TDB HER2 (SP34/hu4D5), 0,5 mg/kg, qwk x 3, IV, comenzando el día 0, n=7). TDB HER2 inhibió el crecimiento de los tumores establecidos, pero el efecto fue transitorio y no se observaron respuestas completas (Figura 99F). El estudio demostró la actividad *in vivo potente* de TDB HER2, incluyendo las respuestas dramáticas en ratones transgénicos MMTV-huHER2.

En un experimento similar, la eficacia *in vivo* del TDB HER2 reactivo del ratón (2C11/hu4D5) se probó en ratones Balb/c. Nuevamente, los tumores singénicos se establecieron en ratones Balb/c inyectando células CT26-HER2 $1x10^5$ subcutáneamente. Los animales que tenían tumores se dividieron en uno de los siguientes cuatro grupos: Grupo 1: Vehículo (0,5 mg/kg, qwk x 3, IV, comenzando el día 0, n=10); Grupo 2: TDB HER2 (TDB HER2 (2C11/hu4D5), 0,5 mg/kg, qwk x 3, IV, comenzando el día 0, n=10); Grupo 3: TDB de control (CTRL TDB (2C11/hu4D5), 0,5 mg/kg, qwk x 3, IV, comenzando el día 0, n=10); y el Grupo 4: TDM-1 (TDM-1, 15 mg/kg, qwk x 3, IV, comenzando el día 0, n=10). La figura 99G muestra que a pesar de las respuestas incompletas, el TDB HER2 prolongó el tiempo de manera significativa a la evolución del tumor (valor p de rango logarítmico <0,0001). Por contraste, el TDB de control con un brazo tumoral irrelevante

no tuvo efecto en el crecimiento tumoral. Además, los tumores no eran sensibles a TDM-1.

TDB HER2 inhibe el crecimiento de tumores establecidos en ratones inmunocompetentes

Los ratones transgénicos humanos CD3ε (de la Hera et ál. *J Exp Med.* 173: 7-17, 1991) se utilizaron para modelar la actividad de TDB HER2 en ratones inmunocompetentes. En este experimento, las células T transgénicas huCD3 fueron extraídas de bazos de ratones transgénicos y BALB/c huCD3 o de la sangre periférica de donantes humanos sanos. Las células se tiñeron con CD8 de ratón o humano y CD3 humano (UCHT1 clon) en la Figura 101A o el CD3 del ratón (2C11 clon) en la Figura 101B. Las células CD8+ se detectaron mediante citometría de flujo. La Figura 101A muestra el CD3 humano expreso de las células T transgénicas huCD3 a aproximadamente 50 % del nivel de las células T humanas, y la Figura 101B muestra CD3 murino expreso de las células T transgénicas huCD3 a aproximadamente 50 % del nivel de ratones BALB/c.

Luego, las células T transgénicas huCD3 se analizaron por su capacidad de matar células objetivo de CT26 que expresan HER2 *in vitro.* En este estudio, las células T fueron extraídas de bazos de ratones transgénicos huCD3, ratones BALB/c huCD3 o de sangre periférica proveniente de donantes humanos sanos. *La actividad de matar* in vitro de las células CT26-HER2 se probó con TDB HER2 específico de CD3 humano (UCHT1v9/hu4D5) en la Figura 102A o TDB HER2 específico del ratón (2C11/hu4D5) en la Figura 102B. Las células T efectoras se agregaron en una proporción de 20:1 a las células objetivo en presencia de TDB HER2 diseñado durante 40 horas. *La citotoxicidad* in vitro se controló mediante citometría de flujo. Si bien la actividad de eliminación de las células T esplénicas del ratón (EC50 = 2,4 ng/ml) fue inferior de manera coherente en comparación con las células T periféricas humanas (EC50 = 0,4 ng/ml), las células T transgénicas huCD3 eliminaron las células diana que expresan HER2 humano *in vitro* como se observa en la Figura 102A. El TDB HER2 específico del ratón (2C11/hu4D5) indujo matar las células objetivos mediante células T provenientes de ratones transgénicos huCD3 (EC50 = 11 ng/ml) y BALB/c (EC50 = 10 ng/ml) como se observa en la Figura 102B.

La dependencia de las células T de la actividad antitumoral de TDB HER2 además se analizó en un modelo tumoral singénico. Como se describe anteriormente, las células CT26-HER2 1x105 se inyectaron en ratones BALB/c. Los ratones con tumores establecidos se dividieron en uno de los siguientes dos grupos: Grupo 1: Vehículo (n=10); Grupo 2: TDB HER2 (SP34/hu4D5) (TDB HER2 (SP34/hu4D5), 0,5 mg/kg, qwx3, IV, n=10). La figura 103 muestra que la actividad de TDB HER2 dependía de las células T, dado que el TDB HER2 no tuvo efecto alguno en ratones transgénicos sin huCD3. El presente estudio demostró ratones transgénicos huCD3 que se pueden utilizar como modelo de eficacia novedosa para las moléculas objetivo de huCD3.

Ejemplo 6. Generación y caracterización de los TDB de CD3/LYPD1 ejemplares.

Además, exploramos la capacidad de anticuerpos de TDB para identificar las actividades citotóxicas de las células T en extirpar las células tumorales mediante el reconocimiento de un antígeno de superficie celular diferente, LYPD1. Para ello, generamos y caracterizamos anticuerpos anti-CD3 que tienen un brazo anti-CD3 y un brazo anti-LYPD1 (TDB de LYPD1). Como se describió anteriormente, los TBD de LYPD1 se produjeron como anticuerpos de longitud completa en el formato de botón en ojal (knob-into-hole) como IgG1 humana, como se describió previamente (Atwell et ál. *J. Mol. Biol.* 270: 26-35, 1997). La mitad de los anticuerpos se expresaron en *E. coli* o en células de ovarios de hámster chino (CHO), purificados por cromatografía de afinidad de proteínas A, y los pares adecuados de anticuerpos medios se hibridaron *in vitro* como se describió anteriormente (Spiess y otros. *Nat. Biotechnol.* 2013). Si la producción de anticuerpos TDB se llevó a cabo en células CHO, el anticuerpo incluyó una mutación de glicosilación, por ejemplo, en el residuo N297 (p. ej., N297G), de manera tal que el anticuerpo TDB era una variante sin efector e incapaz de iniciar citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés). Luego de la hibridación, los TBD LYPD1 se purificaron mediante cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC, por sus siglas en inglés) y se caracterizaron por filtración analítica en gel, espectrometría de masas y electroforesis en gel de poliacrilamida, como se describió anteriormente. Un grupo anti-LYPD1 utilizado en la generación de los TDB LYPD1 fue el del anticuerpo anti-LYPD1 YWO.49.H6, que comprende: (a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos con N.° de ID de SEC.: 272 y (b) un dominio de VL que consiste en una secuencia de aminoácidos con N.º de ID de SEC.: 273. Los brazos anti-CD3 probados en la generación de los TDB LYPD1 incluían UCHT1v9, 40G5, SP34, y 38E4v1

Los TDB HER2 específicos se examinaron para la unión de células CD8+ T (unión CD3), así como la actividad, según lo evaluado por ensayos de toxicidad *in vitro* y ensayos de activación de células T.

A. Afinidad de unión

Las afinidades de unión para cada uno de los TDB LYPD1 se examinaron mediante análisis FACS, como se describió anteriormente para los TDB CD20. Brevemente, para ensayos de unión FACS, se incubaron células T CD8+ T con distintas concentraciones de anticuerpos de TDB LYPD1 a 4 °C durante 30 minutos, luego las células se lavaron e incubaron con el segundo anticuerpo (anti-huIgG-PE, BD Bioscience; o anti-huIgG-AlexaFluor647, Southern Biotech) durante otros 15 minutos, antes de que las células se lavaran nuevamente y estuvieran listas para el análisis FACS. La figura 104 muestra los resultados de ensayos de unión FACS *in vitro* de TDB LYPD1. Los estudios de unión mostraron que los TDB LYPD1 que tienen UCHT1v9 o 38E4v1 como su brazo anti-CD3 demostraron una afinidad de unión más elevada para las células efectoras resultantes.

B. Ensayos in vitro sobre la muerte de células OVCAR3.Luc y la activación de células T

Los TDB LYPD1 también se probaron para determinar su capacidad para soportar la eliminación de las células diana OVCAR3 que expresan LYPD1 y la activación del efecto citotóxico de las células T. *La citotoxicidad* in vitro se controló mediante citometría de flujo. Las células dianas se marcaron con CFSE de acuerdo con el protocolo del fabricante (Invitrogen, # C34554). Las células diana marcadas con el éster de succinimidilo de carboxifluoresceína (CFSE) y las células T de CD8+ purificadas de PBMC humanos se mezclaron en una proporción 3:1, con o sin TDB durante 48 horas. Las células se resuspendieron en un volumen igual de PBS + 2% FBS + 1 mM EDTA + yoduro de propidio (PI). El análisis de citometría de flujo se realizó en un FACSCalibur en formato de automatización. El número de células diana vivas se contó mediante la apertura o cierre de las células negativas CFSE+/PI. El porcentaje de citotoxicidad se calculó de la siguiente manera: % de citotoxicidad (número de células diana vivas sin TDB, número de células diana vivas c/TDB) / (número de células diana vivas sin TDB) x 100. Como se representa en la Figura 105, los TDB LYPD1 con UCHT1v9, 38E4v1, o SP34 para su brazo anti-CD3 mostraron una eliminación de células diana OVCAR3.Luc *in vitro* en comparación con el TDB LYPD1 que tiene 40G5 como su brazo anti-CD3.

Cuando se prueba para los ensayos de activación de las células T, la Figura 106 muestra que los TDB LYPD1 con 38E4v1, en menor medida, UCHT1v9 y SP34, para su brazo anti-CD3 eran capaces de inducir fuertemente la actividad de las células T *in vitro*, en comparación con el TDB LYPD1 que tiene 40G5c como su brazo anti-CD3. En estos ensayos, las células diana y las células T CD8+ purificadas se mezclaron en presencia o ausencia de TDB y se analizó la activación de las células T mediante la citometría de flujo. Al final de la incubación, las células se tiñeron con CD8-FITC (BD Bioscience, 555634) CD69-PE (BD Bioscience, 555531) y CD107a-Alexa-Fluor647 (eBioscience, 51-1079). Opcionalmente, después de que la superficie se tiñó con CD8-FITC y CD69-PE, las células se fijaron y se permeabilizaron con una solución de Cytofix/Cytoperm (BD Bioscience, 554722) y se tiñeron de forma intracelular con anti-granzima B-Alexa-Fluor647 (BD Bioscience, 560212). La activación de las células T se evaluó mediante el porcentaje de las células CD8+CD69+ y CD8+CD25+.

Otras modalidades

Si bien la invención antes mencionada se ha descrito con detalle mediante la ilustración y ejemplo a efectos de mayor esclarecimiento, las descripciones y ejemplos no se deben interpretar como limitación del alcance de la invención. Las descripciones de toda la patente y la bibliografía científica citada en la presente descripción se incorporan expresamente en su integridad como referencia.