

Señor

Director de la Dirección de Nuevas Creaciones

Superintendencia de Industria y Comercio

Ministerio de Comercio, Industria y Turismo

E. S. D.

Re.: Expediente **No. NC2019/0013716**

Solicitud de Patente PCT entrada en Fase Nacional, para: “ **ANTICUERPOS ANTI-CD3, ANTICUERPOS ANTI-CD123 Y ANTICUERPOS BIESPECÍFICOS QUE SE UNEN ESPECÍFICAMENTE A CD3 Y/O CD123**”

Solicitantes: **SANOFI**

RESPUESTA A REQUERIMIENTO SOLICITUD DIVISIONAL ART. 17 DEL CPACA

Yo, **MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO**, mayor de edad, identificada y domiciliada como aparece al pie de mi firma, obrando en mi calidad de apoderada de la sociedad solicitante del asunto citado en la referencia, en atención a su oficio **No. 13830** notificado en diciembre 20 de 2019 y para el cual se solicitó prórroga, me permito dar respuesta al mismo de la siguiente manera:

1. Solicitud de divisionales

De acuerdo con el Examinador, como resultado del análisis de la solicitud de divisional del expediente de la referencia, la descripción no está acorde con la división realizada de la materia porque está constituida por la totalidad de la materia del capítulo descriptivo de la solicitud parental. Por lo tanto, el Examinador sugiere limitar la descripción de la divisional a la materia que ésta reclama eliminando la referencia a anticuerpos que no sean biespecíficos de unión CD3 y CD123, es decir eliminar la mención a los anticuerpos denominados 4B4, 2F8, 3E3, 9B8, 9D7, 9F6, 2B8, 6B10, 9B8, 9D7, 9F6, 3B10, 20G6 y 7G3.

2. Modificación de la descripción

De acuerdo con lo establecido en el Artículo 34 de la Decisión 486 y en vista de las observaciones realizadas por el examinador, se presenta en esta oportunidad un nuevo pliego descriptivo.

Específicamente, conforme a las observaciones del Examinador, se pone de presente que se ha modificado el pliego descriptivo teniendo en cuenta que las reivindicaciones de la solicitud de la referencia están dirigidas a proteínas de unión similares a anticuerpos que se unen específicamente a CD3ε y al menos a un antígeno adicional que es CD123, en donde las proteínas de unión similares a anticuerpos comprenden dos cadenas de

polipéptidos que forman dos sitios de unión a antígeno, y en donde las proteínas de unión similares a anticuerpos tienen la estructura recitada en las reivindicaciones. Las reivindicaciones de la solicitud original (Solicitud de Patente Colombiana N° NC2017 / 0008462), en cambio, están dirigidas a anticuerpos anti-CD3.

Así entonces, se ha eliminado en el nuevo pliego descriptivo de la presente solicitud divisional la descripción de ciertos anticuerpos CD3 que no comparten secuencias en común con las proteínas de unión biespecífica reivindicada de anticuerpos CD3ε / CD123 de la solicitud divisional.

En particular, se han eliminado los siguientes párrafos:

- “e) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 30, CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 31, CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 32 y un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 34, CDR2-L de secuencia ‘RDD’ y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 35; o”
- “j) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 50, CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 51, CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 52 y un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 54, CDR2-L de secuencia ‘NAN’ y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 55; o”
- “t) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 90, CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 91, CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 32 y un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 93, CDR2-L de secuencia ‘GAS’ y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 94; o”
- “u) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 96, CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 97, CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 98 y un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 100, CDR2-L de secuencia ‘NTN’ y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 101; o”
- “y) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 116, CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 117, CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 118 y un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 100, CDR2-L de secuencia ‘VTN’ y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 120; o”
- “z) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 122, CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 123, CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 124 y un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 126, CDR2-L de secuencia ‘RDD’ y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 127; o”
- “o bb) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 103, CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 104, CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 105; y un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 133, CDR2-L de secuencia ‘LVS’ y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 134”.

3. Conclusión

Teniendo en cuenta las modificaciones introducidas en esta oportunidad y los argumentos que se presentan, es posible establecer que las objeciones formuladas a la descripción inicialmente presentada para la presente solicitud, se deben tener por superadas.

4. Anexos

- Nuevo pliego descriptivo

Señor Director,



Margarita Castellanos Abondano

C.C. No. **39.779.654** de Bogotá

T.P.A. No. **70.819** del C.S.J.

Calle 117 No. 5A-35 - Bogotá, D.C.

Teléfono: 7560770

Bogotá, D.C.

MCA/mg

P5338

Anticuerpos anti-CD3, anticuerpos anti-CD123 y anticuerpos biespecíficos que se unen específicamente a CD3 y/o CD123

La presente invención se refiere a una proteína de unión semejante a anticuerpo
5 que se une específicamente a CD3 y que se une específicamente al menos a un
antígeno adicional, por ejemplo CD123. La invención se refiere además a anticuerpos
anti-CD3 y anticuerpos anti-CD123. La presente invención también se refiere a una
proteína de unión semejante a anticuerpo que se une específicamente a CD123 y que
se une específicamente al menos a un antígeno adicional. La invención también se
10 refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden la proteína de unión semejante
a anticuerpo, anticuerpos anti-CD3 o anticuerpos anti-CD123 de la invención, y a su uso
para tratar cáncer. La invención se refiere además a ácidos nucleicos aislados, vectores
y células huésped que comprenden una secuencia que codifica dicha proteína de unión
semejante a anticuerpo, anticuerpo anti-CD3 o anti-CD123 y al uso de dicho anticuerpo
15 anti-CD123 como herramienta de diagnóstico.

La primera generación de anticuerpos biespecíficos se desarrolló hace más de
20 años. Desde entonces, varios estudios clínicos han ensayado anticuerpos
biespecíficos preparados por ingeniería para tomar como diana antígenos de superficie
20 de las células del cáncer. Este grupo de proteínas de fusión anti-cáncer contiene dos o
más dominios funcionales que localizan las células efectoras inmunológicas en la
proximidad de células de cáncer diana para conseguir actividad anti-cáncer.

Al desarrollarse la tecnología de anticuerpos biespecíficos, se generó un grupo
diferente de proteínas de fusión denominadas conectoras de células T biespecíficas
25 (BiTE) poniendo en contacto dos regiones variables de anticuerpo de cadena única
(scFv) solas (no se incluyeron segmentos de aminoácidos de Fc) con un conector
flexible, una scFv se une a células diana y la otra se une a CD3 en la superficie de las
células T. Una BiTE, blinatumomab, con actividades de unión bi-específicas CD19xCD3
mostró resultados prometedores en ensayos clínicos de Fase II para pacientes con
30 enfermedad residual mínima en linfoblástica aguda de linaje B.

CD123 (la cadena alfa del receptor de interleuquina-3 IL-3R α) es un antígeno
tumoral sobre-expresado en una variedad de neoplasmas hematológicos. La mayoría
de blastos de AML expresa CD123 superficial y esta expresión no varía por subtipo de

AML. Se ha reportado que la mayor expresión de CD123 en AML en el diagnóstico está asociada con un peor pronóstico. Se ha reportado que CD123 se expresa en células madre leucémicas (LSC). Existe una evidencia creciente que sugiere que AML surge a partir de estas células madre leucémicas (LSC) que han mostrado ser quiescentes y relativamente resistentes a quimioterapia dañina para el ADN.

La expresión incrementada de CD123 en las LSC comparada con células madre hematopoyéticas (HSC) presenta así una oportunidad para el direccionamiento terapéutico de AML-LSC.

El anticuerpo monoclonal (MAb) 7G3, generado frente a CD123, se ha mostrado previamente que inhibe la proliferación y activación mediadas por IL-3 tanto de líneas celulares leucémicas como células primarias (Patente US No. 6.177.078). Sin embargo, ha permanecido sin aclarar si el direccionamiento sobre CD123 puede afectar funcionalmente a las AML-LSC.

El uso de proteína de unión semejante anticuerpo CD123xCD3 da lugar a la muerte de células tumorales, como los inventores muestran en la presente memoria.

La idea de producir una proteína de unión semejante a anticuerpo biespecífica con actividades de unión bi-específicas CD123xCD3 ya se ha propuesto y descrito en la solicitud de patente internacional WO2013/173820.

Además, una Molécula Basada en Anticuerpo Bi-Específico con Re-Direccionamiento de Afinidad Dual (DART) CD123 x CD3 de MacroGenics entró en estudios clínicos de fase I en 2014.

Sin embargo, como se muestra por los inventores, la Molécula Basada en Anticuerpo Bi-Específico con Re-Direccionamiento de Afinidad Dual (DART) CD123xCD3 de MacroGenics, por ejemplo, tiene una activación de 82% de células T que expresan CD4+ y 83% de células T que expresan CD8+ en ausencia de células diana. La activación inapropiada de células T puede dar lugar a efectos secundarios graves, tales como el síndrome de liberación de citoquinas. El síndrome de liberación de citoquinas se refiere a la liberación de citoquinas por las células T activadas produciendo un tipo de respuesta inflamatoria sistémica similar a la encontrada en infecciones graves y caracterizada por hipotensión, pirexia y rigidez. Las muertes debidas al síndrome de liberación de citoquinas se han reportado por ejemplo para OKT3.

Por lo tanto, a pesar de estos avances en la tecnología de anticuerpos biespecíficos, permanece una necesidad de terapéuticos del cáncer adicionales, particularmente

aquellos que tomen como diana y maten eficazmente a las células del cáncer, bien directamente o indirectamente.

Los inventores han tenido éxito en generar, cribar y seleccionar anticuerpos anti-CD3 específicos de rata que presentan una alta afinidad para la proteína CD3 tanto humana como de *Macaca fascicularis*.

Los inventores desarrollaron proteínas de unión semejantes a anticuerpo que tienen especificidad biológica e inmunológica para el antígeno CD3 y al menos un antígeno diana adicional. En un ejemplo, para demostrar el uso de estos anticuerpos anti-CD3 en la generación de proteínas de unión semejantes a anticuerpo biespecíficas los inventores generaron proteínas de unión semejantes a anticuerpo anti-CD3/anti-CD123 y demostraron el uso terapéutico de éstas. Estas proteínas de unión semejantes a anticuerpo biespecíficas anti-CD3/anti-CD123 tienen una baja activación de células T, como se ha observado para el anticuerpo anti-CD3 solo. Sin embargo, una vez que las células diana que expresan CD123, tales como células THP-1, están presentes, la proteína de unión semejante a anticuerpo biespecífica anti-CD3/anti-CD123 muestra una alta activación de células T. De acuerdo con esto, el anticuerpo anti-CD3 de la invención definido anteriormente es particularmente útil para la preparación de proteínas de unión semejantes a anticuerpo de la invención.

Definiciones

A lo largo de la presente solicitud, el término “y/o” es una conjunción gramatical que debe interpretarse como que engloba que pueden ocurrir uno o más de los casos que conecta. Por ejemplo, la expresión "dichas proteínas de secuencia nativa pueden prepararse usando métodos estándar recombinantes y/o sintéticos" indica que las proteínas de secuencia nativa pueden prepararse usando métodos estándar recombinantes y sintéticos o las proteínas de secuencia nativa pueden prepararse usando métodos estándar recombinantes o las proteínas de secuencia nativa pueden prepararse usando métodos sintéticos.

Además, a lo largo de la presente solicitud, el término “que comprende” debe interpretarse como que engloba todas las características mencionadas específicamente así como las opcionales, adicionales, no especificadas. Tal y como se usa en la presente memoria, el uso del término “que comprende” también describe la realización en la que no están presentes características aparte de las características mencionadas específicamente (es decir, “que consiste en”). Además, el artículo indefinido "un" o "una"

no excluye una pluralidad. El mero hecho de que determinadas medidas se reciten en diferentes reivindicaciones mutuamente dependientes no indica que una combinación de estas medidas no pueda usarse para conseguir una ventaja.

El término "gen" significa una secuencia de ADN que codifica, o corresponde a, una secuencia particular de aminoácidos que comprende todo o parte de una o más proteínas o enzimas, y puede o no incluir secuencias reguladoras de ADN, tales como secuencias promotoras, que determinan por ejemplo las condiciones bajo las que se expresa el gen. Algunos genes, que no son genes estructurales, pueden transcribirse a partir de ADN en ARN, pero no se traducen en una secuencia de aminoácidos. Otros genes pueden funcionar como reguladores de genes estructurales o como reguladores de la transcripción del ADN. En particular, el término gen puede pretenderse para la secuencia genómica que codifica una proteína, es decir, una secuencia que comprende secuencias reguladoras, promotoras, de intrones y exones.

Una secuencia "al menos 85% idéntica a una secuencia de referencia" es una secuencia que tiene, en su longitud completa, 85%, o más, en particular 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% de identidad de secuencia, con la longitud completa de la secuencia de referencia.

En el contexto de la presente solicitud, el "porcentaje de identidad" se calcula usando un alineamiento por pares global (es decir, las dos secuencias se comparan sobre su longitud completa). Los métodos para comparar la identidad de dos o más secuencias son muy conocidos en la técnica. Puede usarse, por ejemplo, el programa «needle», que usa el algoritmo de alineamiento global de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970 J. Mol. Biol. 48:443-453) para encontrar el alineamiento óptimo (incluyendo huecos) de dos secuencias cuando se considera su longitud completa. El programa needle está disponible por ejemplo en el sitio de Internet ebi.ac.uk. El porcentaje de identidad entre dos polipéptidos, según la invención, se calcula usando el programa EMBOSS: needle (global) con un parámetro de "Apertura de Hueco" igual a 10.0, un parámetro de "Extensión de Hueco" igual a 0.5, y una matriz Blosum62.

Las proteínas que consisten en una secuencia de aminoácidos "al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% idéntica" a una secuencia de referencia pueden comprender mutaciones tales como deleciones, inserciones y/o sustituciones comparada con la secuencia de referencia. En el caso de las sustituciones, la proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%,

97%, 98% ó 99% idéntica a una secuencia de referencia puede corresponder a una secuencia homóloga derivada de otra especie que la secuencia de referencia.

- Las “sustituciones de aminoácidos” pueden ser conservativas o no conservativas. Preferiblemente, las sustituciones son sustituciones conservativas, en las que un aminoácido se sustituye por otro aminoácido con propiedades estructurales y/o químicas similares. La sustitución corresponde preferiblemente a una sustitución conservativa como se indica en la tabla siguiente.

Sustituciones conservativas	Tipo de Aminoácido
Ala, Val, Leu, Ile, Met, Pro, Phe, Trp	Aminoácidos con cadenas laterales alifáticas hidrofóbicas
Ser, Tyr, Asn, Gln, Cys	Aminoácidos con cadenas laterales no cargadas pero polares
Asp, Glu	Aminoácidos con cadenas laterales ácidas
Lys, Arg, His	Aminoácidos con cadenas laterales básicas
Gly	Cadena lateral neutra

- Un “anticuerpo” también denominado “inmunoglobulina” puede ser un anticuerpo natural o convencional en el que dos cadenas pesadas están unidas entre sí por enlaces disulfuro y cada cadena pesada está unida a una cadena ligera por un enlace disulfuro. Hay dos tipos de cadena ligera, lambda (l) y kappa (k). Hay cinco clases (o isotipos) principales de cadena pesada que determinan la actividad funcional de una molécula de anticuerpo: IgM, IgD, IgG, IgA e IgE. Cada cadena contiene distintos dominios de secuencia. La cadena ligera incluye dos dominios o regiones, un dominio variable (VL) y un dominio constante (CL). La cadena pesada incluye cuatro dominios, un dominio variable (VH) y tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3, referidos colectivamente como CH). Las regiones variables tanto de las cadenas ligera (VL) como pesada (VH) determinan el reconocimiento y especificidad de la unión al antígeno. Los dominios de región constante de las cadenas ligera (CL) y pesada (CH) confieren importantes propiedades biológicas tales como asociación de cadenas de anticuerpo, secreción, movilidad trans-placentaria, unión al complemento, y unión a receptores Fc (FcR). El fragmento Fv es la parte N-terminal del fragmento Fab de una inmunoglobulina y consiste en las partes variables de una cadena ligera y una cadena pesada. La especificidad del anticuerpo reside en la complementariedad estructural entre el sitio de

combinación del anticuerpo y el determinante antigénico. Los sitios de combinación del anticuerpo están compuestos por residuos que son principalmente de las regiones hipervariables o determinantes de la complementariedad (CDR). Ocasionalmente, los residuos de regiones no hipervariables o marco (FR) influyen en la estructura global del dominio y por lo tanto el sitio de combinación. Las Regiones Determinantes de la Complementariedad o CDR se refieren a secuencias de aminoácidos que conjuntamente definen la afinidad y especificidad de unión de la región Fv natural de un sitio de unión de inmunoglobulina nativo. Las cadenas ligera y pesada de una inmunoglobulina tienen cada una tres CDR, designadas CDR1-L, CDR2-L, CDR3-L y CDR1-H, CDR2-H, CDR3-H, respectivamente. Un sitio de unión a antígeno de un anticuerpo convencional, por lo tanto, incluye seis CDR, que comprenden el conjunto de CDR de cada una de una región V de cadena pesada y de cadena ligera.

En el contexto de la invención, el anticuerpo o inmunoglobulina es una IgM, IgD, IgG, IgA e IgE.

“Regiones Marco” (FR) se refieren a secuencias de aminoácidos interpuestas entre las CDR, es decir, aquellas partes de las regiones variables de cadena ligera y pesada de las inmunoglobulinas que están relativamente conservadas entre diferentes inmunoglobulinas en una única especie. Las cadenas ligera y pesada de una inmunoglobulina tienen cada una cuatro FR, designadas FR1-L, FR2-L, FR3-L, FR4-L, y FR1-H, FR2-H, FR3-H, FR4-H, respectivamente. De acuerdo con esto, el dominio variable de cadena ligera puede designarse así como (FR1-L)-(CDR1-L)-(FR2-L)-(CDR2-L)-(FR3-L)-(CDR3-L)-(FR4-L) y el dominio variable de cadena pesada puede designarse así como (FR1-H)-(CDR1-H)-(FR2-H)-(CDR2-H)-(FR3-H)-(CDR3-H)-(FR4-H).

Conociendo la secuencia de aminoácidos de las CDR, un experto en la técnica puede determinar fácilmente las regiones marco FR1-L, FR2-L, FR3-L, FR4-L y/o FR1-H, FR2-H, FR3-H, FR4-H.

Tal y como se usa en la presente memoria, una “región marco humana” es una región marco que es sustancialmente idéntica (aproximadamente 85%, o más, en particular 90%, 95%, 97%, 99% ó 100%) a la región marco de un anticuerpo humano natural.

En el contexto de la invención, la definición de CDR/FR e una cadena ligera o pesada de una inmunoglobulina debe determinarse tomando como base la definición IMGT (Lefranc et al. Dev. Comp. Immunol., 2003, 27(1):55-77; www.imgt.org).

Tal y como se usa en la presente memoria, el término “anticuerpo” denota anticuerpos convencionales y fragmentos de éstos, así como anticuerpos de dominio único y fragmentos de éstos, en particular cadena pesada variable de anticuerpos de dominio único, y anticuerpos quiméricos, humanizados, biespecíficos o multiespecíficos.

5 Tal y como se usa en la presente memoria, anticuerpo o inmunoglobulina también incluye “anticuerpos de dominio único” que se han descrito más recientemente y que son anticuerpos cuyas regiones determinantes de la complementariedad son parte de un polipéptido de dominio único. Los ejemplos de anticuerpos de dominio único incluyen anticuerpos de cadena pesada, anticuerpos desprovistos naturalmente de cadenas
10 ligeras, anticuerpos de dominio único derivados de anticuerpos de cuatro cadenas convencionales, anticuerpos de dominio único preparados por ingeniería. Los anticuerpos de dominio único pueden derivar de cualquier especie incluyendo, pero no limitado a, ratón, ser humano, camello, llama, cabra, conejo, bovino. Los anticuerpos de dominio único pueden ser anticuerpos de dominio único naturales conocidos como
15 anticuerpo de cadena pesada desprovisto de cadenas ligeras. En particular, las especies de *Camelidae*, por ejemplo, camello, dromedario, llama, alpaca y guanaco, producen anticuerpos de cadena pesada desprovistos de forma natural de cadena ligera. Los anticuerpos de cadena pesada de camélidos también carecen del dominio CH1.

20 La cadena pesada variable de estos anticuerpos de dominio único desprovistos de cadenas ligeras se conoce en la técnica como “VHH” o “nanocuerpo”. De manera similar a los dominios VH convencionales, las VHH contienen cuatro FR y tres CDR. Los nanocuerpos tienen ventajas sobre los anticuerpos convencionales: son aproximadamente diez veces más pequeños que las moléculas de IgG, y como
25 consecuencia pueden producirse nanocuerpos funcionales plegados apropiadamente por expresión in vitro mientras se consigue un rendimiento alto. Además, los nanocuerpos son muy estables, y resistentes a la acción de proteasas. Las propiedades y producción de nanocuerpos se han revisado por Harmsen y De Haard HJ (Appl. Microbiol. Biotechnol. 2007 Nov;77(1):13-22).

30 El término “anticuerpo monoclonal” o “mAb” tal y como se usa en la presente memoria se refiere a una molécula de anticuerpo de una única composición de aminoácidos que está dirigida contra un antígeno específico, y no debe considerarse como que requiere la producción del anticuerpo por ningún método particular. Un

anticuerpo monoclonal puede producirse por un único clon de células B o hibridoma, pero también puede ser recombinante, es decir, producido por ingeniería de proteínas.

El término "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo preparado por ingeniería que en su sentido más amplio contiene una o más regiones de un anticuerpo y una o más regiones de uno o más anticuerpos distintos. En particular, un anticuerpo quimérico comprende un dominio VH y un dominio VL de un anticuerpo derivado de un animal no humano, en asociación con un dominio CH y un dominio CL de otro anticuerpo, en particular un anticuerpo humano. Como el animal no humano, puede usarse cualquier animal tal como ratón, rata, hámster, conejo o semejantes. Un anticuerpo quimérico también puede indicar un anticuerpo multiespecífico que tiene especificidad para al menos dos antígenos diferentes.

El término "anticuerpo humanizado" se refiere a un anticuerpo que es totalmente o parcialmente de origen no humano y que se ha modificado para reemplazar determinados aminoácidos, en particular en las regiones marco de las cadenas pesada y ligera, con el fin de evitar o minimizar una respuesta inmune en los seres humanos. Los dominios constantes de un anticuerpo humanizado son la mayor parte de las veces dominios CH y CL humanos.

En la técnica se conocen numerosos métodos para la humanización de una secuencia de anticuerpo, véase, por ejemplo, la revisión por Almagro y Fransson (2008) Front Biosci. 13: 1619-1633. Un método usado comúnmente es injerto de CDR, o remodelación de anticuerpo, que implica el injerto de las secuencias de CDR de un anticuerpo donante, generalmente un anticuerpo de ratón, en el soporte marco de un anticuerpo humano de especificidad diferente. Como el injerto de CDR puede reducir la especificidad y afinidad de la unión, y así la actividad biológica, de un anticuerpo no humano injertado con CDR, pueden introducirse retromutaciones en posiciones seleccionadas del anticuerpo injertado con CDR con el fin de retener la especificidad y afinidad de la unión del anticuerpo parental. La identificación de posiciones para posibles retromutaciones puede realizarse usando la información disponible en la bibliografía y en bases de datos de anticuerpos. Los residuos de aminoácidos que son candidatos para retromutaciones son típicamente aquellos que están localizados en la superficie de una molécula de anticuerpo, mientras los residuos que están enterrados o que tienen un grado bajo de exposición en la superficie no se alterarán normalmente. Una técnica de humanización alternativa al injerto de CDR y retromutación es modificación en superficie, en la que los residuos no expuestos en la superficie de

origen no humano se retienen, mientras los residuos de superficie se alteran a residuos humanos. Otra técnica alternativa es conocida como “selección guiada” (Jespers et al. (1994) *Biotechnology* 12, 899) y puede usarse para derivar de por ejemplo un anticuerpo murino o de rata un anticuerpo totalmente humano que conserva el epítipo y características de unión del anticuerpo parental. Un método adicional de humanización es la denominada humanización 4D. El protocolo de humanización 4D se describe en la solicitud de patente US20110027266 A1 (WO2009032661A1) y se ejemplifica en lo siguiente aplicando la humanización 4D para humanizar los dominios variables ligero (VL) y pesado (VH) de anticuerpo de rata. En un ejemplo, se hizo un modelo de homología de anticuerpo de rata típicamente con software MOE (v. 2011.10- Chemical Computing Group, Quebec, Canadá) usando estructuras PDB (Berman et al., *Nucleic Acids Research*, 2000, 28:235-242) como moldes y se minimizó posteriormente respecto a la energía usando los procedimientos estándar implementados en MOE. Se realizó una simulación de dinámica molecular (MD) en el modelo de homología 3D minimizado (hecho con software MOE) de anticuerpo de rata y se comparó, por ejemplo, con 49 modelos humanos derivados de las siete cadenas ligeras representativas (vk1, vk2, vk3, vk4, vlambd1, vlambd2, vlambd3) y las siete cadenas pesadas representativas (vh1a, vh1b, vh2, vh3, vh4, vh5, vh6) diseñadas por LGCR/SDI y disponibles en MOE. Por ejemplo, un modelo de pareja de cadenas (V_{kx}-V_{hx}) con los mejores componentes hidrofóbicos, electroestáticos e identidad de secuencia fuera de las CDR se ha seleccionado para la “humanización 4D”. Para la asociación por pares entre el dominio variable de anticuerpo de rata y el modelo seleccionado, las secuencias se alinearon tomando como base típicamente la superposición 3D óptima de los carbonos alfa de los modelos de homología correspondientes. Los restos no deseados se consideraron y mutaron. Finalmente, las secuencias humanizadas resultantes se sometieron a blast para similitud de secuencia, por ejemplo, frente a la base de datos IEDB (<http://www.immuneepitope.org>; versión 2012/01/30 accesible localmente) para asegurar que ninguna de las secuencias contiene ningún epítipo conocido de célula B o T listado.

Para los anticuerpos quiméricos, la humanización implica típicamente la modificación de las regiones marco de las secuencias de la región variable.

Los residuos de aminoácidos que son parte de una CDR no se alterarán típicamente en conexión con la humanización, aunque en determinados casos puede ser deseable alterar residuos de aminoácidos individuales de CDR, por ejemplo, para

eliminar un sitio de glicosilación, un sitio de desamidación o un residuo de cisteína no deseado. La glicosilación ligada a N ocurre por la unión de una cadena de oligosacárido a un residuo de asparagina en la secuencia de tripéptido Asn-X-Ser o Asn-X-Thr, en la que X puede ser cualquier aminoácido excepto Pro. La eliminación de un sitio de N-glicosilación puede conseguirse mutando bien la Asn o el residuo Ser/Thr a un residuo diferente, en particular mediante sustitución conservativa. La desamidación de residuos de asparagina y glutamina puede ocurrir dependiendo de factores tales como pH y exposición en superficie. Los residuos de asparagina son particularmente susceptibles a la desamidación, principalmente cuando están presentes en la secuencia Asn-Gly, y en menor grado en otras secuencias de dipéptido tales como Asn-Ala. Cuando dicho sitio de desamidación, en particular Asn-Gly, está presente en una secuencia de CDR, puede por lo tanto ser deseable eliminar el sitio, típicamente por sustitución conservativa para eliminar uno de los residuos implicados. La sustitución en una secuencia de CDR para eliminar uno de los residuos implicados también se pretende que esté englobada por la presente invención.

“Fragmentos” de anticuerpos (convencionales) comprenden una parte de un anticuerpo intacto, en particular la región de unión a antígeno o región variable del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen Fv, Fab, F(ab')₂, Fab', dsFv, (dsFv)₂, scFv, sc(Fv)₂, fragmentos divalentes, anticuerpos biespecíficos y multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. Un fragmento de un anticuerpo convencional también puede ser un anticuerpo de dominio único, tal como anticuerpo de cadena pesada o VHH.

El término “Fab” indica un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de aproximadamente 50.000 y actividad de unión a antígeno, en el que aproximadamente una mitad del lado N-terminal de la cadena H y la cadena L completa, entre los fragmentos obtenidos tratando IgG con una proteasa, papaína, se unen entre sí a través de un enlace disulfuro.

El término “F(ab')₂” se refiere a un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de aproximadamente 100.000 y actividad de unión a antígeno, que es ligeramente mayor que el Fab unido mediante un enlace disulfuro de la región bisagra, entre fragmentos obtenidos tratando IgG con una proteasa, pepsina.

El término “Fab'” se refiere a un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de aproximadamente 50.000 y actividad de unión a antígeno, que se obtiene cortando un enlace disulfuro de la región bisagra del F(ab')₂.

Un polipéptido de cadena única Fv ("scFv") es un heterodímero VH::VL unido covalentemente que se expresa habitualmente a partir de una fusión génica que incluye genes que codifican VH y VL unidos por un conector que codifica péptido. El fragmento scFv humano de la invención incluye las CDR que se mantienen en la conformación apropiada, en particular usando técnicas de recombinación génica. Los fragmentos de anticuerpo divalentes y multivalentes pueden formarse bien espontáneamente por asociación de scFvs monovalentes, o pueden generarse acoplando scFvs monovalentes por un conector peptídico, tal como $sc(Fv)_2$ divalente. "dsFv" es un heterodímero VH::VL estabilizado por un enlace disulfuro. "(dsFv)₂" indica dos dsFv acoplados por un conector peptídico.

El término "anticuerpo biespecífico" o "BsAb" indica típicamente un anticuerpo, que combina los sitios de unión a antígeno de dos anticuerpos en una única molécula. Así, los BsAb son capaces de unirse a dos antígenos diferentes simultáneamente. La ingeniería genética se ha usado con frecuencia creciente para diseñar, modificar, y producir anticuerpos o derivados de anticuerpo con un conjunto deseado de propiedades de unión y funciones efectoras como se describe por ejemplo en EP 2 050 764 A1.

El término "anticuerpo multiespecífico" indica un anticuerpo que combina los sitios de unión a antígeno de dos o más anticuerpos en una única molécula.

El término "fragmentos divalentes" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno, fragmentos que comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado con un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Mediante el uso de un conector que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios se fuerzan a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno.

El término "hibridoma" indica una célula, que se obtiene sometiendo a una célula B preparada mediante inmunización de un mamífero no humano con un antígeno a fusión celular con una célula de mieloma derivada de un ratón o semejante que produce un anticuerpo monoclonal deseado que tiene una especificidad de antígeno.

Por "purificado" y "aislado" se quiere decir, cuando se hace referencia a un polipéptido (es decir, el anticuerpo de la invención) o una secuencia de nucleótidos, que la molécula indicada está presente en la ausencia sustancial de otras macromoléculas biológicas del mismo tipo. El término "purificado" tal y como se usa en la presente

memoria significa en particular que están presentes al menos 75%, 85%, 95%, ó 98% en peso, de macromoléculas biológicas del mismo tipo. Una molécula de ácido nucleico “aislada” que codifica un polipéptido particular se refiere a una molécula de ácido nucleico que carece sustancialmente de otras moléculas de ácido nucleico que no codifican el polipéptido objeto; sin embargo, la molécula puede incluir algunas bases o restos adicionales, que no afectan de manera perjudicial las características básicas de la composición.

El término “antígeno” o “antígeno diana” tal y como se usa en la presente memoria se refiere a una molécula o parte de una molécula que es capaz de ser unida por un anticuerpo o una proteína de unión semejante a anticuerpo. El término se refiere además a una molécula o una parte de una molécula que puede ser usada en un animal para producir anticuerpos que son capaces de unirse a un epítipo de ese antígeno. Un antígeno diana puede tener uno o más epítopos. Respecto a cada antígeno diana reconocido por un anticuerpo o por una proteína de unión semejante a anticuerpo, la proteína de unión semejante a anticuerpo es capaz de competir con un anticuerpo intacto que reconoce el antígeno diana.

“Afinidad” se define, en teoría, por la asociación en equilibrio entre el anticuerpo completo y el antígeno. La afinidad puede expresarse por ejemplo en concentración efectiva mitad de la máxima (CE_{50}) o la constante de disociación en equilibrio (K_D).

“Concentración efectiva mitad de la máxima” también denominada “ CE_{50} ” se refiere a la concentración de un fármaco, anticuerpo o tóxico que induce una respuesta que es la mitad entre la línea basal y la máxima después de un tiempo de exposición especificado. La CE_{50} y la afinidad están inversamente relacionadas, cuanto menor es el valor de CE_{50} mayor es la afinidad del anticuerpo.

“ K_D ” es la constante de disociación en equilibrio, una proporción de k_{dis}/k_{aso} , entre el anticuerpo y su antígeno. K_D y afinidad están inversamente relacionadas. El valor de K_D se refiere a la concentración de anticuerpo y cuando menor es el valor de K_D mayor es la afinidad del anticuerpo. La afinidad puede evaluarse experimentalmente por una variedad de métodos conocidos, tales como medir las proporciones de asociación y disociación con resonancia de plasmón superficial o medir la CE_{50} en un ensayo inmunoquímico (ELISA, FACS). El ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) es un ensayo bioquímico que usa un inmunoensayo enzimático en fase sólida para detectar la presencia de una sustancia, habitualmente un antígeno, en una muestra líquida o muestra húmeda. Los antígenos de la muestra se unen a una superficie.

Después, se aplica un anticuerpo específico sobre la superficie de manera que pueda unirse al antígeno. Este anticuerpo está unido a una enzima, y, en la etapa final, se añade una sustancia que contiene el sustrato de la enzima. La reacción posterior produce una señal detectable, lo más comúnmente un cambio de color en el sustrato.

- 5 La separación celular activada por fluorescencia (FACS) proporciona un método para separar una mezcla heterogénea de células biológicas en dos o más contenedores, una célula cada vez, tomando como base la dispersión de la luz específica y características fluorescentes de cada célula. En estos ensayos, la CE_{50} es la concentración del anticuerpo que induce una respuesta que es la mitad entre la línea base y la máxima
- 10 después de algún tiempo de exposición especificado en una concentración definida de antígeno por ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima) o célula que expresa el antígeno por FACS (Separación Celular Activada por Fluorescencia). La resonancia de plasmón superficial es un método que carece de marcaje en el que la unión de una molécula en la fase soluble (el “analito”) se mide directamente a una molécula “ligando”
- 15 inmovilizada en una superficie sensora. En el dispositivo sensor, la unión del ligando se monitoriza por un fenómeno óptico denominado plasmón superficial. En particular, cuando la molécula de “analito” se disocia de la molécula de “ligando”, se observa una disminución en la señal SPR (expresa en unidades de resonancia, RU). Las velocidades de asociación ('velocidad de asociación', k_a) y de disociación ('velocidad de disociación',
- 20 k_d) se obtienen de la señal obtenida durante la asociación y disociación y a partir de éstas puede calcularse la constante de disociación en equilibrio ('constante de unión', K_D). La señal proporcionada en unidades de resonancia (RU) depende del tamaño del ligando presente en el analito, sin embargo en el caso de que las condiciones experimentales sean las mismas, es decir, el ligando es la misma molécula en la misma
- 25 condición las RU obtenidas pueden indicar afinidad, en la que cuanto mayor es la señal obtenida en RU mayor es la unión.

Un anticuerpo monoclonal que se une al antígeno 1 (Ag1) “reacciona de manera cruzada” con el antígeno 2 (Ag2) cuando las CE_{50} están en un intervalo similar para ambos antígenos. En la presente solicitud, un anticuerpo monoclonal que se une a Ag1

30 reacciona de manera cruzada con Ag2 cuando la proporción de afinidad de Ag2 a afinidad de Ag1 es igual o menor de 10 (en particular 5, 2, 1 ó 0,5), midiéndose las afinidades con el mismo método para ambos antígenos.

Un anticuerpo monoclonal que se une a Ag1 “no reacciona de manera cruzada significativamente” con Ag2 cuando las afinidades son muy diferentes para los dos

antígenos. La afinidad para Ag2 puede no ser mensurable si la respuesta de unión es demasiado baja. En la presente solicitud, un anticuerpo monoclonal que se une a Ag1 no reacciona de manera cruzada significativamente con Ag2, cuando la respuesta de unión del anticuerpo monoclonal para Ag2 es menor de 5% de la respuesta de unión del mismo anticuerpo monoclonal para Ag1 en el mismo entorno experimental y a la misma concentración de anticuerpo. En la práctica, la concentración de anticuerpo usada puede ser la CE₅₀ o la concentración requerida para alcanzar el plató de saturación obtenido con Ag1.

Tal y como se usa en la presente memoria, “especificidad” indica la capacidad de un anticuerpo para discriminar la secuencia de péptido diana a la que se une (“epítipo”) de secuencias de péptidos muy relacionadas, altamente homólogas.

Un anticuerpo monoclonal “se une específicamente” a Ag1 cuando no reacciona de manera cruzada significativamente con Ag2.

Un “dominio” puede ser cualquier región de una proteína, generalmente definido tomando como base homologías de secuencia y relacionado frecuentemente con una entidad estructural o funcional específica.

Una molécula “recombinante” es una que se ha preparado, expresado, creado, o aislado por medios recombinantes.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término “sujeto” indica un mamífero, tal como un roedor, un felino, un canino, y un primate. En particular, un sujeto según la invención es un ser humano.

Anticuerpos anti CD3

“CD3” indica un antígeno que se expresa en células T como parte del complejo del receptor de células T multimolecular y que consiste en al menos tres cadenas diferentes CD3 ϵ , CD3 δ y CD3 γ . CD3 δ y CD3 γ tienen baja identidad y/o similitud de secuencia respecto a CD3 ϵ humano (la similitud e identidad es menor de 20%). CD3 ϵ y CDR3 δ pueden formar conjuntamente un complejo, denominado en la presente memoria “complejo CD3 ϵ / δ ”. CD3 ϵ también forma un complejo con CDR3 γ , el denominado “complejo CD3 ϵ / γ ”. La agrupación de CD3 en células T, por ejemplo, por anticuerpos anti-CD3 inmovilizados, da lugar a una activación de células T similar a la conexión del receptor de células T pero independiente de su especificidad clonal típica. “CD3 ϵ ” comprende tres dominios, un dominio intracelular, un dominio transmembrana y un dominio extracelular.

La mayor parte de los anticuerpos anti-CD3 de la técnica anterior reconocen la cadena CD3 ϵ . Uno de dichos anticuerpos anti-CD3 de la técnica anterior es OKT3. La técnica anterior ha ejemplificado eventos de activación de células T que emplean moléculas de anticuerpo por ejemplo empleando la molécula de anticuerpo OKT3. El anticuerpo anti-CD3 y variante de éste se han descrito en la técnica anterior (US 4.361.549 ; US 4.361 .549 ; US 5.885.573 ; US 5.929.212 ; y WO 98/52975 o US 5.955.358). OKT3 se ha usado adicionalmente como un potente agente inmunosupresor en trasplante clínico para tratar rechazo a aloinjerto (Thistlethwaite 1984, Transplantation 38, 695-701; Woodle 1991, Transplantation 51, 1207-1212; Choi 2001, Eur. J. Immunol. 31(1), 94-106).

Los principales inconvenientes de esta terapia son la activación de células T manifestada en la liberación de citoquinas debida al entrecruzamiento entre células T y células que portan Fc γ R y la respuesta del anticuerpo anti-ratón humano (HAMA). Varias publicaciones han descrito alteraciones tales como humanización de OKT3 para reducir estos efectos secundarios: US 5.929.212; US 5.885.573 y otras. Por otra parte, OKT3 u otros anticuerpos anti-CD3 pueden usarse como agentes inmunopotenciadores para estimular la activación y proliferación de células T (US 6.406.696 Bluestone; US 6.143.297 Bluestone; US 6.113.901 Bluestone; Yannelly 1990, J. Immunol. Meth. 1 , 91-100). Los anticuerpos anti-CD3 también se han descrito como agentes usados en combinación con anticuerpos anti-CD28 para inducir la proliferación de células T (US 6.352.694). OKT3 se ha usado además en sí mismo o como un componente de un anticuerpo biespecífico para dirigir células T citotóxicas a células tumorales o células infectadas por virus (Nitta 1990, Lancet 335, 368-376; Sanna 1995, Bio/Technology 13, 1221-1224; WO 99/54440).

Las estrategias hasta ahora usando anticuerpos como agentes para reclutar células T se han visto dificultades por varios descubrimientos. En primer lugar, los anticuerpos naturales o preparados por ingeniería que tienen una alta afinidad de unión para las células T frecuentemente no activan las células T a las que se unen. En segundo lugar, los anticuerpos naturales o preparados por ingeniería que tienen una baja afinidad de unión para las células T también son frecuentemente ineficaces respecto a su capacidad para desencadenar la lisis celular mediada por las células T.

Una secuencia de referencia de proteína CD3 ϵ humana de longitud completa, incluyendo el péptido señal, está disponible en la base de datos Uniprot con el número

de registro P07766 y se incluye en la presente memoria bajo SEQ ID NO: 1 (según está disponible el 12 de diciembre, 2014).

Una secuencia de referencia de la proteína CD3ε de *Macaca fascicularis* de longitud completa, incluyendo el péptido señal, está disponible en la base de datos Uniprot con el número de registro Q95LI5 y se incluye en la presente memoria bajo SEQ ID NO: 2 (según está disponible el 12 de diciembre, 2014).

Una secuencia de proteínas de fusión CD3ε humana madura Fc etiquetada con His, clonadas por los inventores a partir de ADN genómico, se describe bajo SEQ ID NO: 3. Dicha proteína de fusión CD3ε humana madura Fc etiquetada con His comprende los aminoácidos 23 a 126 de la proteína CD3ε humana de longitud completa y comprende así el dominio extracelular de CD3ε humana.

Una secuencia de proteína de fusión CD3ε de *Macaca fascicularis* madura Fc, clonada por los inventores a partir de ADN genómico, se describe bajo SEQ ID NO: 4. Dicha proteína de fusión CD3ε de *Macaca fascicularis* madura Fc comprende los aminoácidos 23 a 117 de la proteína CD3ε de *Macaca fascicularis* de longitud completa y comprende así el dominio extracelular de CD3ε humana o de *Macaca fascicularis*, que contiene un intercambio Alanina a Valina en la posición de aminoácido 35 en comparación con la posición de aminoácido 57 de la secuencia de tipo salvaje.

La organización de dominios de CD3ε humana y de *Macaca fascicularis* es como sigue (basado en la secuencia de Uniprot P07766 (humana) y secuencia de Uniprot Q95LI5 (de *Macaca fascicularis*)):

Dominios CD3ε	Posiciones en SEQ ID NO :1 (humano)	Posiciones en SEQ ID NO :2 (<i>Macaca fascicularis</i>)
Extracelular	23 – 126	22 - 117
Dominio transmembrana	127 - 152	118 - 138
Citoplásmico	153 - 207	139 - 198

De acuerdo con esto, el dominio extracelular de CD3ε humana consiste en los aminoácidos en las posiciones 23–126 de SEQ ID NO: 1 y el dominio extracelular de CD3ε de *Macaca fascicularis* consiste en los aminoácidos en las posiciones 22 – 117 de SEQ ID NO: 2.

Los inventores han tenido éxito en la generación, cribado y selección de anticuerpos específicos anti-CD3 de ratón y rata. Estos anticuerpos anti-CD3 presentan una alta afinidad para la proteína CD3 tanto humana como de *Macaca fascicularis*, y tienen sin embargo una baja activación de células T en ausencia de células diana.

5

Los inventores han determinado la secuencia de cadenas pesadas y ligeras variables de dichos anticuerpos monoclonales, los anticuerpos anti-CD3 denominados “20G6-F3”, “4B4-D7”, “4E7-C9”, “18F5-H10”, “12D2-E5”, “11D7-C3”, “11H3-E5”, “13H2-C2”, “13C1-F6”, “18H11-F10”, “1E6-C9”, “10F4-C10”, “10E6-G6”, “18G9-H11”, “11F3-B9”, “12G3-E8”, “5B1-G2”, “16F8-A7”, “11F9-F8”, “3G5-E10”, “9D7-F3”, “8C2-F7”, “20E5-F10”, “20B5-F10”, “6C9-C9”, “3E8-G1”, “3H6-D2” y “8H2”.

10

El anticuerpo anti-CD3 denominado “20G6-F3” comprende:

- un dominio variable de cadena pesada que consiste en la secuencia

15 EVQLVETGGSLVQPGKSLKLTCA**TS****GFTFTKAW**MHWVRQSPEKQLEWVAQ**I****KDKSNSY**
ATYYAESVKGRFTISRDDSKSTIYLQMNSLKEEDTAIYYC**RGVYYALSPFDY**WGQGMV
TVSS (SEQ ID NO: 5, con las CDR mostradas en caracteres en negrita y subrayadas)
que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 6, una CDR2-H de secuencia SEQ ID
NO: 7, y una CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 8, y

20 - un dominio variable de cadena ligera que consiste en la secuencia
DVVMTQTPVSLSVSLGGQVSISCRSS**QSLVHNNGNTY**LSWYLQKPGQSPQSLIY**KVS**NR
FSGFSDRFSGSGSGTDFTLKISRVPDDLGVYYC**GOGTOYPFT**FGSGTKLEIK (SEQ ID
NO: 9, con las CDR mostradas en caracteres en negrita y subrayadas) que comprende
CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 10, una CDR2-L que consiste en la secuencia ‘KVS’,
25 y una CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 11.

El anticuerpo anti-CD3 denominado “4B4-D7” comprende:

- un dominio variable de cadena pesada que consiste en la secuencia
EVQLVETGGRLVQPGRSLKLTCA**TS****GFTFSNAW**MHWVRQSPEKQLEWVAQ**I****KARSNN**
30 **YAT**YYAESVKGRFTISRDDSKSTIYLQMNSLKEEDTAIYYC**RGTTYASKPFDY**WGQGMV
VTVSS (SEQ ID NO: 12, con las CDR mostradas en caracteres en negrita y subrayadas)
que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 13, una CDR2-H de secuencia SEQ
ID NO: 14, y una CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 15, y

- un dominio variable de cadena ligera que consiste en la secuencia DVVMTQTPVSLSVSLGGQVSISCRSS**QSLVHDNGNTY**LSWSLQRPQGSPQVLIY**KVSN**RFSGTSDRFTGSGSGTDFTLKISRVEPDDLGVYYC**GOGTOYPFT**FGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 16, con las CDR mostradas en caracteres en negrita y subrayadas) que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 17, una CDR2-L que consiste en la secuencia 'KVS', y una CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 11.

El anticuerpo anti-CD3 denominado "4E7-C9" comprende:

- un dominio variable de cadena pesada que consiste en la secuencia EVQVVETGGSLVQPGKSLKLTCA TS**GFTFSNAW**MHWVRQSPEKQLEWVAQ**IKDKSNN****YATYYAESL**KGRFTISRDDPKRSIYLQMNSLREEDTAIYYC**RYVHYGIGYAMD**AWGQGT SVTVSS (SEQ ID NO: 18, con las CDR mostradas en caracteres en negrita y subrayadas) que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 13, una CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 19, y una CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 20, y
- un dominio variable de cadena ligera que consiste en la secuencia DVVMTQTPVSLSVSLGGQVSISCRSS**QSLVHDNGNTY**LSWYLQKPGQSPQPLIY**KVSN**RFSGISDRFSGSGSGTDFTLKISRVEPDDLGVYYC**GOGTOYPFT**FGPGTKLELK (SEQ ID NO: 21, con las CDR mostradas en caracteres en negrita y subrayadas) que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 22, una CDR2-L que consiste en la secuencia 'KVS', y una CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 11.

El anticuerpo anti-CD3 denominado "18F5-H10" comprende:

- un dominio variable de cadena pesada que consiste en la secuencia EVQVVETGGSLVQPGKSLKLTCA TS**GFTFTNAW**MHWVRRSPEKQLEWVAQ**IKDKSNN****YATYYAESV**KGRFTISRDDSKSSIYLQMNSLKEEDTAIYYC**RYVHYRFAYALDA**WGRGT SVSVSS (SEQ ID NO: 23, con las CDR mostradas en caracteres en negrita y subrayadas) que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 24, una CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 19, y una CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 25, y
- un dominio variable de cadena ligera pesada que consiste en la secuencia DVLMTQTPVSLSVSLGGQVSISCRSS**QSLVHTNGNTY**LSWYLQKPGQSPQLLIY**KVSN**RLSGISDRFSGSGSGTDFTLKISRVEPDDLGVYYC**GOGTHYPFT**FGAGTKLELK (SEQ ID NO: 26, con las CDR mostradas en caracteres en negrita y subrayadas) que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 27, una CDR2-L que consiste en la secuencia 'KVS', y una CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 28.

El anticuerpo anti-CD3 denominado “12D2-E5” comprende:

- un dominio variable de cadena pesada que consiste en la secuencia EVKLVESGGGLVQPGRSLRLSCAAS**GFNFYAYW**MGWVRQAPGKGLEWIGE**IKKDGTTI**
 5 NYTPSLKDRFTISRDNQAQNTLYLQMTKLGS EDTALYYC**AREERDGYFDY**WGQGVMVTV
 SS (SEQ ID NO: 29, con las CDR mostradas en caracteres en negrita y subrayadas) que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 30, una CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 31, y una CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 32, y

- un dominio variable de cadena ligera que consiste en la secuencia
 10 QFVLTQPNSVSTNLGSTVKLSCKRST**TGNIGSNY**VNWWYQQHEGRSPTTMIY**RDD**KRPDGV
 VPDRFSGSIDRSSNSALLTINNVTED EADYFC**QSYSSGIV**FGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 33, con las CDR mostradas en caracteres en negrita y subrayadas) que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 34, una CDR2-L que consiste en la secuencia ‘RDD’, y una CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 35.

15

El anticuerpo anti-CD3 denominado “11D7-C3” comprende:

- un dominio variable de cadena pesada que consiste en la secuencia EVQFVETGGSLVQPGKSLKLT CATS**GFTFSNAW**MHWVRQSPEKQLEWVAQ**IKAKSNN**
 20 **YATYYA**ESVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNSLKEEDTATYYC**RGLYYGLSPSDY**WGQGV
 MVTVSS (SEQ ID NO: 36, con las CDR mostradas en caracteres en negrita y subrayadas) que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 13, una CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 37, y una CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 38, y

- un dominio variable de cadena ligera que consiste en la secuencia DVVMTQTPVSLSVSLGGQVSISCRSS**QSLVHNNGNTY**LSWYLQKPGQSPQLLIY**KVSNR**
 25 FSGISDRFSGSGSGTDFTLKISRVEPDDLGVYYC**GQGTHYPFT**FGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 39, con las CDR mostradas en caracteres en negrita y subrayadas) que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 10, una CDR2-L que consiste en la secuencia ‘KVS’, y una CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 28.

30

El anticuerpo anti-CD3 denominado “11H3-E5” comprende:

- un dominio variable de cadena pesada que consiste en la secuencia EVQLVETGGSLVQPGKSLKLT CATS**GFTFSNAW**MHWVRQSPEKQLEWVAQ**IKAKSNN**
YATYYAESVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNSLKEEDTAIYYC**RGTYAYKPFDY**WGQGV
 MVTVSS (SEQ ID NO: 40, con las CDR mostradas en caracteres en negrita y

subrayadas) que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 13, una CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 37, y una CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 41, y

- un dominio variable de cadena ligera que consiste en la secuencia DVVMTQTPVSLSVSLGGQVSISCRSS**QSLVHDNGNTY**LSWSLQKPGQSPQVLIY**KVS**NR

5 FSGTSDRFTGSGSGTDFTLKISRVEPDDLGVYYC**GOGTQYPFT**FGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 42, con las CDR mostradas en caracteres en negrita y subrayadas) que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 17, una CDR2-L que consiste en la secuencia 'KVS', y una CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 11.

10 El anticuerpo anti-CD3 denominado "13H2-C2" comprende:

- un dominio variable de cadena pesada que consiste en la secuencia EEELVETGGSLVQPGKSLKLTCA TS**GFTFSNAW**MHWVRQSPDKQLEWVAQI**KAKSNNY**
ATYYAESVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNNLKEEDTAIYYC**RYVHYGLAPMDA**WGQGTS
VTVSS (SEQ ID NO: 43, con las CDR mostradas en caracteres en negrita y subrayadas)

15 que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 13, una CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 37, y una CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 44, y

- un dominio variable de cadena ligera que consiste en la secuencia DVVMTQTPVSLSVSLGGQVSISCRSS**QSLVHNNGNTY**LSWYLQKAGQSPQLLIY**KVS**NR

20 FSGISDRFSGSGSGTDFILKISRVEPDDLGVFYC**GOGTQYPFT**FGAGTKLELK (SEQ ID NO: 45, con las CDR mostradas en caracteres en negrita y subrayadas) que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 10, una CDR2-L que consiste en la secuencia 'KVS', y una CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 11.

El anticuerpo anti-CD3 denominado "13C1-F6" comprende:

25 - un dominio variable de cadena pesada que consiste en la secuencia EVQLVETGGTLVQPGKSLKLTCA TS**GFTFSNAW**MHWVRQSPEKQLEWVAQI**KAKSNNY**
ATYYAESVKGRFTISRDDSKTSVYLQLNSLREEDTAIYYC**RGTYGYNPFDY**WGQGVMTV
TVSS (SEQ ID NO: 46, con las CDR mostradas en caracteres en negrita y subrayadas)

30 que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 13, una CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 37, y una CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 47, y

- un dominio variable de cadena ligera que consiste en la secuencia DVVMTQSPVSLSVSLGGQVSISCRSS**QSLVHNNGNTY**LSWYLQRSGQSPQLLIY**KVS**NR

LSGISDRFSGSGSGTDFTLKISRIPDDLGVYYC**GOGTQYPFT**FGSGTRLEIK (SEQ ID NO: 48, con las CDR mostradas en caracteres en negrita y subrayadas) que comprende

CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 10, una CDR2-L que consiste en la secuencia 'KVS', y una CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 11.

El anticuerpo anti-CD3 denominado "18H11-F10" comprende:

- 5 - un dominio variable de cadena pesada que consiste en la secuencia EVQLVESGGGLVQPGRSLKLSCAAS**GFIFSDYY**MAWVRQAPKKGLEWVATIS**SISGSRTY** YPDSVKGRFTVSRDNAKSSLYLQMNSLKSEDTATYYC**ATNNPGGW**WFVYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 49, con las CDR mostradas en caracteres en negrita y subrayadas) que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 50, una CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 51, y una CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 52, y
- 10 - un dominio variable de cadena ligera que consiste en la secuencia NIQMTQSPSLLSASVGDRVTLSCKAG**QNINND**LAWYQQKLGEAPRLLIY**NAN**SLQTGIPSRFSGSGSGADFTLTISLQPEDVATYFC**QQYSSGDT**FGAGTKLELK (SEQ ID NO: 53, con las CDR mostradas en caracteres en negrita y subrayadas) que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 54, una CDR2-L que consiste en la secuencia 'NAN', y una CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 55.
- 15

El anticuerpo anti-CD3 denominado "1E6-C9" comprende:

- 20 - un dominio variable de cadena pesada que consiste en la secuencia EVQLVETGGSLVQPGKSLKLTCA**TSGFTFSYAW**MHWVRQSPDKQLQWVAQ**IKAKSNN****YAT**YYAESVEGRFTISRDDSKSSVYLQMNSLKEEDTAIYYC**RGVYYGLLGLDA**WGQGTSTVTSS (SEQ ID NO: 56, con las CDR mostradas en caracteres en negrita y subrayadas) que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 57, una CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 37, y una CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 58, y
- 25 - un dominio variable de cadena ligera que consiste en la secuencia DVVMTQTPVSLSVRLGGQVSISCRSS**QSLVHNNGNTY**LSWFLQKPGQSPQLLIY**KVSNR**FSGISDRFSGSASGTDFTLKISRVEPDDLGVYYC**GQGTHYPFT**FGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 59, con las CDR mostradas en caracteres en negrita y subrayadas) que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 10, una CDR2-L que consiste en la secuencia 'KVS', y
- 30 una CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 28.

El anticuerpo anti-CD3 denominado "10F4-C10" comprende:

- un dominio variable de cadena pesada que consiste en la secuencia EVQLVETGGSLVQPGKSLKITCA**TSGFTFSNAW**MHWVRQSPEKQLEWVAQ**IKAKSNNY**

ATYYAESVKGRFTISRDDSKSSYLQMNSLKEEDTAIYYCRAVNYGNYPLDYWGQGMV
TVSS (SEQ ID NO: 60, con las CDR mostradas en caracteres en negrita y subrayadas)
que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 13, una CDR2-H de secuencia SEQ
ID NO: 37, y una CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 61, y

- 5 - un dominio variable de cadena ligera que consiste en la secuencia
DVVMTQTPVSLSVSLGGQVSISCRSS**QSLVHNNGNTY**LSWCLQKPGQSPQLLIY**KVS**NR
FSGISDRFSGSGSGTDFTLKISRVEPDDLGVYYC**GOGTOYPFT**FGAGTKLELK (SEQ ID
NO: 62, con las CDR mostradas en caracteres en negrita y subrayadas) que comprende
CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 10, una CDR2-L que consiste en la secuencia 'KVS', y
10 una CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 11.

El anticuerpo anti-CD3 denominado "10E6-G6" comprende:

- un dominio variable de cadena pesada que consiste en la secuencia
EVQLVETGGGLVQSGKSLKLTCA**TSGFTVTNAWM**HWVRQSPEKQLEWVAQ**IKAKSNN**
15 **YET**YYAESVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNSLKEEDTAIYYC**RGTOYGYNPFDY**WGQGV
MVTVSS (SEQ ID NO: 63, con las CDR mostradas en caracteres en negrita y
subrayadas) que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 64, una CDR2-H de
secuencia SEQ ID NO: 65, y una CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 47, y
- un dominio variable de cadena ligera que consiste en la secuencia
20 DVVMTQSPVSLSVSLGGQVSISCRSS**QSLVHNNGYTY**LSWYLQKPGQSPQVFIY**KVS**N
RFGISDRFSGSGSGTDFTLKISRVEPDDLGVYYC**GOGTHYPFT**FGSGTKLEIK (SEQ ID
NO: 66, con las CDR mostradas en caracteres en negrita y subrayadas) que comprende
CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 67, una CDR2-L que consiste en la secuencia 'KVS', y
una CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 28.

25

El anticuerpo anti-CD3 denominado "18G9-H11" comprende:

- un dominio variable de cadena pesada que consiste en la secuencia
EVQLVETGGSLVQPGKSLKLTCA**TSGFTFSNAWI**QWVRQSPEKQLEWVAQ**IKAKSNNY**
30 **AT**YYAESVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNSLKEEDTALYYC**TWRHYYSHTMDA**WGQGT
LTVSS (SEQ ID NO: 68, con las CDR mostradas en caracteres en negrita y
subrayadas) que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 13, una CDR2-H de
secuencia SEQ ID NO: 37, y una CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 69, y
- un dominio variable de cadena ligera que consiste en la secuencia
DVVMTQTPVSLSVSLGGQVSISCRSS**QSLVHNNGNTY**LSWYLQKPGQSPQLLIY**KVS**NR

FSGISDRFSGSGSGTDFTLKISRVAPTDLGVYYC**GQGSQYPFT**FGAGTKLELK (SEQ ID NO: 70, con las CDR mostradas en caracteres en negrita y subrayadas) que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 10, una CDR2-L que consiste en la secuencia 'KVS', y una CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 71.

5

El anticuerpo anti-CD3 denominado "11F3-B9" comprende:

- un dominio variable de cadena pesada que consiste en la secuencia EVQLVETGGSLVQPGKSLTLCATSG**FTFSNAWMHWVRQSPEKQLEWVAQIKAKSNNY**
ATYYAESVKGRFTISRDDSKRSVYLQMNSLKEEDTAIYYCRYVNYGLAPMDVWGQGS
10 VTVSS (SEQ ID NO: 72, con las CDR mostradas en caracteres en negrita y subrayadas) que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 13, una CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 37, y una CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 84, y

- un dominio variable de cadena ligera que consiste en la secuencia DVVMTQTPVSLSVSLGGQVSISRSS**QSLVHDNGNTYLSWYLQKPGQSPQLLIYKVS**
15 FSGFSDRFSGSGSGTDFTLKISRVEPDDLGVYYC**GQGTQYPFT**FGAGTKLELK (SEQ ID NO: 73, con las CDR mostradas en caracteres en negrita y subrayadas) que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 17, una CDR2-L que consiste en la secuencia 'KVS', y una CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 11.

20 El anticuerpo anti-CD3 denominado "12G3-E8" comprende:

- un dominio variable de cadena pesada que consiste en la secuencia EVRVVETGGSLVQPGKSLKLTLCATSG**FTFSLAWMHWRQSPEKKLEWVAQIKDKANNY**
ATYYAESVKGRFTISRDDSKRSVYLQMNRLEEDTAIYYCRGVYGFSPMPFDYWGQG
25 VMVTVSS (SEQ ID NO: 74, con las CDR mostradas en caracteres en negrita y subrayadas) que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 75, una CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 76, y una CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 77, y

- un dominio variable de cadena ligera que consiste en la secuencia DVAMTQTPVSLSVSLGGQVSISRSS**QSLVHNNGNTYLSWYLQKPGQSPQVLIYKVS**
30 FSGISDRFSGSGSGADFTLKISRVEPDDLGVYYC**GQGTQYPFT**FGAGTKLELK (SEQ ID NO: 78, con las CDR mostradas en caracteres en negrita y subrayadas) que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 10, una CDR2-L que consiste en la secuencia 'KVS', y una CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 11.

El anticuerpo anti-CD3 denominado "5B1-G2" comprende:

- un dominio variable de cadena pesada que consiste en la secuencia EVQVVETGGSLVQPGKSLKLTCA**TS****GFSFSNAWM**HWVRQSPEKQLEWVAQ**IKDKANN****YAT**YYAESVKGRFTISRDDSKGSIYLMNSLKEEDTAVYYC**RGLYYGLFPSDY**WGQGV MVTVSS (SEQ ID NO: 79, con las CDR mostradas en caracteres en negrita y subrayadas) que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 80, una CDR2-H de

5 secuencia SEQ ID NO: 76, y una CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 81, y

- un dominio variable de cadena ligera que consiste en la secuencia DVVMTQTPVSLSVSLGGQVSISRSS**QSLVHNNGNTY**LSWYLLKPGQSPQLLIY**KV**SNR FSGISDRFSGGGSGTDFTLKISRLEPDDLGIYYC**GOGTOYPFT**FGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 82, con las CDR mostradas en caracteres en negrita y subrayadas) que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 10, una CDR2-L que consiste en la secuencia 'KVS', y una CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 11.

10

El anticuerpo anti-CD3 denominado "16F8-A7" comprende:

- un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia VETGGNLVQPGKSLKLTCA**TS****GFTFSNAWM**HWVRQSPEKQLEWVAQ**IKAKSNNYAT**Y AESVKGRFTISRDDSKSSVYLMNSLKEEDTAIYYC**RYVNYGLAPMDV**WGQGTSTVTS S (SEQ ID NO: 83, con las CDR mostradas en caracteres en negrita y subrayadas) que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 13, una CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 37, y una CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 84, y

15

- un dominio variable de cadena ligera que consiste en la secuencia DVVMTQTPVSLSVSLGGQVSISRSS**QSLVHNNGNTY**LSWYLLKPGQSPQLLIY**KV**SNR FSGFSDRFSGSGSGTDFTLKISRVEPDDLGVYYC**GOGTOYPFT**FGAGTKLELK (SEQ ID NO: 85, con las CDR mostradas en caracteres en negrita y subrayadas) que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 10, una CDR2-L que consiste en la secuencia 'KVS', y una CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 11.

20

El anticuerpo anti-CD3 denominado "11F9-F8" comprende:

- un dominio variable de cadena pesada que consiste en la secuencia EVQLVETGGTLVQPGKSLKLTCA**TS****GFTFSNAWM**HWVRQSPEKQLEWVAQ**IKAKSNNY****AT**YYAESVKGRFTISRDDSKTSVYLLQNSLREEDTAIYYC**RGTOYGYNPF**DYWGQGVMTVSS (SEQ ID NO: 46, con las CDR mostradas en caracteres en negrita y subrayadas) que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 13, una CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 37, y una CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 47, y

30

- un dominio variable de cadena ligera que consiste en la secuencia DVVLTQTPVSLSVSLGGQVSISCRSSQSLVHNNGNTYLSWSLQKPGQSPQVLIYKVSNRFSGISNRFSGSGSGTDFTLKISRVEPDDLGVYYCGQGAHYPFTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 87, con las CDR mostradas en caracteres en negrita y subrayadas) que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 10, una CDR2-L que consiste en la secuencia 'KVS', y una CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 88.

El anticuerpo anti-CD3 denominado "3G5-E10" comprende:

- un dominio variable de cadena pesada que consiste en la secuencia EVKLVESGGGLVQPGRSLKLSCAASGFNFNVYWMGWVRQAPGKGLEWIGEIKKDSNSINYTPSLKEKFTISRDNANTLYLQVKNKLGSEDTAIYYCAREERDGYFDYWGQGVMTVS S (SEQ ID NO: 89, con las CDR mostradas en caracteres en negrita y subrayadas) que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 90, una CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 91, y una CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 32, y
- un dominio variable de cadena ligera que consiste en la secuencia NIVMTQSPKSMMSVGERVTLTCKASENVVTYWSWYQQKPEQSPKLLIYGASNRYTGVP DRFTGSGSATDFTLTISVQAEDLADYHCGQGYSPYPTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 92, con las CDR mostradas en caracteres en negrita y subrayadas) que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 93, una CDR2-L que consiste en la secuencia 'GAS', y una CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 94.

El anticuerpo anti-CD3 denominado "9D7-F3" comprende:

- un dominio variable de cadena pesada que consiste en la secuencia AVQLVESGGGLVQPKESLKISCAASGFTEFSNAMYWVRQAPGKGLEWVARIRTKPNNYATYYADSVTGRFIISRDDSRSMVYLQMDNLQTEDTAMYYCTALISTAMAAWGQGTSVTV SS (SEQ ID NO: 95, con las CDR mostradas en caracteres en negrita y subrayadas) que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 96, una CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 97, y una CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 98, y
- un dominio variable de cadena ligera que consiste en la secuencia DIQMTQSPSFLSASVGDRVTINCKASQNINKYLNWYHQMLGEAPKLVISNTNNLQAGIPS RFGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYFCLQHRSGYTFGLGTKLELK (SEQ ID NO: 99, con las CDR mostradas en caracteres en negrita y subrayadas) que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 100, una CDR2-L que consiste en la secuencia 'NTN', y una CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 101.

El anticuerpo anti-CD3 denominado “8C2-F7” comprende:

- un dominio variable de cadena pesada que consiste en la secuencia
QIQLVQSGPELKPGESVKISCKAS**GYTFDF**AMNWVKQAPGNGLKWMGW**INTOTGKP**

5 TYADGFKQRFVFSLETSASTIYLQINNLIEDTATYF**CTRGALAS**VGQGVLTVSS (SEQ ID NO: 102, con las CDR mostradas en caracteres en negrita y subrayadas) que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 103, una CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 104, y una CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 105, y

- un dominio variable de cadena ligera que consiste en la secuencia
10 DVVMTQTPVSLSVSLGSHVSISCRSS**QSLVHNNGNTY**LSWYLQKPGQSPQPLIY**KVSNR**
FSGISDRFSGSGSGTDFTLEINRVEPDDLGVYYC**GOGAQPFT**FGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 106, con las CDR mostradas en caracteres en negrita y subrayadas) que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 10, una CDR2-L que consiste en la secuencia ‘KVS’, y una CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 11.

15

El anticuerpo anti-CD3 denominado “20E5-F10” comprende:

- un dominio variable de cadena pesada que consiste en la secuencia
EVQLVETGENLVQPGKSLRLTCAT**SGF**FSNAWMHWIRQSPEKQLEWVAQ**IKDKSN****NY**

20 **ATYYAESVNGRFTISRDDSKSSIY**LHMDNLKEEDSAIYYC**RYVHYGV**RFFYTMDVWGQG
TSVTVSS (SEQ ID NO: 107, con las CDR mostradas en caracteres en negrita y subrayadas) que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 80, una CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 19, y una CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 108, y

- un dominio variable de cadena ligera que consiste en la secuencia
DVVMTQTPVSLSVSLGDQVSISCRPS**QSLVHNNGNTY**LSWYLQKPGQSPHPLIY**KVSNR**
25 FSGISDRFSGSGSGTDFTLKISRVEPDDLGVYYC**GOGTOYPFT**FGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 109, con las CDR mostradas en caracteres en negrita y subrayadas) que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 10, una CDR2-L que consiste en la secuencia ‘KVS’, y una CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 11.

30 El anticuerpo anti-CD3 denominado “20B5-F10” comprende:

- un dominio variable de cadena pesada que consiste en la secuencia
EVQLVETGGSLVQPGKSLKLTCA**TSGFT**FSNAWMHWVRQSPEKQLEWVAQ**IKAKSNN**

YATYYAESVKGRFTISRDDSISSVYLQMNNLKEEDTAIYYC**RGVYYGFLGMDA**WGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO: 110, con las CDR mostradas en caracteres en negrita y

subrayadas) que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 13, una CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 37, y una CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 111, y

- un dominio variable de cadena ligera que consiste en la secuencia DVVMTQTPVSLSVSLGGQVSISCRSS**ORLVHNNGNTY**LSWYLQKPGQSPQLLVY**KVSN**
 5 RFSGISDRFSGSGSGTDFTLKISRVEPDDLGVYYC**GQGTEYPFT**FGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 112, con las CDR mostradas en caracteres en negrita y subrayadas) que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 113, una CDR2-L que consiste en la secuencia 'KVS', y una CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 114.

10 El anticuerpo anti-CD3 denominado "6C9-C9" comprende:

- un dominio variable de cadena pesada que consiste en la secuencia AVQLVESGGGLVLRPKESLKISCAAS**GFTFRNA**AMYWVRQAPGKGLEWVAR**IRTQPNNY**
AKYYADSVKDRFTISRDDSKSMVYLQMDNLKTEDTAMYYCTGLVVTAMDAWGQGTSVT
 15 VSS (SEQ ID NO: 115, con las CDR mostradas en caracteres en negrita y subrayadas) que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 116, una CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 117, y una CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 118, y

- un dominio variable de cadena ligera que consiste en la secuencia DIQMTQSPSFLSASVGDRVITINCKAS**QNINKY**LNWYQQKLGEAPKLLIY**VTNN**LQTGIPSR
 FSGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYFC**LQHRSMYT**FGTGTKLELK (SEQ ID NO: 119,
 20 con las CDR mostradas en caracteres en negrita y subrayadas) que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 100, una CDR2-L que consiste en la secuencia 'VTN', y una CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 120.

El anticuerpo anti-CD3 denominado "3E8-G1" comprende:

25 - un dominio variable de cadena pesada que consiste en la secuencia EVQVVESGGGLVQPGRSLKLSCAAS**GFTFSNYY**MDWVRQAPKKGLEWVAT**ITASGSRI**
 YYPDSVKGRFTISRDNKSSLYLLMNSLKSEDTATYYC**ARERTDAYFDY**WGQGVMTV
 SS (SEQ ID NO: 121, con las CDR mostradas en caracteres en negrita y subrayadas) que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 122, una CDR2-H de secuencia SEQ
 30 ID NO: 123, y una CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 124, y

- un dominio variable de cadena ligera que consiste en la secuencia QFILTQPNVSTILGSTVKLSCKRST**TGNIGTNY**VSWYQHHEGRSPTTMIY**RDD**KRPDGV
 DRFSGSIDRSSNSALLTINNVTQTEDEADYFC**QSYISGLNPV**FGGGSKLTVL (SEQ ID NO:
 125, con las CDR mostradas en caracteres en negrita y subrayadas) que comprende

CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 126, una CDR2-L que consiste en la secuencia 'RDD', y una CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 127.

El anticuerpo anti-CD3 denominado "3H6-D2" comprende:

- 5 - un dominio variable de cadena pesada que consiste en la secuencia EVQLVETGGRLVQPGKSLKLTCA**TS****GFTFSNAWMHWVRQSPEKQLEWVAQIKDKSNN****YAT**YYAESVKGRFTISRDDSKSIIYLQMNSLKEEDTAIYYC**RALTYGYKRDAMDG**WGH GTSVTVSS (SEQ ID NO: 128, con las CDR mostradas en caracteres en negrita y subrayadas) que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 13, una CDR2-H de
- 10 secuencia SEQ ID NO: 19, y una CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 129, y
- un dominio variable de cadena ligera que consiste en la secuencia DVVMTQTPVSLSVSLGGQVSISCRSS**QSLVHNNGNTY**LSWYLQKPGQSPQLLIY**KVSNR** FSGISDRFSGSGSGTDFTLKISRVEPDDLGVYYC**GQGTQYPFT**FGAGTKLELK (SEQ ID NO: 130, con las CDR mostradas en caracteres en negrita y subrayadas) que comprende
- 15 CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 10, una CDR2-L que consiste en la secuencia 'KVS', y una CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 11.

El anticuerpo anti-CD3 denominado "8H2" comprende:

- 20 - un dominio variable de cadena pesada que consiste en la secuencia QIQLVQSGPELKKPGESVKISCKAS**GYTFTDFAM**NWVKQAPGNGLKWMGW**INTOTGKP** TYADGFKQRFVFSLETSASTIYLQINNLIEDTATYFCT**TRGALAS**VGQGVMTVSS (SEQ ID NO: 131, con las CDR mostradas en caracteres en negrita y subrayadas) que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 103, una CDR2-H de secuencia SEQ ID
- 25 NO: 104, y una CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 105, y
- un dominio variable de cadena ligera que consiste en la secuencia DVVMTQTPVSLSVAIGQPASISCKSS**QSLVGTSGKTY**LNWLLQRPQGSPKRLIY**LVS**KLD SGIPDRFSGSGSETDFTLKISRVEDDLGVYYC**LOGSHFPLT**FGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 132, con las CDR mostradas en caracteres en negrita y subrayadas) que comprende
- 30 CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 133, una CDR2-L que consiste en la secuencia 'LVS', y una CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 134.

En una realización, el anticuerpo anti-CD3 de la invención se une a CD3 humano. En otra realización, el anticuerpo anti-CD3 de la invención se une además a CD3 de

Macaca fascicularis. En particular, el anticuerpo anti-CD3 de la invención se une al dominio extracelular de CD3 humano, o tanto de CD3 humano como de *Macaca fascicularis*. Más específicamente, el anticuerpo se une a CD3ε. Más específicamente, el anticuerpo anti-CD3 se une al dominio extracelular de CD3ε tanto humano como de *Macaca fascicularis*. El anticuerpo anti-CD3 se une a CD3ε cuando está presente en la forma de un complejo, tal como un complejo CD3ε/δ, o cuando está presente como una única proteína, independientemente de si se expresa en forma aislada, o está presente en un dominio extracelular soluble o CD3ε de longitud completa anclada a la membrana como está presente, por ejemplo, en las células T.

El anticuerpo anti-CD3 según la invención es específico para la proteína CD3 de superficie humana, o proteínas CD3 tanto humana como de *Macaca fascicularis*, en particular para CD3ε.

En una realización, el anticuerpo anti-CD3 según la invención tiene una proporción de afinidad para CD3 de *Macaca fascicularis* sobre afinidad para CD3 humana ($KD(\text{Macaca fascicularis})/KD(\text{humana})$) que es ≤ 10 , en particular ≤ 6 , ≤ 5 , ≤ 4 , ≤ 3 , por ejemplo, ≤ 2 , ≤ 1 ó $\leq 0,5$. Dicho polipéptido según la invención puede usarse en estudios toxicológicos realizados en monos, siendo el perfil de toxicidad observado en monos relevante para anticipar efectos adversos potenciales en los seres humanos.

En particular, el anticuerpo anti-CD3 de la invención no se une a, o no reacciona de manera cruzada significativamente con proteína(s) CD3γ y/o CD3δ.

En particular, el anticuerpo no se une a, o no reacciona de manera cruzada significativamente con el dominio extracelular de la(s) proteína(s) CD3γ y/o CD3δ humana y de *Macaca fascicularis* mencionadas anteriormente.

La secuencia de la proteína CD3δ humana de longitud completa está disponible en la base de datos Uniprot con el número de registro P04234 (SEQ ID NO: 86, según está disponible el 14 de diciembre, 2014). El dominio extracelular de CD3δ humana consiste en los aminoácidos en las posiciones 22–105 de SEQ ID NO: 86.

La secuencia de la proteína CD3γ humana de longitud completa está disponible en la base de datos Uniprot con el número de registro P09693 (SEQ ID NO: 185, según está disponible el 14 de diciembre, 2014). El dominio extracelular de CD3γ humana consiste en los aminoácidos en las posiciones 23–116 de SEQ ID NO: 185.

Además, el anticuerpo anti-CD3 según la invención tiene una afinidad (KD) para CD3 humana o CD3 de *Macaca fascicularis*, o ambas, que es $\leq 90\text{nM}$, $\leq 50\text{nM}$, o $\leq 30\text{nM}$, por ejemplo, $\leq 20\text{nM}$, $\leq 10\text{nM}$, $\leq 8\text{nM}$, $\leq 6\text{nM}$, $\leq 4\text{nM}$ o $\leq 2\text{nM}$, por ejemplo, una afinidad de 0,1 nM a 10 nM, en particular de 0,1 nM a 8 nM, o de 0,1 nM a 4 nM.

- 5 La afinidad para CD3 humana o CD3 de *Macaca fascicularis* se determina como el valor KD con resonancia de plasmón superficial usando complejo soluble recombinante CD3 ϵ / δ humano y de *Macaca fascicularis* como antígeno de captura.

En un ejemplo, las afinidades de unión de un anticuerpo anti-CD3 se miden por resonancia de plasmón superficial (SPR) usando por ejemplo un instrumento
10 Biacore3000 (GE Healthcare). El tampón de ensayo es por ejemplo HBS-EP (BR-1001-88, GE Healthcare). Como antígeno puede usarse, por ejemplo, construcciones de dominio extracelular de subunidad CD3 ϵ humana y CD3 δ humana, incluyendo el péptido señal, en forma de proteínas de fusión Fc como se describe en los ejemplos. Alternativamente, puede usarse, como antígeno, construcciones del dominio
15 extracelular de subunidad CD3 ϵ de *Macaca fascicularis* y CD3 δ de *Macaca fascicularis*, incluyendo el péptido señal, en forma de proteínas de fusión Fc como se describe en los ejemplos. La captura de las proteínas de fusión CD3 ϵ / δ -Fc humana o de *Macaca fascicularis* se consigue usando, por ejemplo, el kit de captura de anticuerpo humano (GE Healthcare). Por ejemplo, el anticuerpo de captura puede acoplarse a chips CM5
20 (BR-1001-88, GE Healthcare) a por ejemplo aprox. 12.000 RU usando por ejemplo el kit de acoplamiento de amina (BR-100-50, GE Healthcare). Las proteínas de fusión CD3 ϵ / δ -Fc se capturan a 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ a aprox. 70 RU para rendir valores de R_{max} de 30 RU. Las cinéticas de unión para un anticuerpo anti-CD3 pueden medirse, por ejemplo, a 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ durante 240 s y 600 s. para la fase de asociación y disociación,
25 respectivamente. Por ejemplo, pueden usarse diluciones de dos veces de un anticuerpo anti-CD3 de 3 a 400 nM en tampón de ensayo. La regeneración de la superficie de captura puede realizarse por ejemplo con una inyección de 1 min por ejemplo de disolución 3M de MgCl_2 a 30 $\mu\text{l}/\text{min}$. Para el análisis de los datos puede usarse, por ejemplo, el software BIAevaluation v.4.1 (GE Healthcare). Los datos pueden ajustarse
30 globalmente usando un modelo 1:1 de Langmuir con transferencia de masa.

En una realización, el anticuerpo anti-CD3 de la invención también tiene una CE50 aparente, por ejemplo, como se determina por análisis FACS en células T humanas, que es $\leq 60\text{nM}$, por ejemplo, $\leq 50\text{nM}$, $\leq 40\text{nM}$, $\leq 30\text{nM}$, $\leq 20\text{nM}$ o $\leq 15\text{nM}$. Típicamente, la

CE50 aparente está en el intervalo 1 a 60 nM, en particular 1 a 30 nM, por ejemplo, 1 a 20nM.

En una realización, el anticuerpo anti-CD3 de la invención tiene una activación de células T que es menos de 10%, menos de 8%, menos de 6%, menos de 4%, menos de 2%, menos de 1%, por ejemplo menos de 0,5% en ausencia de células diana.

El término "activación de células T" en la presente memoria se refiere a desencadenar la señalización de CD3 que implica la fusión de gránulos citotóxicos, liberación transitoria de citoquinas, y proliferación. La proteína de unión semejante a anticuerpo y el anticuerpo anti-CD3 de la invención dirigen CD3ε y activan células T en presencia de células diana; esta actividad también se refiere como "efecto conector de células T". El efecto conector de células T induce citotoxicidad en la célula diana.

Como sabe el experto en la técnica, la activación de las células T induce la expresión de marcadores de superficie tales como CD69 y CD25. La activación de las células T puede medirse así detectando y midiendo la expresión de células T CD4+/CD25+, CD4+/CD69+, CD8+/CD25+, o CD8+/CD69+. Los métodos para medir la activación de las células T son conocidos para el experto en la técnica.

Un método para medir la activación de las células T se describe adicionalmente en la sección de ejemplos (Ejemplo 3.3). De acuerdo con esto, en el contexto de la invención, la activación de las células T se mide bien como el porcentaje de células que expresan CD69 en % del número total de células, o como el porcentaje de células que expresan CD4 y CD69 en % del número total de células, o como el porcentaje de células que expresan CD8 y CD69 en % del número total de células.

"Baja activación de células T" en contexto con el anticuerpo anti-CD3 de la invención se refiere a menos de 10%, menos de 8%, menos de 6%, menos de 4%, menos de 2%, menos de 1%, por ejemplo, menos de 0,5% de activación de células T en ausencia de células diana.

Se realizaron alineamientos de las secuencias de las regiones VH y VL de los anticuerpos anti-CD3 "20G6-F3", "4B4-D7", "4E7-C9", "18F5-H10", "12D2-E5", "11D7-C3", "11H3-E5", "13H2-C2", "13C1-F6", "18H11-F10", "1E6-C9", "10F4-C10", "10E6-G6", "18G9-H11", "11F3-B9", "12G3-E8", "5B1-G2", "16F8-A7", "11F9-F8", "3G5-E10", "9D7-F3", "8C2-F7", "20E5-F10", "20B5-F10", "6C9-C9", "3E8-G1", "3H6-D2" y "8H2". La comparación de las secuencias de CDR-H y CDR-L tiende a indicar que, estructuralmente, "20G6-F3", "4B4-D7", "4E7-C9", "18F5-H10", "11D7-C3", "11H3-E5",

“13H2-C2”, “13C1-F6”, “1E6-C9”, “10F4-C10”, “10E6-G6”, “18G9-H11”, “11F3-B9”, “12G3-E8”, “5B1-G2”, “16F8-A7”, “11F9-F8”, “20E5-F10”, “20B5-F10” y “3H6-D2” están relacionados de cerca, uniéndose probablemente dichos anticuerpos al mismo epítipo. La comparación de las secuencias de CDR-H y CDR-L de dichos anticuerpos relacionados se presenta en las Figuras 1 y 2, respectivamente. Se identificaron las posiciones de las CDR que están estrictamente conservadas entre los anticuerpos y que así se asume que son importantes para la especificidad, mientras otras posiciones podrían soportar la sustitución.

De acuerdo con esto, el anticuerpo según la invención comprende:

- 10 - un dominio variable de cadena pesada que comprende una CDR1-H que consiste en la secuencia $GFX_1X_2X_3X_4AW$ (SEQ ID NO: 331) en la que X_1 es T o S, X_2 es F o V, X_3 es S o T y X_4 es N, K, L o Y, o cualquier combinación de éstas; y una CDR2-H que consiste en la secuencia $IKX_1X_2X_3NX_4YX_5T$ (SEQ ID NO: 332) en la que X_1 es A o D, X_2 es K o R, X_3 es S o A, X_4 es N o S y X_5 es A o E, o cualquier combinación de éstas; y
15 una CDR3-H que consiste en la secuencia $TWRHYYSHTMDA$ (SEQ ID NO: 69) o $RALTYYGKRDAMDG$ (SEQ ID NO: 129) o $RX_1X_2X_3YX_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}DX_{12}$ (SEQ ID NO: 333) en la que X_1 es Y, G o A, X_2 es V, T o L, X_3 es H, N, Y o Q, X_4 es G, R o A, X_5 es F o V o no aminoácido, X_6 es R o no aminoácido, X_7 es F, S o I o no aminoácido, X_8 es F, L, N, M, Y, S, A o G, X_9 es Y, A, K, S, N, T, F o L, X_{10} es A, P, G o T, X_{11} es M, L, F o S y X_{12} es A, V o Y, o cualquier combinación de éstas, y
20 - un dominio variable de cadena ligera que comprende una CDR1-L que consiste en la secuencia $QX_1LX_2HX_3NGX_4TY$ (SEQ ID NO: 334) en la que X_1 es R o S, X_2 es V o E, X_3 es N, D o T, y X_4 es N o Y, o cualquier combinación de éstas; y
25 una CDR2-L que consiste en la secuencia ‘KVS’; y una CDR3-L que consiste en la secuencia $GQGX_1X_2YPFT$ (SEQ ID NO: 335) en la que X_1 es T, A o S y X_2 es H, E o Q, o cualquier combinación de éstas.

Según una realización, el anticuerpo anti-CD3 según la invención comprende las
30 secuencias de CDR de las cadenas pesada y/o ligera de uno de los 28 anticuerpos anti-CD3 denominados “20G6-F3”, “4B4-D7”, “4E7-C9”, “18F5-H10”, “12D2-E5”, “11D7-C3”, “11H3-E5”, “13H2-C2”, “13C1-F6”, “18H11-F10”, “1E6-C9”, “10F4-C10”, “10E6-G6”, “18G9-H11”, “11F3-B9”, “12G3-E8”, “5B1-G2”, “16F8-A7”, “11F9-F8”, “3G5-E10”, “9D7-

F3", "8C2-F7", "20E5-F10", "20B5-F10", "6C9-C9", "3E8-G1", "3H6-D2" y "8H2" listados anteriormente.

Por lo tanto, la invención se refiere a un anticuerpo anti-CD3, que comprende:

- 5 a) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 6 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 6 por una sustitución de aminoácido; CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 7 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 7 por una o más sustituciones de aminoácido; CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 8 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 8 por una sustitución de aminoácido; y
10 un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 142 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 142 por una sustitución de aminoácido; CDR2-L de secuencia 'KVS' o una secuencia que se diferencia de la secuencia 'KVS' por una sustitución de aminoácido y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 11 o una
15 secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 11 por una sustitución de aminoácido; o
- b) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 13 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 13 por una sustitución de aminoácido; CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 14 o una
20 secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 14 por una o más sustituciones de aminoácido; CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 15 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 15 por una sustitución de aminoácido; y
un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 184 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID
25 NO: 17 o SEQ ID NO: 184 por una sustitución de aminoácido; CDR2-L de secuencia 'KVS' o una secuencia que se diferencia de la secuencia 'KVS' por una sustitución de aminoácido y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 11 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 11 por una sustitución de aminoácido; o
- 30 c) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 13 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 13 por una sustitución de aminoácido; CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 19 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 19 por una o más sustituciones de

- aminoácido; CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 20 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 20 por una sustitución de aminoácido; y
- un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 22 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 22 por una sustitución de aminoácido; CDR2-L de secuencia 'KVS' o una secuencia que se diferencia de la secuencia 'KVS' por una sustitución de aminoácido y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 11 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 11 por una sustitución de aminoácido; o
- d) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 24 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 24 por una sustitución de aminoácido; CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 19 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 19 por una o más sustituciones de aminoácido; CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 25 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 25 por una sustitución de aminoácido; y
- un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 27 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 27 por una sustitución de aminoácido; CDR2-L de secuencia 'KVS' o una secuencia que se diferencia de la secuencia 'KVS' por una sustitución de aminoácido y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 28 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 28 por una sustitución de aminoácido; o
- e) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 30 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 30 por una sustitución de aminoácido; CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 31 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 31 por una o más sustituciones de aminoácido; CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 32 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 32 por una sustitución de aminoácido; y
- un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 34 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 34 por una sustitución de aminoácido; CDR2-L de secuencia 'RDD' o una secuencia que se diferencia de la secuencia 'RDD' por una sustitución de aminoácido y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 35 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 35 por una sustitución de aminoácido; o
- f) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 13 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 13 por una

- sustitución de aminoácido; CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 37 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 37 por una o más sustituciones de aminoácido; CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 38 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 38 por una sustitución de aminoácido; y
- 5 un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 10 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 10 por una sustitución de aminoácido; CDR2-L de secuencia 'KVS' o una secuencia que se diferencia de la secuencia 'KVS' por una sustitución de aminoácido y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 28 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 28
- 10 por una sustitución de aminoácido; o
- g) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 13 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 13 por una sustitución de aminoácido; CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 37 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 37 por una o más sustituciones de aminoácido; CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 41 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 41 por una sustitución de aminoácido; y
- 15 un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 17 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 17 por una sustitución de aminoácido; CDR2-L de secuencia 'KVS' o una secuencia que se diferencia de la secuencia 'KVS' por una sustitución de aminoácido y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 11 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 11 por una sustitución de aminoácido; o
- 20
- h) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 13 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 13 por una sustitución de aminoácido; CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 37 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 37 por una o más sustituciones de aminoácido; CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 44 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 44 por una sustitución de aminoácido; y
- 25 un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 10 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 10 por una sustitución de aminoácido; CDR2-L de secuencia 'KVS' o una secuencia que se diferencia de la secuencia 'KVS' por una sustitución de aminoácido y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 11 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 11 por una sustitución de aminoácido; o
- 30

- 5 i) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 13 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 13 por una sustitución de aminoácido; CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 37 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 37 por una o más sustituciones de aminoácido; CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 47 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 47 por una sustitución de aminoácido; y
- 10 un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 10 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 10 por una sustitución de aminoácido; CDR2-L de secuencia 'KVS' o una secuencia que se diferencia de la secuencia 'KVS' por una sustitución de aminoácido y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 11 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 11 por una sustitución de aminoácido; o
- 15 j) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 50 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 50 por una sustitución de aminoácido; CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 51 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 51 por una o más sustituciones de aminoácido; CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 52 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 52 por una sustitución de aminoácido; y
- 20 un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 54 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 54 por una sustitución de aminoácido; CDR2-L de secuencia 'NAN' o una secuencia que se diferencia de la secuencia 'NAN' por una sustitución de aminoácido y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 55 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 55 por una sustitución de aminoácido; o
- 25 k) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 57 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 57 por una sustitución de aminoácido; CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 37 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 37 por una o más sustituciones de aminoácido; CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 58 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 58 por una sustitución de aminoácido; y
- 30 un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 10 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 10 por una sustitución de aminoácido; CDR2-L de secuencia 'KVS' o una secuencia que se diferencia de la secuencia 'KVS' por una sustitución de aminoácido y CDR3-L de

secuencia SEQ ID NO: 28 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 28 por una sustitución de aminoácido; o

l) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 13 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 13 por una sustitución de aminoácido; CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 37 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 37 por una o más sustituciones de aminoácido; CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 61 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 61 por una sustitución de aminoácido; y

un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 10 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 10 por una sustitución de aminoácido; CDR2-L de secuencia 'KVS' o una secuencia que se diferencia de la secuencia 'KVS' por una sustitución de aminoácido y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 11 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 11 por una sustitución de aminoácido; o

m) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 64 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 64 por una sustitución de aminoácido; CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 65 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 65 por una o más sustituciones de aminoácido; CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 47 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 47 por una sustitución de aminoácido; y

un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 67 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 67 por una sustitución de aminoácido; CDR2-L de secuencia 'KVS' o una secuencia que se diferencia de la secuencia 'KVS' por una sustitución de aminoácido y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 28 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 28 por una sustitución de aminoácido; o

n) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 13 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 13 por una sustitución de aminoácido; CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 37 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 37 por una o más sustituciones de aminoácido; CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 69 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 69 por una sustitución de aminoácido; y

un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 10 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 10 por una

sustitución de aminoácido; CDR2-L de secuencia 'KVS' o una secuencia que se diferencia de la secuencia 'KVS' por una sustitución de aminoácido y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 71 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 71 por una sustitución de aminoácido; o

- 5 o) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 13 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 13 por una sustitución de aminoácido; CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 37 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 37 por una o más sustituciones de aminoácido; CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 84 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 84 por una sustitución de aminoácido; y

10 un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 17 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 17 por una sustitución de aminoácido; CDR2-L de secuencia 'KVS' o una secuencia que se diferencia de la secuencia 'KVS' por una sustitución de aminoácido y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 11 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 11 por una sustitución de aminoácido; o

- 15 p) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 75 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 75 por una sustitución de aminoácido; CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 76 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 76 por una o más sustituciones de aminoácido; CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 77 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 77 por una sustitución de aminoácido; y

20 un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 10 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 10 por una sustitución de aminoácido; CDR2-L de secuencia 'KVS' o una secuencia que se diferencia de la secuencia 'KVS' por una sustitución de aminoácido y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 11 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 11 por una sustitución de aminoácido; o

- 25 q) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 80 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 80 por una sustitución de aminoácido; CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 76 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 76 por una o más sustituciones de aminoácido; CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 81 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 81 por una sustitución de aminoácido; y
- 30

- un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 10 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 10 por una sustitución de aminoácido; CDR2-L de secuencia 'KVS' o una secuencia que se diferencia de la secuencia 'KVS' por una sustitución de aminoácido y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 11 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 11 por una sustitución de aminoácido; o
- 5
- r) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 13 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 13 por una sustitución de aminoácido; CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 37 o una
- 10
- secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 37 por una o más sustituciones de aminoácido; CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 84 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 84 por una sustitución de aminoácido; y
- un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 10 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 10 por una
- 15
- sustitución de aminoácido; CDR2-L de secuencia 'KVS' o una secuencia que se diferencia de la secuencia 'KVS' por una sustitución de aminoácido y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 11 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 11 por una sustitución de aminoácido; o
- s) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia
- 20
- SEQ ID NO: 13 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 13 por una sustitución de aminoácido; CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 37 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 37 por una o más sustituciones de aminoácido; CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 47 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 47 por una sustitución de aminoácido; y
- 25
- un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 10 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 10 por una sustitución de aminoácido; CDR2-L de secuencia 'KVS' o una secuencia que se diferencia de la secuencia 'KVS' por una sustitución de aminoácido y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 88 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 88
- 30
- por una sustitución de aminoácido; o
- t) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 90 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 90 por una sustitución de aminoácido; CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 91 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 91 por una o más sustituciones de

- aminoácido; CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 32 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 32 por una sustitución de aminoácido; y
- un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 93 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 93 por una sustitución de aminoácido; CDR2-L de secuencia 'GAS' o una secuencia que se diferencia de la secuencia 'GAS' por una sustitución de aminoácido y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 94 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 94 por una sustitución de aminoácido; o
- u) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 96 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 96 por una sustitución de aminoácido; CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 97 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 97 por una o más sustituciones de aminoácido; CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 98 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 98 por una sustitución de aminoácido; y
- un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 100 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 100 por una sustitución de aminoácido; CDR2-L de secuencia 'NTN' o una secuencia que se diferencia de la secuencia 'NTN' por una sustitución de aminoácido y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 101 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 101 por una sustitución de aminoácido; o
- v) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 103 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 103 por una sustitución de aminoácido; CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 104 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 104 por una o más sustituciones de aminoácido; CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 105 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 105 por una sustitución de aminoácido; y
- un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 10 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 10 por una sustitución de aminoácido; CDR2-L de secuencia 'KVS' o una secuencia que se diferencia de la secuencia 'KVS' por una sustitución de aminoácido y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 11 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 11 por una sustitución de aminoácido; o
- w) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 80 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 80 por una

- sustitución de aminoácido; CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 19 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 19 por una o más sustituciones de aminoácido; CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 108 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 108 por una sustitución de aminoácido; y
- 5 un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 10 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 10 por una sustitución de aminoácido; CDR2-L de secuencia 'KVS' o una secuencia que se diferencia de la secuencia 'KVS' por una sustitución de aminoácido y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 11 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 11
- 10 por una sustitución de aminoácido; o
- x) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 13 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 13 por una sustitución de aminoácido; CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 37 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 37 por una o más sustituciones de aminoácido; CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 111 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 111 por una sustitución de aminoácido; y
- 15 un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 113 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 113 por una sustitución de aminoácido; CDR2-L de secuencia 'KVS' o una secuencia que se diferencia de la secuencia 'KVS' por una sustitución de aminoácido y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 114 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 114 por una sustitución de aminoácido; o
- 20 y) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 116 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 116 por una sustitución de aminoácido; CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 117 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 117 por una o más sustituciones de aminoácido; CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 118 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 118 por una sustitución de aminoácido; y
- 25 un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 100 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 100 por una sustitución de aminoácido; CDR2-L de secuencia 'VTN' o una secuencia que se diferencia de la secuencia 'VTN' por una sustitución de aminoácido y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 120 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 120 por una sustitución de aminoácido; o
- 30

- 5 z) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 122 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 122 por una sustitución de aminoácido; CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 123 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 123 por una o más sustituciones de aminoácido; CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 124 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 124 por una sustitución de aminoácido; y
- 10 un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 126 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 126 por una sustitución de aminoácido; CDR2-L de secuencia 'RDD' o una secuencia que se diferencia de la secuencia 'RDD' por una sustitución de aminoácido y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 127 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 127 por una sustitución de aminoácido; o
- 15 aa) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 13 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 13 por una sustitución de aminoácido; CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 19 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 19 por una o más sustituciones de aminoácido; CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 129 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 129 por una sustitución de aminoácido; y
- 20 un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 10 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 10 por una sustitución de aminoácido; CDR2-L de secuencia 'KVS' o una secuencia que se diferencia de la secuencia 'KVS' por una sustitución de aminoácido y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 11 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 11 por una sustitución de aminoácido; o
- 25 bb) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 103 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 103 por una sustitución de aminoácido; CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 104 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 104 por una o más sustituciones de aminoácido; CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 105 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 105 por una sustitución de aminoácido; y
- 30 un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 133 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 133 por una sustitución de aminoácido; CDR2-L de secuencia 'LVS' o una secuencia que se diferencia de la secuencia 'LVS' por una sustitución de aminoácido y CDR3-L de

secuencia SEQ ID NO: 134 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 134 por una sustitución de aminoácido.

Uno o más aminoácidos individuales pueden alterarse por sustitución, en particular por sustitución conservativa, en una o más de las secuencias CDR anteriores.

- 5 Dicha alteración puede pretenderse por ejemplo para eliminar un sitio de glicosilación o un sitio de desamidación, en conexión con la humanización del anticuerpo.

Tomando como base los alineamientos de las secuencias de las regiones VH y VL de “20G6-F3”, “4B4-D7”, “4E7-C9”, “18F5-H10”, “11D7-C3”, “11H3-E5”, “13H2-C2”, “13C1-F6”, “1E6-C9”, “10F4-C10”, “10E6-G6”, “18G9-H11”, “11F3-B9”, “12G3-E8”, “5B1-
10 G2”, “16F8-A7”, “11F9-F8”, “20E5-F10”, “20B5-F10” y “3H6-D2” se identificaron diferentes sustituciones de aminoácido. Por lo tanto, en una realización, se sustituye un aminoácido:

- en CDR1-H en una o más de las posiciones 3 a 6, por ejemplo en la posición 3, 5 ó 6 de CDR1-H de secuencia GFTFSNAW (SEQ ID NO: 13) o por ejemplo en la
15 posición 4 y 5 de CDR1-H de secuencia GFTFSNAW (SEQ ID NO: 13); y/o

- en CDR2-H, en una o más de las posiciones 3 a 5, 7 y 9, por ejemplo, en las posiciones 3, 4, 5, 7 ó 9 de CDR2-H de secuencia IKAKSNNYAT (SEQ ID NO: 37), o por ejemplo en las posiciones 3 y 5 ó 3 y 7 de CDR2-H de secuencia IKAKSNNYAT (SEQ ID NO: 37); y/o

- 20 - en CDR3-H, en una o más de las posiciones 2 a 4, 7 a 10 y 12, por ejemplo, en las posiciones 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9 y 10 o en las posiciones 2, 4, 6, 8, 10 y 12 o en las posiciones 2, 3, 7 y 8 de CDR3-H de secuencia RGVYYALSPFDY (SEQ ID NO: 8), o en la posición 7 y 8 de CDR3-H de secuencia RGLYYGLSPSDY (SEQ ID NO: 38), o en la posición en las posiciones 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9 y 10 de CDR3-H de secuencia
25 RGLYYGLSPSDY (SEQ ID NO: 38); y/o

- en CDR1-L, en una o más de las posiciones 2, 4, 6, y 9, por ejemplo, en la posición 6 de CDR1-L de secuencia QSLVHDNGNTY (SEQ ID NO: 17) o QSLVHTNGNTY (SEQ ID NO: 27) o en la posición 2 de CDR1-L de secuencia QSLVHNNNGNTY (SEQ ID NO : 10) o QRLVHNNNGNTY (SEQ ID NO : 113) o en la
30 posición 4, 6 y 9 de CDR1-L de secuencia QSLVHNNNGNTY (SEQ ID NO : 10); y/o

- en CDR3-L, en una o más de las posiciones 4 y 5, por ejemplo, en la posición 4 de CDR3-L de secuencia GQGSQYPFT (SEQ ID NO: 71) o GQGTQYPFT (SEQ ID NO: 11), o en la posición 4 y 5 de CDR3-L de secuencia GQGAHYPT (SEQ ID NO: 88) o en la posición 5 de CDR3-L de secuencia GQGTHYPFT (SEQ ID NO: 28)

o GQGTEYPFT (SEQ ID NO: 114).

El anticuerpo anti-CD3 según la invención es en particular un anticuerpo convencional, en particular un anticuerpo monoclonal convencional, o un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo biespecífico o multiespecífico.

El anticuerpo anti-CD3 según la invención en particular comprende o consiste en una IgG, o un fragmento de ésta.

Según una realización adicional, la invención se refiere a un anticuerpo anti-CD3, que comprende:

- a) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 6, CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 7, CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 8 y un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 142, CDR2-L de secuencia 'KVS' y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 11; o
- b) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 13, CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 14, CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 15, y un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 184, CDR2-L de secuencia 'KVS'y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 11; o
- c) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 13, CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 19, CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 20, y un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 22, CDR2-L de secuencia 'KVS'y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 11; o
- d) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 24, CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 19, CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 25 y un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 27, CDR2-L de secuencia 'KVS'y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 28; o

- 5 f) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 13, CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 37, CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 38 y un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 10, CDR2-L de secuencia 'KVS' y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 28; o
- 10 g) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 13, CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 37, CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 41 y un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 17, CDR2-L de secuencia 'KVS' y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 11; o
- 15 h) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 13, CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 37, CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 44 y un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 10, CDR2-L de secuencia 'KVS' y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 11; o
- 20 i) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 13, CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 37, CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 47 y un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 10, CDR2-L de secuencia 'KVS' y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 11; o
- 25
- 30 k) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 57, CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 37, CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 58 y un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 10, CDR2-L de secuencia 'KVS' y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 28; o
- l) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 13, CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 37, CDR3-H de secuencia

SEQ ID NO: 61 y un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 10, CDR2-L de secuencia 'KVS' y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 11; o

- 5 m) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 64, CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 65, CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 47 y un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 67, CDR2-L de secuencia 'KVS' y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 28; o
- 10 n) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 13, CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 37, CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 69 y un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 10, CDR2-L de secuencia 'KVS' y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 71; o
- 15 o) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 13, CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 37, CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 84 y un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 17, CDR2-L de secuencia 'KVS' y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 11; o
- 20 p) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 75, CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 76, CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 77 y un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 10, CDR2-L de secuencia 'KVS' y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 11; o
- 25 q) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 80, CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 76, CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 81 y un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 10, CDR2-L de secuencia 'KVS' y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 11; o
- 30 r) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 13, CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 37, CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 84 y un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 10, CDR2-L de secuencia 'KVS' y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 11; o

5 s) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 13, CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 37, CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 47 y un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 10, CDR2-L de secuencia 'KVS' y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 88; o

10 v) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 103, CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 104, CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 105 y un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 10, CDR2-L de secuencia 'KVS' y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 11; o

15 w) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 80, CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 19, CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 108 y un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 10, CDR2-L de secuencia 'KVS' y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 11; o

20 x) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 13, CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 37, CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 111 y un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 113, CDR2-L de secuencia 'KVS' y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 114; o

25 aa) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 13, CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 19, CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 129 y un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 10, CDR2-L de secuencia 'KVS' y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 11.

30 La invención también proporciona un anticuerpo anti-CD3 que comprende al menos el dominio variable de cadena pesada y/o el dominio variable de cadena ligera de uno de los denominados anticuerpos anti-CD3 listados anteriormente.

Así, la invención se refiere en particular a un anticuerpo anti-CD3, que comprende:

- a) un dominio variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID NO: 5 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, y/o un dominio variable de cadena ligera de secuencia SEQ ID NO: 9, o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta; o
- 5 b) un dominio variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID NO: 12 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, y/o un dominio variable de cadena ligera de secuencia SEQ ID NO: 16, o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta; o
- 10 c) un dominio variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID NO: 18 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, y/o un dominio variable de cadena ligera de secuencia SEQ ID NO: 21, o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta; o
- 15 d) un dominio variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID NO: 23 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, y/o un dominio variable de cadena ligera de secuencia SEQ ID NO: 26, o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta; o
- 20 e) un dominio variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID NO: 29 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, y/o un dominio variable de cadena ligera de secuencia SEQ ID NO: 33, o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta; o
- f) un dominio variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID NO: 36 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, y/o un dominio variable de cadena ligera de secuencia SEQ ID NO: 39, o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta; o
- 25 g) un dominio variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID NO: 40 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, y/o un dominio variable de cadena ligera de secuencia SEQ ID NO: 42, o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta; o
- 30 h) un dominio variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID NO: 43 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, y/o un dominio variable de cadena ligera de secuencia SEQ ID NO: 45, o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta; o
- i) un dominio variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID NO: 46 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, y/o un dominio variable de cadena

ligera de secuencia SEQ ID NO: 48, o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta; o

5 j) un dominio variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID NO: 49 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, y/o un dominio variable de cadena ligera de secuencia SEQ ID NO: 53, o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta; o

10 k) un dominio variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID NO: 56 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, y/o un dominio variable de cadena ligera de secuencia SEQ ID NO: 59, o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta; o

l) un dominio variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID NO: 60 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, y/o un dominio variable de cadena ligera de secuencia SEQ ID NO: 62, o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta; o

15 m) un dominio variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID NO: 63 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, y/o un dominio variable de cadena ligera de secuencia SEQ ID NO: 66, o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta; o

20 n) un dominio variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID NO: 68 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, y/o un dominio variable de cadena ligera de secuencia SEQ ID NO: 70, o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta; o

25 o) un dominio variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID NO: 72 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, y/o un dominio variable de cadena ligera de secuencia SEQ ID NO: 73, o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta; o

30 p) un dominio variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID NO: 74 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, y/o un dominio variable de cadena ligera de secuencia SEQ ID NO: 78, o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta; o

q) un dominio variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID NO: 79 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, y/o un dominio variable de cadena ligera de secuencia SEQ ID NO: 82, o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta; o

- r) un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia SEQ ID NO: 83 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, y/o un dominio variable de cadena ligera de secuencia SEQ ID NO: 85, o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta; o
- 5 s) un dominio variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID NO: 46 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, y/o un dominio variable de cadena ligera de secuencia SEQ ID NO: 87, o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta; o
- 10 t) un dominio variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID NO: 89 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, y/o un dominio variable de cadena ligera de secuencia SEQ ID NO: 92, o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta; o
- 15 u) un dominio variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID NO: 95 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, y/o un dominio variable de cadena ligera de secuencia SEQ ID NO: 99, o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta; o
- 20 v) un dominio variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID NO: 102 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, y/o un dominio variable de cadena ligera de secuencia SEQ ID NO: 106, o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta; o
- w) un dominio variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID NO: 107 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, y/o un dominio variable de cadena ligera de secuencia SEQ ID NO: 109, o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta; o
- 25 x) un dominio variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID NO: 110 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, y/o un dominio variable de cadena ligera de secuencia SEQ ID NO: 112, o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta; o
- 30 y) un dominio variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID NO: 115 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, y/o un dominio variable de cadena ligera de secuencia SEQ ID NO: 119, o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta; o
- z) un dominio variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID NO: 121 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, y/o un dominio variable de cadena

ligera de secuencia SEQ ID NO: 125, o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta; o

aa) un dominio variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID NO: 128 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, y/o un dominio variable de cadena ligera de secuencia SEQ ID NO: 130, o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta; o

bb) un dominio variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID NO: 131 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, y/o un dominio variable de cadena ligera de secuencia SEQ ID NO: 132, o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta.

Por ejemplo, la secuencia del dominio variable de cadena pesada o ligera puede diferenciarse de la secuencia de referencia SEQ ID NO: 5, 9, 12, 16, 18, 21, 23, 26, 29, 33, 36, 39, 40, 42, 43, 45, 46, 48, 49, 53, 56, 59, 60, 62, 63, 66, 68, 70, 72, 73, 74, 78, 79, 82, 83, 85, 87, 89, 92, 95, 99, 102, 106, 107, 109, 110, 112, 115, 119, 121, 125, 128, 130, 131, 132, según sea apropiado, por una o más sustituciones de aminoácidos, en particular por una o más sustituciones de aminoácidos conservativas y/o sustituciones con residuos canónicos. En particular, la secuencia del dominio variable de cadena pesada o ligera puede diferenciarse de la secuencia de referencia SEQ ID NO: 5, 9, 12, 16, 18, 21, 23, 26, 29, 33, 36, 39, 40, 42, 43, 45, 46, 48, 49, 53, 56, 59, 60, 62, 63, 66, 68, 70, 72, 73, 74, 78, 79, 82, 83, 85, 87, 89, 92, 95, 99, 102, 106, 107, 109, 110, 112, 115, 119, 121, 125, 128, 130, 131, 132, sólo por sustitución o sustituciones de aminoácidos conservativas.

Las alteraciones de la secuencia comparada con la secuencia SEQ ID NO: 5, 9, 12, 16, 18, 21, 23, 26, 29, 33, 36, 39, 40, 42, 43, 45, 46, 48, 49, 53, 56, 59, 60, 62, 63, 66, 68, 70, 72, 73, 74, 78, 79, 82, 83, 85, 87, 89, 92, 95, 99, 102, 106, 107, 109, 110, 112, 115, 119, 121, 125, 128, 130, 131, 132 estarán presentes en particular esencialmente en una o más de las regiones marco, FR1-L, FR2-L, FR3-L, FR4-L y/o FR1-H, FR2-H, FR3-H, FR4-H.

Sin embargo, las sustituciones de aminoácidos en una o más CDR también son posibles. En particular, la secuencia del dominio variable de cadena ligera puede diferenciarse de la secuencia SEQ ID NO: 9 al menos por una sustitución S a R en la posición 28 de SEQ ID NO: 9 (en CDR1-L), y/o al menos por una sustitución V a E en la posición 30 de SEQ ID NO: 9 (en CDR1-L), y/o al menos por una sustitución N a D o T en la posición 33 de SEQ ID NO: 9 (en CDR1-L), y/o al menos por una sustitución N a Y

en la posición 35 de SEQ ID NO: 9 (en CDR1-L) y/o la secuencia del dominio variable de cadena ligera puede diferenciarse de la secuencia SEQ ID NO: 9 al menos por una sustitución T a S o A en la posición 97 de SEQ ID NO: 9 (en CDR3-L), y/o al menos por una sustitución Q a H o E en la posición 98 de SEQ ID NO: 9 (en CDR3-L) y/o el dominio variable de cadena pesada puede diferenciarse de la secuencia SEQ ID NO: 5 al menos por una sustitución T a N o S en la posición 28 de SEQ ID NO: 5 (en CDR1-H), y/o al menos por una sustitución F a V en la posición 29 de SEQ ID NO: 5 (en CDR1-H), o al menos por una sustitución T a N o Y en la posición 30 de SEQ ID NO: 5 (en CDR1-H), o al menos por una sustitución K a L o Y en la posición 31 de SEQ ID NO: 5 (en CDR1-H) y/o el dominio variable de cadena pesada puede diferenciarse de la secuencia SEQ ID NO: 5 al menos por una sustitución D a A en la posición 53 de SEQ ID NO: 5 (en CDR2-H), o al menos por una sustitución K a R en la posición 54 de SEQ ID NO: 5 (en CDR2-H), o al menos por una sustitución S a A en la posición 55 de SEQ ID NO: 5 (en CDR2-H), o al menos por una sustitución S a N en la posición 57 de SEQ ID NO: 5 (en CDR2-H), o al menos por una sustitución A a E en la posición 59 de SEQ ID NO: 5 (en CDR2-H) y/o el dominio variable de cadena pesada puede diferenciarse de la secuencia SEQ ID NO: 5 al menos por una sustitución G a A en la posición 100 de SEQ ID NO: 5 (en CDR3-H), y/o al menos por una sustitución T a V en la posición 101 de SEQ ID NO: 5 (en CDR3-H), al menos por una sustitución Q a Y en la posición 102 de SEQ ID NO: 5 (en CDR3-H).

En una realización, el anticuerpo anti-CD3 de la invención y un fragmento de éste es, respectivamente, un anticuerpo de rata y un fragmento de un anticuerpo de rata.

En un aspecto de la invención, el anticuerpo anti-CD3 de la invención también puede ser un anticuerpo quimérico, y en particular un anticuerpo de rata/humano, por ejemplo, un anticuerpo que comprende dominios variables de rata de cadenas pesada y ligera y un dominio CH y un dominio CL de un anticuerpo humano.

En un aspecto adicional de la invención, el anticuerpo anti-CD3 también puede ser un anticuerpo humanizado o un fragmento de un anticuerpo humanizado obtenido, por ejemplo, por injerto de CDR o por el método 4D (US20110027266).

De acuerdo con esto, en una realización, el anticuerpo anti-CD3 de la invención es un anticuerpo humanizado que comprende

- a) un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 135, SEQ ID

NO: 136, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 144, SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 147, SEQ ID NO: 152, SEQ ID NO: 153, y un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 140, SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 148, SEQ ID NO: 149, SEQ ID NO: 150, SEQ ID NO: 151, SEQ ID NO: 154, SEQ ID NO: 155, SEQ ID NO: 156, SEQ ID NO: 157, o

b) un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 172, SEQ ID NO: 173, SEQ ID NO: 174, SEQ ID NO: 175, SEQ ID NO: 176, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 178, SEQ ID NO: 179, SEQ ID NO: 180, SEQ ID NO: 181, SEQ ID NO: 183, y un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 160, SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO: 162, SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 164, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 166, SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 168, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 170, SEQ ID NO: 182.

Según una realización adicional, el anticuerpo anti-CD3 de la invención es un anticuerpo humanizado que comprende

- a) un dominio variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID NO: 138 y/o un dominio variable de cadena ligera de secuencia SEQ ID NO: 143; o
- b) un dominio variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID NO: 171 y/o un dominio variable de cadena ligera de secuencia SEQ ID NO: 158; o
- c) un dominio variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID NO: 176 y/o un dominio variable de cadena ligera de secuencia SEQ ID NO: 164.

En una realización, el anticuerpo anti-CD3 según la invención comprende las tres secuencias CDR o el dominio variable de la cadena pesada, o las seis secuencias CDR o dominios variables de las cadenas pesada y ligera de uno de los denominados anticuerpos anti-CD3 listados anteriormente.

La invención se refiere además a un fragmento del anticuerpo anti-CD3 humanizado como se ha definido anteriormente. En una realización, el anticuerpo anti-CD3 humanizado descrito anteriormente es un anticuerpo quimérico.

El anticuerpo anti-CD3 según la invención también puede ser un anticuerpo de dominio único o un fragmento de éste. En particular, un fragmento de anticuerpo de dominio único puede consistir en una cadena pesada variable (VHH) que comprende la CDR1-H, CDR2-H y CDR3-H de uno de los anticuerpos descritos anteriormente. El anticuerpo anti-CD3 también puede ser un anticuerpo de cadena pesada, es decir, un anticuerpo desprovisto de cadena ligera, que puede contener o no un dominio CH1.

El anticuerpo de dominio único o un fragmento de éste también puede comprender las regiones marco de un anticuerpo de dominio único de camélido, y opcionalmente el dominio constante de un anticuerpo de dominio único de camélido.

El anticuerpo anti-CD3 según la invención también puede ser un fragmento de anticuerpo, en particular un fragmento de anticuerpo humanizado, seleccionado del grupo que consiste en Fv, Fab, F(ab')₂, Fab', dsFv, (dsFv)₂, scFv, sc(Fv)₂, y fragmentos divalentes.

De acuerdo con esto, el anticuerpo anti-CD3 de la invención es un Fab que comprende, o consiste en

- a) la secuencia de aminoácidos de cadena pesada SEQ ID NO: 186 y/o la secuencia de aminoácidos de cadena ligera SEQ ID NO: 187; o
- b) la secuencia de aminoácidos de cadena pesada SEQ ID NO: 188 y/o la secuencia de aminoácidos de cadena ligera SEQ ID NO: 189; o
- c) la secuencia de aminoácidos de cadena pesada SEQ ID NO: 190 y/o la secuencia de aminoácidos de cadena ligera SEQ ID NO: 191; o
- d) la secuencia de aminoácidos de cadena pesada SEQ ID NO: 192 y/o la secuencia de aminoácidos de cadena ligera SEQ ID NO: 193.

En una realización, el anticuerpo de CD3 es un anticuerpo biespecífico o multiespecífico formado a partir de al menos un fragmento de anticuerpo o al menos un dominio variable de los anticuerpos anti-CD3 de la invención. Los anticuerpos multiespecíficos son complejos proteicos polivalentes como se describe por ejemplo en EP 2 050 764 A1 o US 2005/0003403 A1.

Los anticuerpos de CD3 biespecíficos o multiespecíficos según la invención pueden tener especificidad para (a) dominio extracelular de CD3 humana o humana y de *Macaca fascicularis*, diana de uno o más de los anticuerpos anti-CD3 descritos anteriormente y (b) al menos un otro antígeno.

En una realización, el otro antígeno es CD123 y de acuerdo con esto el anticuerpo biespecífico resultante es un anticuerpo biespecífico de CD3/CD123. Los anticuerpos biespecíficos convencionales pueden producirse por técnicas que son conocidas para el experto en la técnica.

5 Los anticuerpos y fragmentos de los anticuerpos anti-CD3 según la invención pueden usarse en una forma aislada (por ejemplo, purificada) o estar contenidos en un vector, tal como una vesícula de membrana o lípido (por ejemplo, un liposoma).

En una realización adicional, el anticuerpo anti-CD3 de la invención es para uso para la preparación de una proteína de unión semejante a anticuerpo de la invención
10 definida adicionalmente en la sección "proteína de unión semejante a anticuerpo".

Cualquier combinación de las realizaciones anteriores forma parte de la invención.

Anticuerpos anti CD123

"CD123" (Agrupación de Diferenciación 123) también se conoce como "Receptor
15 de interleuquina 3, alfa (IL3RA)" o "IL3R", "IL3RX", "IL3RY", "IL3RAY", "hIL-3Ra" e indica una subunidad específica de interleuquina 3 de un receptor de citoquina heterodimérico. El receptor funcional de interleuquina 3 es un heterodímero que comprende una cadena alfa específica (IL-3A; CD123) y la cadena beta del receptor de IL-3 (β_0 ; CD 131) que se comparte con los receptores para el factor estimulante de colonias de granulocitos
20 macrófagos (GM-CSF) e interleuquina 5 (IL-5). CD123 es una proteína transmembrana integral de tipo I con un Peso Molecular deducido de aproximadamente 43kDa que contiene un dominio extracelular implicado en la unión a IL-3, un dominio transmembrana y una cola corta citoplásmica de aproximadamente 50 aminoácidos. El dominio extracelular está compuesto por dos regiones: una región N-terminal de
25 aproximadamente 100 aminoácidos, cuya secuencia presenta similitud con regiones equivalentes de las cadenas alfa del recepto de GM-CSF e IL-5; y una región proximal al dominio transmembrana que contiene cuatro residuos de cisteína conservados y un resto WSXWS, común a otros miembros de esta familia de receptores de citoquinas. El dominio de unión a IL-3 comprende aproximadamente 200 residuos de aminoácidos de
30 restos de receptor de citoquina (CRM) compuestos por dos dominios de plegamiento semejantes a Ig. El dominio extracelular de CD123 está altamente glicosilado, siendo la N-glicosilación necesaria tanto para la unión del ligando como la señalización del receptor. La familia de proteínas reúne tres miembros: IL3RA (CD123A), CSF2RA e

IL5RA. La estructura global está bien conservada entre los tres miembros pero las homologías de secuencia son muy bajas. Una isoforma de CD123 de 300 aminoácidos de longitud se ha descubierto hasta ahora, pero sólo a nivel de ARN que es accesible en la base de datos Getentry con el número de registro ACM24116.1.

5 La Patente US No. 6.177.078 describe el anticuerpo monoclonal anti-cadena alfa del receptor de IL-3 (IL-3R α , CD123) 7G3, y la capacidad de 7G3 de unirse al dominio N-terminal, específicamente a los residuos de aminoácidos 19-49, de IL-3R α . La Patente US No. 6.733.743 describe un método para afectar a una célula progenitora de cáncer hematológico que expresa CD123 pero no expresa significativamente CD131,
10 poniendo en contacto la célula con una composición de un anticuerpo y un agente citotóxico (seleccionado de un agente quimioterapéutico, una toxina o un radioisótopo emisor alfa) mediante el cual la composición se une selectivamente a CD123 en una cantidad efectiva para causar la muerte celular. Sin embargo, ha permanecido sin aclarar si el direccionamiento sobre CD123 puede afectar funcionalmente a las AML-
15 LSC.

 Una secuencia de referencia de la proteína CD123 humana de longitud completa, incluyendo el péptido señal, está disponible en la base de datos NCBI con el número de registro NP_002174.1 y con el número de registro de Uniprot P26951 y está descrita en la presente memoria bajo SEQ ID NO: 194 (según está disponible el 14 de
20 diciembre, 2014). Una secuencia de referencia de la proteína CD123 de *Macaca fascicularis* de longitud completa, incluyendo el péptido señal, está disponible en la base de datos GenBank con el número de registro EHH61867.1 y con el número de registro de Uniprot G8F3K3 y está descrita en la presente memoria bajo SEQ ID NO: 195 (según está disponible el 14 de diciembre, 2014).

25 Una secuencia de una proteína de fusión CD123 humana madura Fc etiquetada con Strep-II, clonada por los inventores a partir de ADN genómico, se describe bajo SEQ ID NO: 196. Dicha proteína de fusión CD123 humana madura Fc comprende los aminoácidos 19 a 305 de la proteína CD123 humana de longitud completa y comprende así el dominio extracelular de CD123 humana.

30 Una secuencia de una proteína de fusión CD123 de *Macaca fascicularis* madura Fc etiquetada con Strep-II, clonada por los inventores a partir de ADNc, se describe bajo SEQ ID NO: 197. Dicha proteína de fusión CD123 madura de *Macaca fascicularis* Fc comprende los aminoácidos 19 a 305 de la proteína CD123 de longitud completa de

Macaca fascicularis y comprende así el dominio extracelular de CD123 de *Macaca fascicularis*.

La organización de dominios de CD123 humana y de *Macaca fascicularis* es como sigue (basado en la secuencia de CD123 humana accesible en la base de datos NCBI con el número de registro NP_002174.1 (SEQ ID NO: 194) y basado en la secuencia de CD123 de *Macaca fascicularis* accesible en la base de datos Uniprot con el número de registro G8F3K3, SEQ ID NO: 195):

Dominios de CD123 humano	Posiciones en SEQ ID NO : 194 (humano)	Posiciones en SEQ ID NO : 195 (<i>Macaca fascicularis</i>)
Extracelular	19 - 305	19 - 305
Dominio transmembrana	306 - 325	306 - 325
Citoplásmico	326 - 378	326 - 378

De acuerdo con esto, el dominio extracelular de CD123 humana consiste en los aminoácidos en las posiciones 19–305 de SEQ ID NO: 194.

10

CD123 (la cadena alfa del receptor de interleuquina-3 IL-3R α) es un antígeno tumoral sobre-expresado en una variedad de neoplasmas hematológicos. La mayoría de blastos de AML expresa CD123 superficial y esta expresión no varía por subtipo de AML. Se ha reportado que la mayor expresión de CD123 en AML en el diagnóstico está asociada con un peor pronóstico. La expresión de CD123 se ha reportado en otras malignidades hematológicas incluyendo mielodisplasia, mastocitosis sistémica, neoplasma de células dendríticas plasmacitoide blástico (BPDCN), ALL y leucemia de células pilosas.

15

CD123 se expresa en células madre leucémicas AML y evidencias crecientes sugieren que AML surge a partir de estas LSC que han mostrado ser quiescentes y relativamente resistentes a quimioterapia dañina para el ADN. Se establece como hipótesis que la persistencia de las LSC apoya la recidiva después de la remisión inicial y así la erradicación de las LSC puede considerarse un requerimiento para la cura, y un objetivo terapéutico importante.

20

Las “células madre leucémicas (LSC)” son células de cáncer que poseen características asociadas con las células madre normales, esto es, la propiedad de auto

25

renovación y la capacidad de desarrollar múltiples linajes. Se propone que dichas células persisten en los cánceres hematológicos tales como AML como poblaciones distintas. Las LCS presentes en pacientes con AML se denominan “AML-LCS”.

La “leucemia mielógena aguda (AML)” es un trastorno clonal que se presenta
5 clínicamente como proliferación incrementada de blastos mieloides heterogéneos e indiferenciados. La jerarquía leucémica se mantiene por una pequeña población de LSC (AML-LCS), que tienen la capacidad distintiva de auto-renovación, y son capaces de diferenciarse en progenitores leucémicos. Estos progenitores generan los grandes números de blastos leucémicos fácilmente detectables en el diagnóstico y recidiva,
10 dando lugar finalmente a mortalidad. Las AML-LSC se ha reportado comúnmente como células quiescentes, a diferencia de los progenitores clonogénicos que se dividen rápidamente. Esta propiedad de las AML-LSC hacen que los quimioterapéuticos convencionales dirigidos a células que proliferan sean menos efectivos, explicando potencialmente la experiencia actual en la que una alta proporción de pacientes con
15 AML entran en remisión completa, pero casi invariablemente recaen, con <30% de adultos sobreviviendo durante más de 4 años. Además, la aparición de enfermedad residual mínima y baja supervivencia se ha atribuido a alta frecuencia de LSC en el diagnóstico en pacientes con AML. Consecuentemente, es imperativo para la gestión a largo plazo de AML (y de manera similar otras afecciones de cáncer hematológico mencionadas anteriormente) que se desarrollen nuevos tratamientos para eliminar
20 específicamente las LSC.

La sobre-expresión de CD123 se ha reportado en blastos de AML y en AML-LSC CD34⁺/CD38 respecto a células hematopoyéticas normales.

CD123 proporciona así una diana terapéutica importante para la terapia del
25 cáncer, en particular para la terapia del cáncer en pacientes que tienen un mal pronóstico.

Los inventores han tenido éxito en la generación, cribado y selección de anticuerpos anti-CD123 específicos de ratón y rata que presentan alta afinidad para la
30 proteína CD123 tanto humana como de *Macaca fascicularis*, y que no reaccionan de manera cruzada significativamente con las proteínas CSF2RA e IL5RA humanas, ni con proteínas CD3 de *Macaca fascicularis*.

Los inventores han determinado la secuencia de cadenas pesada y ligera variables de dichos anticuerpos monoclonales, los anticuerpos anti-CD123 denominados “3E3-D3”, “1E1-G5”, “2B8-F3”, “2F8-D6”, “3B10-E6”, “5A5-B4”, “6B10-E4”, “6C10-C4”, “6D6-B8”, “8B11-B7”, “9B8-G6”, “9D7-C8”, y “9F6-G3”.

5

El anticuerpo anti-CD123 denominado “3E3-D3” comprende:

- un dominio variable de cadena pesada que consiste en la secuencia QVQLQESGPGLVQPSQTLSTCTVSG**FSLT**TYDVHWVRQPPGKGLEWMGR**IQNGGIT** DYN SALKSR LIISRDTSKSQVFLKMNSVQTEDTAMYFC**AKTGSYFYAFD**HWGQGT LVT VSS (SEQ ID NO: 226, con las CDR mostradas en caracteres en negrita) que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 227, una CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 228, y una CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 229 , o
- un dominio variable de cadena pesada que consiste en la secuencia QVQLQESGPGLVQPSQTLSTCTVSG**FSLT**TYDVHWVRQPPGKGLEWMGR**IQNAGIT** DYN SALKSR LIISRDTSKSQVFLKMNSVQTEDTAMYFC**AKTGSYFYAFD**HWGQGT LVT VSS (SEQ ID NO: 277, con las CDR mostradas en caracteres en negrita) que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 227, una CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 353, y una CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 229 , o
- un dominio variable de cadena pesada que consiste en la secuencia QVQLQESGPGLVQPSQTLSTCTVSG**FSLT**TYDVHWVRQPPGKGLEWMGR**IQDGGIT**DYN SALKSR LIISRDTSKSQVFLKMNSVQTEDTAMYFC**AKTGSYFYAFD**HWGQGT LVT VSS (SEQ ID NO: 278, con las CDR mostradas en caracteres en negrita) que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 227, una CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 279, y una CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 229, y un
- dominio variable de cadena ligera que consiste en la secuencia QFVLTQPN SVSTNLGSTVKLSCKRNT**TGNIGSNY**VN WYQQHEGRSPTTMIY**RDD**KRPD GVPDRFSGSIDRSSNSALLTINN VQTEDEADYFC**QSYSSGINII**FGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 230, con las CDR mostradas en caracteres en negrita) que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 231, una CDR2-L que consiste en la secuencia ‘RDD’, y una
- CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 232.

El anticuerpo anti-CD123 denominado “1E1-G5” comprende:

-un dominio variable de cadena pesada que consiste en la secuencia QVQLQESGPTLVKPGDSVKMSCKAF**GYTFDHI**IHWVKQSHGKSLEWIGY**INPYSGGT**

NYNEKFKSKATLTVDKSSSTAYMEFSRLTSEDSAICYC**ALNYGSYYAMDA**WGQGTSV TVSS (SEQ ID NO: 198, con las CDR mostradas en caracteres en negrita) que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 199, una CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 200, y una CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 201, y

un dominio variable de cadena ligera que consiste en la secuencia DIQMTQSPASLSASLGQTVTIECRPSE**EDIYSN**LAWFQQKPGSSPQLLIY**DAN**NLADGVP SRFSGSGSGTQYSLKINSLSQSEDVASYFC**QOYNKYPYT**FGTGKLELK (SEQ ID NO: 202, con las CDR mostradas en caracteres en negrita) que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 203, una CDR2-L que consiste en la secuencia 'DAN', y una CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 204.

El anticuerpo anti-CD123 denominado "2BB-F3" comprende:

- un dominio variable de cadena pesada que consiste en la secuencia EVQLVESGGGLVQPGRSLKLSCAAS**GFTFSDYN**MAWVRQAPKKGLEWVAT**ILYDGGR** TYYRGSVKGRFTISRDNASTLYLRMDSLRSEDATYYC**ATHSRGTDYFDY**WGQGVMTVSS (SEQ ID NO: 205, con las CDR mostradas en caracteres en negrita) que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 206, una CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 207, y una CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 208, y

- un dominio variable de cadena ligera que consiste en la secuencia EIVLTQSPSTMTASPGEQVTITCRASS**SSINYM**HWYQQKPGASPRPWIY**ETSK**LASGVPDRFSGSASGTSYSLTINNMEAEDAATYYC**QOWNYPSWT**FGGGTKLELK (SEQ ID NO: 209, con las CDR mostradas en caracteres en negrita) que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 210, una CDR2-L que consiste en la secuencia 'ETS', y una CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 211.

El anticuerpo anti-CD123 denominado "2F8-D6" comprende:

- un dominio variable de cadena pesada que consiste en la secuencia QVQLKESGPGLVQPSQTLSTCTVSG**GFSLTSYG**VSWVRQPPGKGLEWIAT**ISSAGSTY** YDLVLKSRLSITRDTSKSQVFLKVHSLQTEDTAIYLC**ARDAPVFNYGSYNAMDS**WGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO: 212, con las CDR mostradas en caracteres en negrita) que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 213, una CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 214, y una CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 215, y

- un dominio variable de cadena ligera que consiste en la secuencia DIQMTQSPSFLSATVGDRVLTINCKASQNINKYLNWYQQKLGEAPKRLIYNTNSLQTGIPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYFCLQHKSGLTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 216, con las CDR mostradas en caracteres en negrita) que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 217, una CDR2-L que consiste en la secuencia 'NTN', y una CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 218.

El anticuerpo anti-CD123 denominado "3B10-E6" comprende:

- un dominio variable de cadena pesada que consiste en la secuencia QVQLQQSGPELRRPGSSVRLSCKASGYRIKDFLIHWIKNRPEHGLEWIGWIDDPEDGETKYAQKFQTKATLTADTSSNTAYMQLSSLTSEDATYFCARWGDVYYGLMRGHVMDAWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO: 219, con las CDR mostradas en caracteres en negrita) que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 220, una CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 221, y una CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 222, y
- un dominio variable de cadena ligera que consiste en la secuencia DVLMTQTPVSLPVSLGGQVSISCRSSQSLVHSDGDTYLHWYLQKPGQSPQLLIYRVSNRFGSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEPEDLGLYYCLOTTFPPWTFGGGTKLEMK (SEQ ID NO: 223, con las CDR mostradas en caracteres en negrita) que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 224, una CDR2-L que consiste en la secuencia 'RVS', y una CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 225.

El anticuerpo anti-CD123 denominado "5A5-B4" comprende:

- un dominio variable de cadena pesada que consiste en la secuencia QIQIVQSGSDVTSTCNGCGTCYFSGFSLSLTGICVSWIRQPSGKGQEWLADFCWDDGKGYNPSLKNRLSISKDTSNNQVFLKITSVDATATYYCARRRVYYGIYFDYWGQGVMVTVSS (SEQ ID NO: 233, con las CDR mostradas en caracteres en negrita) que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 234, una CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 235, y una CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 236, y
- un dominio variable de cadena ligera que consiste en la secuencia DIVMTQSPALAVSPGERVSISCRASNSVSTRMHWYQQKPGQPKLLIYGASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLTIDPVEADDIATYFCQOSWNDPLTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 237, con las CDR mostradas en caracteres en negrita) que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 238, una CDR2-L que consiste en la secuencia 'GAS', y una CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 239.

El anticuerpo anti-CD123 denominado “6B10-E4” comprende:

- un dominio variable de cadena pesada que consiste en la secuencia EVQLVESGGGLVQPGRSLKLSCAAS**GFTFSHYN**MAWVRQAPKKGLEWVAT**ITYDDHS**
 5 **IYYRDSVKGRFTISRDTAKSTLYLQMDSLRSED**TATYYC**ARLVNYAFAY**WGQGLTVTV
 SS (SEQ ID NO: 240, con las CDR mostradas en caracteres en negrita) que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 241, una CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 242, y una CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 243, y

- un dominio variable de cadena ligera que consiste en la secuencia
 10 NIVMTQSPKSMISVGDRVMTMNCKAS**QTVGN**NI AWYQQK PGLSPQLLID**YAS**NRYTGV
 PNRFTGGGYGTDFTILTINSVQAEDAAFYCY**ORMYNSPT**FGGGTKLELK (SEQ ID NO: 244, con las CDR mostradas en caracteres en negrita) que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 245, una CDR2-L que consiste en la secuencia ‘YAS’, y una CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 246.

15

El anticuerpo anti-CD123 denominado “6C10-C4” comprende:

- un dominio variable de cadena pesada que consiste en la secuencia EVKLQESGPSLVQPSETLSLTCTVS**GFSLT**SVHWVRQHSGKSLEWMGR**MWNDGD**
 20 **TSYNSAFTSRLSISRDT**SKGQVFLKMNSLQTEDTGTYCY**ARGHRT**PFDYWGQGVMT
 VSS (SEQ ID NO: 247, con las CDR mostradas en caracteres en negrita) que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 248, una CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 249, y una CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 250, y

- un dominio variable de cadena ligera que consiste en la secuencia DIVMTQSPSSLAVSAGETVTINCKSS**QSFLSSGDER**NYVAWYQHKPGQSPKLLIY**WAS**
 25 **TRHSGVPDRFIGSGSGTDFTLTISSVQAED**LAIIYCY**QOYYDTPL**TFGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 251, con las CDR mostradas en caracteres en negrita) que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 252, una CDR2-L que consiste en la secuencia ‘WAS’, y una CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 253.

30

El anticuerpo anti-CD123 denominado “6D6-B8” comprende:

- un dominio variable de cadena pesada que consiste en la secuencia QVQLQESGPTLVKPGDSVKMSCKAS**AYTF**TDNIHWVKQSHGKSLDWIGY**INPYSGGT**
 NYNGWFRSKATLTVDKSSSTAYMEFSRLTSDDSAIYCY**ALNYGSYYAMDA**WGQGTSTV
 TVSS (SEQ ID NO: 254, con las CDR mostradas en caracteres en negrita) que

comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 255, una CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 200, y una CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 201, y

- un dominio variable de cadena ligera que consiste en la secuencia DIQMTQSPASLSASLGTVTIDCRPS**EDIFNN**LAWYQQKPGNSPQLLIY**DAN**SLADGVP
5 SRFSGSGSGTQYSLMIIRLQSEDVASYFC**HQYNIYPYT**FGAGTKLELK (SEQ ID NO: 256, con las CDR mostradas en caracteres en negrita) que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 257, una CDR2-L que consiste en la secuencia 'DAN', y una CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 258.

10 El anticuerpo anti-CD123 denominado "8B11-B7" comprende:

- un dominio variable de cadena pesada que consiste en la secuencia QVQLQESGPTLVNPGDSVKMSCKAS**GYTFTDHI**HWVKQSHGKSLEWIGY**INPYSGGA**
NYNGKFKSKATLTIDKSSSTAYMEFSRLTSGDSAIYYC**ALNYGSYYAMD**AWGQGTSVT
15 VSS (SEQ ID NO: 259, con las CDR mostradas en caracteres en negrita) que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 199, una CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 260, y una CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 201, y

- un dominio variable de cadena ligera que consiste en la secuencia DIQMTQSPASLSASLGTVTIECRTS**KDIYSN**LAWFQQEPGNSPQLLIY**DAS**NLADGVP
20 SRFSGSGSGTQYSLQINNQLQSEDVASYFC**HQYNNYPYT**FGTGTKLELK (SEQ ID NO: 261, con las CDR mostradas en caracteres en negrita) que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 262, una CDR2-L que consiste en la secuencia 'DAS', y una CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 263.

El anticuerpo anti-CD123 denominado "9B8-G6" comprende:

- 25 - un dominio variable de cadena pesada que consiste en la secuencia EVKLQESGPSLVQSSQTLSTCTVS**GFSLTSYHI**HWVRQPPGKGLEWMGV**MWSDGD**
TSYSSALKSRLSISRDTSQSQVFLKMNSLQTEDTATYYC**ARGDYSSYI**LWFAYWGQG
TLVTVSS (SEQ ID NO: 264, con las CDR mostradas en caracteres en negrita) que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 265, una CDR2-H de secuencia SEQ ID
30 NO: 266, y una CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 267, y

- un dominio variable de cadena ligera que consiste en la secuencia DIVMTQSPSSLAWSAGETVTINCKSS**QSFLSSGDERNY**VAWYQHKPGQSPKLLIY**WAS**
TRHSGVPDRFIGSGSGTDFLTITSSVQAEDLAIYYC**QOYYDTPLT**FGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 251, con las CDR mostradas en caracteres en negrita) que comprende CDR1-L

de secuencia SEQ ID NO: 252, una CDR2-L que consiste en la secuencia 'WAS', y una CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 253.

El anticuerpo anti-CD123 denominado "9D7-C8" comprende:

- 5 - un dominio variable de cadena pesada que consiste en la secuencia
 EVKLQESGPSLVQSSQTLSTCTVS**GFSLT****SYHI**HWVRQTPGKGLEWMGV**MWSDGDT**
 SYNSALKSRLSISRDTSSQSQVFLKMNSLQTEDTATYYC**ARGYYSSYLYLWFAY**WGQG
 TLVTVSS (SEQ ID NO: 268, con las CDR mostradas en caracteres en negrita) que
 comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 265, una CDR2-H de secuencia SEQ ID
 10 NO: 266, y una CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 269, y
 - un dominio variable de cadena ligera que consiste en la secuencia
 DIVMTQSPSSLAVSEGETVTINCKSS**QSFLSSGDGKNY**VAWYQYKPGQSPKLLIY**WAS**
 TRQSGVPDRFIGSGSGTDFTLTISTVQAEDLAIYYC**QOYYDTPLT**FGSGTKLEIK (SEQ
 ID NO: 270, con las CDR mostradas en caracteres en negrita) que comprende CDR1-L
 15 de secuencia SEQ ID NO: 271, una CDR2-L que consiste en la secuencia 'WAS', y una
 CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 253.

El anticuerpo anti-CD123 denominado "9F6-G3" comprende:

- 20 - un dominio variable de cadena pesada que consiste en la secuencia
 QVQLQESGPTLVKPGDSVKMSCKAS**GYTFTDYI**IHWVKQSHGKSLEWIGY**INPYSDGT**
 NYNEKFKSKATLTVDKSTSTAYMEFSRLTSEDSAIYFC**ALNYGSYYAMDA**WGQGTSVT
 VSS (SEQ ID NO: 272, con las CDR mostradas en caracteres en negrita) que
 comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 273, una CDR2-H de secuencia SEQ ID
 NO: 274, y una CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 201, y
 25 - un dominio variable de cadena ligera que consiste en la secuencia
 DIQMTQSPASLSASLGGETVTIECRP**SEDIHSN**VAWYQQKPGNSPQLLIY**DAS**NLADGVP
 SRFSGSGSGTQYSLKINSLSQSEDVASYFC**HQYNIYPYT**FGSGTKLELK (SEQ ID NO:
 275, con las CDR mostradas en caracteres en negrita) que comprende CDR1-L de
 secuencia SEQ ID NO: 276, una CDR2-L que consiste en la secuencia 'DAS', y una
 30 CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 258.

En un aspecto de la invención, el anticuerpo anti-CD123 se une a CD123 humano. En otra realización, el anticuerpo anti-CD123 se une además a CD123 de *Macaca fascicularis*. En particular, el anticuerpo anti-CD123 de la invención se une al dominio

extracelular de CD123 humano, o tanto de CD123 humano como de *Macaca fascicularis*. Más específicamente, el anticuerpo anti-CD123 se une al resto distal de CD123, por ejemplo, a los aminoácidos en la posición 19 a 49 de CD123 humano de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 194. El anticuerpo anti-CD123 se une a CD123, independientemente de si se expresa en forma aislada, o está presente en un dominio soluble extracelular o CD123 anclado a membrana de longitud completa como está presente en células que expresan CD123 tales como células AML o células transfectadas con CD123. El anticuerpo anti-CD123 según la invención es específico de células que expresan proteínas CD123 humanas y de *Macaca fascicularis* en su superficie, por ejemplo células de cáncer que expresan CD123.

El anticuerpo anti-CD123 según la invención tiene una proporción de afinidad para CD123 de *Macaca fascicularis* sobre afinidad para CD123 humana ($KD(\text{Macaca fascicularis})/KD(\text{humana})$) que es ≤ 10 , en particular ≤ 6 , ≤ 5 , ≤ 4 , ≤ 3 , ≤ 2 , ≤ 1 ó $\leq 0,5$. Así, el polipéptido según la invención puede usarse en estudios toxicológicos realizados en monos, siendo el perfil de toxicidad observado en monos relevante para anticipar efectos adversos potenciales en los seres humanos.

En particular, el anticuerpo anti-CD123 de la invención no se une a, o no reacciona de manera cruzada significativamente con proteínas CSF2RA e IL5RA.

En particular, el anticuerpo no se une a, o no reacciona de manera cruzada significativamente con el dominio extracelular de las proteínas CSF2RA e IL5RA humana y de *Macaca fascicularis* mencionadas anteriormente.

Además, el anticuerpo anti-CD123 según la invención tiene una afinidad (KD) para CD123 humana o CD123 de *Macaca fascicularis*, o ambas, de $\leq 50\text{nM}$, $\leq 40\text{nM}$, $\leq 30\text{nM}$ por ejemplo $\leq 20\text{nM}$, $\leq 15\text{nM}$, $\leq 10\text{nM}$, $\leq 8\text{nM}$, $\leq 6\text{nM}$, $\leq 4\text{nM}$, $\leq 2\text{nM}$, $\leq 1\text{nM}$ o $\leq 0,5\text{ nM}$, por ejemplo una afinidad de 0,1 nM a 20 nM, por ejemplo 0,1 nM a 10 nM, en particular de 0,1 nM a 2 nM, o de 0,1 nM a 1 nM.

En un ejemplo, la afinidad para CD3 humana o para CD3 de *Macaca fascicularis* se determina como el valor KD con resonancia de plasmón superficial usando proteína CD123 recombinante de ser humano y *Macaca fascicularis* como el antígeno de captura, por ejemplo con proteína de fusión CD123-Fc humana y de *Macaca fascicularis*.

Como antígeno puede usarse por ejemplo el dominio extracelular de CD123 humana o de *Macaca fascicularis* incluyendo la secuencia señal correspondiente a la secuencia de aminoácidos desde la posición M1 a R305 de la proteína de tipo salvaje (SEQ ID NO : 194 (humana), SEQ ID NO : 195 (de *Macaca fascicularis*)). La secuencia de aminoácidos resultante para la proteína CD123 madura humana o de *Macaca fascicularis* se lista como SEQ ID NO: 196 y SEQ ID NO: 197, respectivamente. Las medidas de Biacore son conocidas para el experto en la técnica. En el presente ejemplo, la medida de Biacore puede realizarse como se describe en la sección “anticuerpos anti CD3” anterior.

El anticuerpo anti-CD123 de la invención también puede tener una constante de afinidad aparente (KD aparente), como, por ejemplo, se determina por análisis FACS en células que expresan CD123 tales como células HEK293 transfectadas con CD123 usando anticuerpo anti-CD123 no purificado en el sobrenadante de hibridomas, que es $\leq 20\text{nM}$, por ejemplo, $\leq 15\text{nM}$, $\leq 10\text{nM}$, $\leq 6\text{nM}$, $\leq 5\text{nM}$, $\leq 4\text{nM}$, $\leq 3\text{nM}$, $\leq 2\text{nM}$ o $\leq 1\text{nM}$. Típicamente, la KD aparente está en el intervalo 0,1 a 20 nM, en particular 0,1 a 10 nM, por ejemplo, 0,1 a 5nM.

Los alineamientos de las secuencias de las regiones VH y VL de los anticuerpos anti-CD123 denominados “3E3-D3”, “1E1-G5”, “2B8-F3”, “2F8-D6”, “3B10-E6”, “5A5-B4”, “6B10-E4”, “6C10-C4”, “6D6-B8”, “8B11-B7”, “9B8-G6”, “9D7-C8”, “9F6-G3”.. La comparación de las secuencias CDR-H y CDR-L tiende a indicar que, estructuralmente, los anticuerpos anti-CD123 “1E1-G5”, “6D6-B8”, “8B11-B7” y “9F6-G3”, por una parte, y los anticuerpos anti-CD123 “6C10-C4”, “9B8-G6”, “9D7-C8”, por otra parte, están relacionados de cerca, uniéndose probablemente dichos anticuerpos al mismo epítipo. El alineamiento de los anticuerpos anti-CD123 denominados “1E1-G5”, “6D6-B8”, “8B11-B7” y “9F6-G3” y los anticuerpos anti-CD123 “6C10-C4”, “9B8-G6”, “9D7-C8” se muestra en las figuras 3 y 4, respectivamente. La comparación de las secuencias CDR-H y CDR-L identifica adicionalmente posiciones de CDR que están estrictamente conservadas entre los dos grupos de anticuerpos y que así se asume que son importantes para la especificidad, mientras otras posiciones podrían soportar la sustitución.

De acuerdo con esto, el anticuerpo según la invención comprende:

- a) un dominio variable de cadena pesada que comprende una CDR1-H que consiste en la secuencia $X_1\text{YTFTDX}_2\text{I}$ (SEQ ID NO: 336) en la que X_1 es G o A y

- X_2 es H, Y o N, o cualquier combinación de éstas; y
 una CDR2-H que consiste en la secuencia INPYSX₁GX₂ (SEQ ID NO: 337) en la
 que X_1 es G o D y X_2 es T o A, o cualquier combinación de éstas; y
 una CDR3-H que consiste en la secuencia ALNYGSYYAMDA (SEQ ID NO 201),
 5 y
 un dominio variable de cadena ligera que comprende una CDR1-L que consiste
 en la secuencia X₁DIX₂X₃N (SEQ ID NO: 338) en la que X_1 es E o K, X_2 es F, H o
 Y y X_3 es N o S, o cualquier combinación de éstas; y
 una CDR2-L que consiste en la secuencia 'DAN' o 'DAS'; y
 10 una CDR3-L que consiste en la secuencia X₁QYNX₂YPYT (SEQ ID NO: 339) en
 la que X_1 es H o Q y X_2 es I, K o N, o cualquier combinación de éstas; o
 b) un dominio variable de cadena pesada que comprende una CDR1-H que
 consiste en la secuencia GFSLTSYX₁ (SEQ ID NO: 340) en la que X_1 es H o S; y
 una CDR2-H que consiste en la secuencia MWX₁DGDT (SEQ ID NO: 341) en la
 15 que X_1 es S o N; y
 una CDR3-H que consiste en la secuencia ARGX₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉FX₁₀Y (SEQ
 ID NO: 342) en la que X_1 es D, Y o H, X_2 es Y o R, X_3 es S o T, X_4 es S o P, X_5
 es Y o no aminoácido, X_6 es L, I o no aminoácido, X_7 es Y o no aminoácido, X_8
 es L o no aminoácido, X_9 es W o no aminoácido, X_{10} es A o D, o cualquier
 20 combinación de éstas, y
 un dominio variable de cadena ligera que comprende una CDR1-L que consiste
 en la secuencia QSFLSSGD₁X₂NY (SEQ ID NO: 343) en la que X_1 es E o G y
 X_2 es R o K, o cualquier combinación de éstas; y
 una CDR2-L que consiste en la secuencia 'WAS'; y
 25 una CDR3-L que consiste en la secuencia QQYYDTPLT (SEQ ID NO: 253).

Según una realización, el anticuerpo anti-CD123 según la invención comprende
 las secuencias de CDR de las cadenas pesada y/o ligera de uno de los 13 anticuerpos
 anti-CD123 denominados "3E3-D3", "1E1-G5", "2B8-F3", "2F8-D6", "3B10-E6", "5A5-
 30 B4", "6B10-E4", "6C10-C4", "6D6-B8", "8B11-B7", "9B8-G6", "9D7-C8", y "9F6-G3"
 listados anteriormente.

Por lo tanto, la invención se refiere a un anticuerpo anti-CD123, que comprende:

- a) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia
 SEQ ID NO: 227 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 227 por

- una sustitución de aminoácido; CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 228 o SEQ ID NO: 353 o SEQ ID NO: 279 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 228 o SEQ ID NO: 353 o SEQ ID NO: 279 por una o más sustituciones de aminoácido; CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 229 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 229 por una sustitución de aminoácido; y
- 5 un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 231 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 231 por una sustitución de aminoácido; CDR2-L de secuencia 'RDD' o una secuencia que se diferencia de 'RDD' por una sustitución de aminoácido y CDR3-L de
- 10 secuencia SEQ ID NO: 232 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 232 por una sustitución de aminoácido; o
- b) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 199 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 199 por una sustitución de aminoácido; CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 200 o una
- 15 secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 200 por una o más sustituciones de aminoácido; CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 201 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 201 por una sustitución de aminoácido; y
- un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 203 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 203 por una sustitución de aminoácido; CDR2-L de secuencia 'DAN' o una secuencia
- 20 que se diferencia de 'DAN' por una sustitución de aminoácido y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 204 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 204 por una sustitución de aminoácido; o
- c) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 206 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 206 por una sustitución de aminoácido; CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 207 o una
- 25 secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 207 por una o más sustituciones de aminoácido; CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 208 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 208 por una sustitución de aminoácido; y
- 30 un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 210 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 210 por una sustitución de aminoácido; CDR2-L de secuencia 'ETS' o una secuencia que se diferencia de 'ETS' por una sustitución de aminoácido y CDR3-L de

secuencia SEQ ID NO: 211 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 211 por una sustitución de aminoácido; o

d) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 213 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 213 por una sustitución de aminoácido; CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 214 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 214 por una o más sustituciones de aminoácido; CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 215 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 215 por una sustitución de aminoácido; y

un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 217 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 217 por una sustitución de aminoácido; CDR2-L de secuencia 'NTN' o una secuencia que se diferencia de 'NTN' por una sustitución de aminoácido y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 218 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 218 por una sustitución de aminoácido; o

e) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 220 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 220 por una sustitución de aminoácido; CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 221 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 221 por una o más sustituciones de aminoácido; CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 222 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 222 por una sustitución de aminoácido; y

un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 224 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 224 por una sustitución de aminoácido; CDR2-L de secuencia 'RVS' o una secuencia que se diferencia de 'RVS' por una sustitución de aminoácido y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 225 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 225 por una sustitución de aminoácido; o

f) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 234 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 234 por una sustitución de aminoácido; CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 235 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 235 por una o más sustituciones de aminoácido; CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 236 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 236 por una sustitución de aminoácido; y

un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 238 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 238 por

una sustitución de aminoácido; CDR2-L de secuencia 'GAS' o una secuencia que se diferencia de 'GAS' por una sustitución de aminoácido y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 239 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 239 por una sustitución de aminoácido; o

5 g) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 241 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 241 por una sustitución de aminoácido; CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 242 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 242 por una o más sustituciones de aminoácido; CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 243 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 243 por una sustitución de aminoácido; y

10 un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 245 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 245 por una sustitución de aminoácido; CDR2-L de secuencia 'YAS' o una secuencia que se diferencia de 'YAS' por una sustitución de aminoácido y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 246 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 246 por una sustitución de aminoácido; o

15 h) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 248 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 248 por una sustitución de aminoácido; CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 249 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 249 por una o más sustituciones de aminoácido; CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 250 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 250 por una sustitución de aminoácido; y

20 un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 252 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 252 por una sustitución de aminoácido; CDR2-L de secuencia 'WAS' o una secuencia que se diferencia de 'WAS' por una sustitución de aminoácido y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 253 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 253 por una sustitución de aminoácido; o

25 i) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 255 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 255 por una sustitución de aminoácido; CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 200 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 200 por una o más sustituciones de aminoácido; CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 201 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 201 por una sustitución de aminoácido; y

30

- un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 257 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 257 por una sustitución de aminoácido; CDR2-L de secuencia 'DAN' o una secuencia que se diferencia de 'DAN' por una sustitución de aminoácido y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 258 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 258 por una sustitución de aminoácido; o
- 5 j) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 199 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 199 por una sustitución de aminoácido; CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 260 o una
- 10 secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 260 por una o más sustituciones de aminoácido; CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 201 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 201 por una sustitución de aminoácido; y
- un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 262 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 262 por una sustitución de aminoácido; CDR2-L de secuencia 'DAS' o una secuencia
- 15 que se diferencia de 'DAS' por una sustitución de aminoácido y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 263 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 263 por una sustitución de aminoácido; o
- k) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 265 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 265 por una sustitución de aminoácido; CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 266 o una
- 20 secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 266 por una o más sustituciones de aminoácido; CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 267 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 267 por una sustitución de aminoácido; y
- 25 un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 252 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 252 por una sustitución de aminoácido; CDR2-L de secuencia 'WAS' o una secuencia que se diferencia de 'WAS' por una sustitución de aminoácido y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 253 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO:
- 30 253 por una sustitución de aminoácido; o
- l) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 265 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 265 por una sustitución de aminoácido; CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 266 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 266 por una o más sustituciones

- de aminoácido; CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 269 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 269 por una sustitución de aminoácido; y un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 271 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 271 por una sustitución de aminoácido; CDR2-L de secuencia 'WAS' o una secuencia que se diferencia de 'WAS' por una sustitución de aminoácido y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 253 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 253 por una sustitución de aminoácido; o
- 5 m) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 273 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 273 por una sustitución de aminoácido; CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 274 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 274 por una o más sustituciones de aminoácido; CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 201 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 201 por una sustitución de aminoácido; y
- 10 un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 276 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 276 por una sustitución de aminoácido; CDR2-L de secuencia 'DAS' o una secuencia que se diferencia de 'DAS' por una sustitución de aminoácido y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 258 o una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: 258 por una sustitución de aminoácido.
- 15
- 20

Uno o más aminoácidos individuales pueden alterarse por sustitución, en particular por sustitución conservativa, en una o más de las secuencias CDR anteriores. Dicha alteración puede pretenderse por ejemplo para eliminar un sitio de glicosilación o un sitio de desamidación, en conexión con la humanización del anticuerpo.

25

Tomando como base los alineamientos de las secuencias de las regiones VH y VL de los anticuerpos anti-CD123 "1E1-G5", "6D6-B8", "8B11-B7", "9F6-G3" se identificaron diferentes sustituciones de aminoácidos. Por lo tanto, en una realización, puede sustituirse un aminoácido:

- 30 - en CDR1-H en una o más de las posiciones 1 y 7, por ejemplo en la posición 7 de CDR1-H de secuencia GYTFTDHI (SEQ ID NO:199) o GYTFTDYI (SEQ ID NO:273) por en la posición 1 y 5 de CDR1-H de secuencia AYTFTDNI (SEQ ID NO: 255); y/o
- en CDR2-H, en una o más de las posiciones 6 y 8, por ejemplo en las

posiciones 6 y/u 8 de CDR2-H de secuencia INPYSGGT (SEQ ID NO: 200) o INPYSDGT (SEQ ID NO: 274) o INPYSGGA (SEQ ID NO : 260); y/o

- en CDR1-L, en una o más de las posiciones 1, 4 y 5, por ejemplo en la posición 1 ó 1, 4 y 5 de CDR1-L de secuencia KDIYSN (SEQ ID NO : 262) o EDIFNN (SEQ ID NO: 257); y/o

- en CDR2-L, en las posiciones 3 de secuencia 'DAN' o 'DAS'; y/o

- en CDR3-L, en una o más de las posiciones 1 y 5, por ejemplo en la posición 1 y/o 5 de CDR3-L de secuencia HQYNIYPYT (SEQ ID NO: 258) o QQYNKYPYT (SEQ ID NO: 204) o HQYNNYPYT (SEQ ID NO : 263).

10 En una realización adicional, se sustituye un aminoácido:

- en CDR1-H en la posición 8, por ejemplo en la posición 8 de CDR1-H de secuencia GFSLTSYH (SEQ ID NO:265) o GFSLTSYS (SEQ ID NO: 248); y/o

- en CDR2-H en las posiciones 3, por ejemplo en las posiciones 3 de CDR2-H de secuencia MWSDGD (SEQ ID NO: 265) o MWNDGD (SEQ ID NO: 248); y/o

15 - en CDR3-H en las posiciones 4 y 9, por ejemplo en las posiciones 4 y 9 de CDR3-H de secuencia ARGDYSSYIYLWFAY (SEQ ID NO : 267) o ARGYYSSYLYLWFAY(SEQ ID NO : 269); y/o

- en CDR1-L, en una o más de las posiciones 9 y 10, por ejemplo en las posición 9 y 10 de CDR1-L de secuencia QSFLSSGDERNY (SEQ ID NO: 252) o QSFLSSGDGKNY (SEQ ID NO: 271).

Según una realización, el anticuerpo comprende:

a) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 227, CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 228, SEQ ID NO:353, SEQ ID NO:279, CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 229, y

un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 231, CDR2-L de secuencia 'RDD' y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 232; o

n) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 199, CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 200, CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 201, y

un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 203, CDR2-L de secuencia 'DAN' y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 204; o

- o) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 206, CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 207, CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 208, y
un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 210, CDR2-L de secuencia 'ETS' y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 211; o
- p) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 213, CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 214, CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 215, y
un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 217, CDR2-L de secuencia 'NTN' y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 218; o
- q) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 220, CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 221, CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 222, y
un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 224, CDR2-L de secuencia 'RVS' y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 225; o
- r) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 234, CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 235, CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 236, y
un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 238, CDR2-L de secuencia 'GAS' y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 239; o
- s) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 241, CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 242, CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 243, y
un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 245, CDR2-L de secuencia 'YAS' y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 246; o
- t) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 248, CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 249, CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 250, y

un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 252, CDR2-L de secuencia 'WAS' y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 253; o

5 u) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 255, CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 200, CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 201, y

un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 257, CDR2-L de secuencia 'DAN' y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 258; o

10 v) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 199, CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 260, CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 201, y

un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 262, CDR2-L de secuencia 'DAS' y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 263; o

15 w) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 265, CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 266, CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 267, y

un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 252, CDR2-L de secuencia 'WAS' y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 253; o

20 x) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 265, CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 266, CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 269, y

un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 271, CDR2-L de secuencia 'WAS' y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 253; o

25 y) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 273, CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 274, CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 201, y

30 un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 276, CDR2-L de secuencia 'DAS' y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 258.

El anticuerpo anti-CD123 según la invención es en particular un anticuerpo convencional, en particular un anticuerpo monoclonal convencional, o un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo biespecífico o multiespecífico.

El anticuerpo anti-CD123 según la invención en particular comprende o consiste en una IgG, o un fragmento de ésta.

La invención también proporciona un anticuerpo anti-CD123 como se ha definido anteriormente que comprende además al menos el dominio variable de cadena pesada y/o el dominio variable de cadena ligera de uno de los denominados anticuerpos anti-CD123 listados anteriormente.

Así, la invención se refiere en particular a un anticuerpo anti-CD123, que comprende:

- a) un dominio variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID NO: 226 o SEQ ID NO: 277 o SEQ ID NO: 278 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, y/o un dominio variable de cadena ligera de secuencia SEQ ID NO: 230, o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta; o
- b) un dominio variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID NO: 198 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, y/o un dominio variable de cadena ligera de secuencia SEQ ID NO: 202, o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta; o
- c) un dominio variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID NO: 205 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, y/o un dominio variable de cadena ligera de secuencia SEQ ID NO: 209, o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta; o
- d) un dominio variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID NO: 212 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, y/o un dominio variable de cadena ligera de secuencia SEQ ID NO: 216, o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta; o
- e) un dominio variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID NO: 219 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, y/o un dominio variable de cadena ligera de secuencia SEQ ID NO: 223, o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta; o
- f) un dominio variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID NO: 233 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, y/o un dominio variable de cadena

- ligera de secuencia SEQ ID NO: 237, o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta; o
- 5 g) un dominio variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID NO: 240 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, y/o un dominio variable de cadena ligera de secuencia SEQ ID NO: 244, o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta; o
- 10 h) un dominio variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID NO: 247 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, y/o un dominio variable de cadena ligera de secuencia SEQ ID NO: 251, o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta; o
- i) un dominio variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID NO: 254 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, y/o un dominio variable de cadena ligera de secuencia SEQ ID NO: 256, o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta; o
- 15 j) un dominio variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID NO: 259 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, y/o un dominio variable de cadena ligera de secuencia SEQ ID NO: 261, o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta; o
- 20 k) un dominio variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID NO: 264 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, y/o un dominio variable de cadena ligera de secuencia SEQ ID NO: 251, o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta; o
- 25 l) un dominio variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID NO: 268 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, y/o un dominio variable de cadena ligera de secuencia SEQ ID NO: 270, o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta; o
- 30 m) un dominio variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID NO: 272 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, y/o un dominio variable de cadena ligera de secuencia SEQ ID NO: 275, o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta.

Por ejemplo, la secuencia del dominio variable de cadena pesada o ligera pueden diferenciarse de la secuencia de referencia SEQ ID NO: 226, 277, 278, 230, 198, 202, 205, 209, 212, 216, 219, 223, 233, 237, 240, 244, 247, 251, 254, 256, 259, 261, 264,

251, 268, 270, 272 ó 275, según sea apropiado, por una o más sustitución o sustituciones de aminoácidos, en particular por una o más sustituciones de aminoácidos conservativas y/o sustitución o sustituciones con residuos canónicos. En particular, la secuencia del dominio variable de cadena pesada o ligera pueden diferenciarse de la secuencia de referencia SEQ ID NO: 226, 277, 278, 230, 198, 202, 205, 209, 212, 216, 219, 223, 233, 237, 240, 244, 247, 251, 254, 256, 259, 261, 264, 251, 268, 270, 272 ó 275 sólo por sustitución o sustituciones de aminoácidos conservativas.

Las alteraciones de la secuencia comparada con la secuencia SEQ ID NO: 226, 277, 278, 230, 198, 202, 205, 209, 212, 216, 219, 223, 233, 237, 240, 244, 247, 251, 254, 256, 259, 261, 264, 251, 268, 270, 272 ó 275 estarán presentes en particular esencialmente en una o más de las regiones marco, FR1-L, FR2-L, FR3-L, FR4-L y/o FR1-H, FR2-H, FR3-H, FR4-H.

En una realización, el anticuerpo anti-CD123 de la invención y un fragmento de éste es, respectivamente, un anticuerpo de rata y un fragmento de un anticuerpo de rata.

El anticuerpo anti-CD123 de la invención también puede ser un anticuerpo quimérico, y en particular un anticuerpo de rata/humano, por ejemplo, un anticuerpo que comprende dominios variables de rata de cadenas pesada y ligera y un dominio CH y un dominio CL de un anticuerpo humano. El polipéptido puede ser un fragmento de dicho anticuerpo. El anticuerpo anti-CD123 también puede ser un anticuerpo humanizado o un fragmento de un anticuerpo humanizado obtenido por injerto de CDR o por el método 4D (US20110027266).

De acuerdo con esto, en una realización, el anticuerpo anti-CD123 de la invención es un anticuerpo humanizado que comprende:

- a) un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 280, SEQ ID NO: 281, SEQ ID NO: 282, SEQ ID NO: 283, SEQ ID NO: 284, SEQ ID NO: 285, SEQ ID NO: 286, SEQ ID NO: 287, SEQ ID NO: 288, SEQ ID NO: 289, SEQ ID NO: 290, SEQ ID NO: 291, SEQ ID NO: 301 y SEQ ID NO: 302; y
- b) un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 292, SEQ ID NO: 293, SEQ ID NO: 294, SEQ ID NO: 295, SEQ ID NO: 296, SEQ ID NO: 297, SEQ ID NO: 298,

SEQ ID NO: 299, SEQ ID NO: 300, SEQ ID NO: 303, SEQ ID NO: 304 y SEQ ID NO: 305.

En una realización, el anticuerpo anti-CD123 según la invención comprende las tres secuencias CDR o el dominio variable de la cadena pesada, o las seis secuencias CDR o dominios variables de las cadenas pesada y ligera de uno de los denominados anticuerpos anti-CD123 listados anteriormente.

La invención se refiere además a un fragmento del anticuerpo anti-CD123 humanizado como se ha definido anteriormente. En una realización, el anticuerpo anti-CD123 humanizado descrito anteriormente es un anticuerpo quimérico.

El anticuerpo anti-CD123 según la invención también puede ser un anticuerpo de dominio único o un fragmento de éste. En particular, un fragmento de anticuerpo de dominio único puede consistir en una cadena pesada variable (VHH) que comprende la CDR1-H, CDR2-H y CDR3-H de uno de los anticuerpos descritos anteriormente. El anticuerpo anti-CD123 también puede ser un anticuerpo de cadena pesada, es decir, un anticuerpo desprovisto de cadena ligera, que puede contener o no un dominio CH1.

El anticuerpo de dominio único o un fragmento de éste también puede comprender las regiones marco de un anticuerpo de dominio único de camélido, y opcionalmente el dominio constante de un anticuerpo de dominio único de camélido.

El anticuerpo anti-CD123 según la invención también puede ser un fragmento de anticuerpo, en particular un fragmento de anticuerpo humanizado, seleccionado del grupo que consiste en Fv, Fab, F(ab')₂, Fab', dsFv, (dsFv)₂, scFv, sc(Fv)₂, y fragmentos divalentes.

El anticuerpo de CD123 también puede ser un anticuerpo biespecífico o multiespecífico formado a partir de al menos un fragmento de anticuerpo o al menos un dominio variable del anticuerpo anti-CD123 de la invención. Los anticuerpos multiespecíficos son complejos proteicos polivalentes como se describe por ejemplo en EP 2 050 764 A1 o US 2005/0003403 A1.

Los anticuerpos de CD123 biespecíficos o multiespecíficos según la invención pueden tener especificidad para (a) dominio extracelular de CD123 humana o humana y de *Macaca fascicularis*, diana de uno o más de los anticuerpos anti-CD123 descritos anteriormente y (b) al menos un otro antígeno.

En una realización particular, el otro antígeno es CD3 y de acuerdo con esto el anticuerpo biespecífico resultante es un anticuerpo biespecífico de CD3/CD123. Los anticuerpos bi-específicos convencionales pueden producirse por técnicas que son conocidas para el experto en la técnica.

- 5 Los anticuerpos y fragmentos de éstos según la invención pueden usarse en una forma aislada (por ejemplo, purificada) o estar contenidos en un vector, tal como una vesícula de membrana o lípido (por ejemplo, un liposoma).

En una realización adicional, el anticuerpo anti-CD123 de la invención se usa para la preparación de una proteína de unión semejante a anticuerpo de la invención definida
10 adicionalmente en la sección "proteína de unión semejante a anticuerpo".

Cualquier combinación de las realizaciones anteriores forma parte de la invención.

Proteínas de unión semejantes a anticuerpo

Los inventores han generado varias proteínas de unión semejantes a anticuerpo las proteínas de unión semejantes a anticuerpo denominadas "7G3x20G6", "7G3x4E7",
15 "7G3x4B4", "7G3x18F5", "hz20G6x7G3", "7G3xhz4B4", "hz4B4x3E3", "hz20G6x7G3-TL4" y "hz20G6xhz7G3", en las que el término "hz" indica anticuerpos humanizados. Estas proteínas de unión semejantes a anticuerpo tienen un diseño CODV, en particular un diseño CODV-Fab o CODV-Ig.

El "formato CODV" en el contexto de la presente invención se refiere a la
20 configuración variable dual entrecruzada (CODV) de anticuerpos biespecíficos o anticuerpos multiespecíficos. El formato CODV permite una posibilidad de intercambio de dominios variables con retención de plegamiento y afinidad de unión última.

El formato CODV se ha descrito previamente en la solicitud de patente internacional WO2012/135345. De acuerdo con esto, en una realización, la proteína de
25 unión semejante a anticuerpo de la invención está en el formato CODV como se ha descrito previamente en la solicitud de patente internacional WO2012/135345, que se incorpora en la presente memoria por referencia.

En una realización, la invención se refiere a una proteína de unión semejante a
30 anticuerpo en el formato CODV-Fab. De acuerdo con esto, en una realización, la invención se refiere a una proteína de unión semejante a anticuerpo que comprende dos cadenas polipeptídicas que forman dos sitios de unión a antígeno, en la que un primer polipéptido tiene una estructura representada por la fórmula [I]:

$$V_{D1}-L_1-V_{D2}-L_2-C_L \quad [I]$$

y un segundo polipéptido tiene una estructura representada por la fórmula [II]:

$$V_{D3}-L_3-V_{D4}-L_4-C_{H1} \quad [II]$$

en la que:

5 V_{D1} es un dominio variable de cadena pesada o ligera de una primera inmunoglobulina;

V_{D2} es un dominio variable de cadena pesada o ligera de una segunda inmunoglobulina;

10 V_{D3} es un dominio variable de cadena pesada o ligera de dicha segunda inmunoglobulina;

V_{D4} es un dominio variable de cadena pesada o ligera de dicha primera inmunoglobulina;

C_L es un dominio constante de cadena ligera de una inmunoglobulina;

C_{H1} es un dominio constante C_{H1} de cadena pesada de una inmunoglobulina;

15 L_1 , L_2 , L_3 , y L_4 son conectores de aminoácidos;

y en la que el primer y el segundo polipéptido forman una pareja entrecruzada cadena ligera-cadena pesada, y

20 en la que V_{D1} y V_{D2} son ambos bien dominios variables de cadenas ligeras, o dominios variables de cadenas pesadas, y V_{D3} y V_{D4} son ambos dominios variables de cadenas pesadas si V_{D1} y V_{D2} son dominios variables de cadenas ligeras, o V_{D3} y V_{D4} son ambos dominios variables de cadenas ligeras si V_{D1} y V_{D2} son dominios variables de cadenas pesadas.

25 La adición de un dominio Fc a la proteína de unión semejante a anticuerpo en el CODV-Fab estabiliza adicionalmente la proteína de unión semejante a anticuerpo. Más precisamente, la adición de un dominio Fc al polipéptido de fórmula (II) de proteína de unión semejante a anticuerpo en el CODV-Fab incrementa la vida media de la proteína de unión semejante a anticuerpo y mejora así el perfil farmacocinético de la proteína de unión semejante a anticuerpo. La adición de una región Fc al CODV-Fab resulta en la

30 dimerización de polipéptidos que contienen el dominio Fc y la proteína de unión semejante a anticuerpo resultante es una proteína de unión semejante a anticuerpo en el formato CODV-Ig. La invención por lo tanto se refiere adicionalmente a una proteína de unión semejante a anticuerpo en el formato CODV-Ig.

Por lo tanto, la invención se refiere además a una proteína de unión semejante a anticuerpo que comprende cuatro cadenas polipeptídicas que forman cuatro sitios de unión a antígeno, en la que dos cadenas polipeptídicas tienen una estructura representada por la fórmula [I]:

$$V_{D1}-L_1-V_{D2}-L_2-C_L \quad [I]$$

y dos cadenas polipeptídicas tienen una estructura representada por la fórmula [III]:

$$V_{D3}-L_3-V_{D4}-L_4-C_{H1}-F_c \quad [III]$$

en la que:

V_{D1} es un dominio variable de cadena pesada o ligera de una primera inmunoglobulina;

V_{D2} es un dominio variable de cadena pesada o ligera de una segunda inmunoglobulina;

V_{D3} es un dominio variable de cadena pesada o ligera de dicha segunda inmunoglobulina;

V_{D4} es un dominio variable de cadena pesada o ligera de dicha primera inmunoglobulina;

C_L es un dominio constante de cadena ligera de una inmunoglobulina;

C_{H1} es un dominio constante C_{H1} de cadena pesada de una inmunoglobulina;

F_c es la región bisagra de la inmunoglobulina y CH_2 , CH_3 los dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina de una inmunoglobulina;

L_1 , L_2 , L_3 , y L_4 son conectores de aminoácidos;

y en la que los polipéptidos de fórmula I y los polipéptidos de fórmula III forman una pareja entrecruzada cadena ligera-cadena pesada, y

en la que V_{D1} y V_{D2} son ambos bien dominios variables de cadenas ligeras, o dominios variables de cadenas pesadas, y V_{D3} y V_{D4} son ambos dominios variables de cadenas pesadas si V_{D1} y V_{D2} son dominios variables de cadenas ligeras, o V_{D3} y V_{D4} son ambos dominios variables de cadenas ligeras si V_{D1} y V_{D2} son dominios variables de cadenas pesadas.

En dicho formato CODV-Ig, las dos cadenas polipeptídicas que tienen una estructura representada por la fórmula [III] dimerizan a través de sus dominios F_c .

En una realización adicional, se añade un primer dominio F_c al polipéptido de fórmula [II] de la proteína de unión semejante a anticuerpo CODV-Fab, y se añade un segundo dominio F_c (denominado F_{c2}) al polipéptido de fórmula [I] de la proteína de unión semejante a anticuerpo CODV-Fab. Además, en la misma realización, un

conector L_5 está presente entre C_L y el dominio F_{c2} de las cadenas polipeptídicas de fórmula [I] resultando en las cadenas polipeptídicas de fórmula [IV].

De acuerdo con esto, la invención se refiere además a una proteína de unión semejante a anticuerpo que comprende dos cadenas polipeptídicas que forman dos
5 sitios de unión a antígeno, en la que una cadena polipeptídica tiene una estructura representada por la fórmula [IV]:



y una cadena polipeptídica tiene una estructura representada por la fórmula [III]:



10 en la que:

V_{D1} es un dominio variable de cadena pesada o ligera de una primera inmunoglobulina;

V_{D2} es un dominio variable de cadena pesada o ligera de una segunda inmunoglobulina;

15 V_{D3} es un dominio variable de cadena pesada o ligera de dicha segunda inmunoglobulina;

V_{D4} es un dominio variable de cadena pesada o ligera de dicha primera inmunoglobulina;

C_L es un dominio constante de cadena ligera de una inmunoglobulina;

20 C_{H1} es un dominio constante C_{H1} de cadena pesada de una inmunoglobulina;

F_c es la región bisagra de la inmunoglobulina y CH_2 , CH_3 los dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina de una inmunoglobulina;

F_{c2} es la región bisagra de la inmunoglobulina y CH_2 , CH_3 los dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina de una inmunoglobulina;

25 L_1 , L_2 , L_3 , L_4 y L_5 son conectores de aminoácidos;

y en la que los polipéptidos de fórmula [IV] y los polipéptidos de fórmula [III] forman una pareja entrecruzada cadena ligera-cadena pesada, y

30 en la que V_{D1} y V_{D2} son ambos bien dominios variables de cadenas ligeras, o dominios variables de cadenas pesadas, y V_{D3} y V_{D4} son ambos dominios variables de cadenas pesadas si V_{D1} y V_{D2} son dominios variables de cadenas ligeras, o V_{D3} y V_{D4} son ambos dominios variables de cadenas ligeras si V_{D1} y V_{D2} son dominios variables de cadenas pesadas.

Este formato CODV, en el que las cadenas polipeptídicas representadas por las fórmulas [III] y [IV] dimerizan a través de sus regiones F_{c2} y F_c respectivas, se denomina en la presente memoria CODV-Fab-TL.

En otra realización del CODV-Fab, se añade un primer dominio F_c a la cadena polipeptídica representada por la fórmula [II] (resultando en la fórmula [III]), y la proteína de unión semejante a anticuerpo comprende una tercera cadena polipeptídica que comprende, o consiste en un segundo dominio F_c (denominado F_{c3}).

La invención se refiere además a una proteína de unión semejante a anticuerpo que comprende tres cadenas polipeptídicas que forman dos sitios de unión a antígeno, en las que

un primer polipéptido tiene una estructura representada por la fórmula [I]:



un segundo polipéptido tiene una estructura representada por la fórmula [III]:



un tercer polipéptido F_{c3} (también denominado "porción F_c ") que es la región bisagra de inmunoglobulina y los dominios constantes de cadena pesada CH_2 , CH_3 de inmunoglobulina de una inmunoglobulina;

en la que

V_{D1} es un dominio variable de cadena pesada o ligera de una primera inmunoglobulina;

V_{D2} es un dominio variable de cadena pesada o ligera de una segunda inmunoglobulina;

V_{D3} es un dominio variable de cadena pesada o ligera de dicha segunda inmunoglobulina;

V_{D4} es un dominio variable de cadena pesada o ligera de dicha primera inmunoglobulina;

C_L es un dominio constante de cadena ligera de una inmunoglobulina;

C_{H1} es un dominio constante C_{H1} de cadena pesada de una inmunoglobulina;

F_c es la región bisagra de la inmunoglobulina y CH_2 , CH_3 los dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina de una inmunoglobulina;

L_1 , L_2 , L_3 y L_4 son conectores de aminoácidos;

y en la que el polipéptido de fórmula [I] y el polipéptido de fórmula [III] forman una pareja entrecruzada cadena ligera-cadena pesada, y

en la que V_{D1} y V_{D2} son ambos bien dominios variables de cadenas ligeras, o dominios variables de cadenas pesadas, y V_{D3} y V_{D4} son ambos dominios variables de cadenas pesadas si V_{D1} y V_{D2} son dominios variables de cadenas ligeras, o V_{D3} y V_{D4} son ambos dominios variables de cadenas ligeras si V_{D1} y V_{D2} son dominios variables de cadenas pesadas;

y en la que el polipéptido de fórmula [III] heterodimeriza con el tercer polipéptido a través de su dominio F_c .

De acuerdo con esto, en dicha realización, el denominado "porción F_c " (F_{c3}) heterodimeriza con la región F_c del polipéptido según la fórmula III. Este formato CODV se denomina en la presente memoria CODV-Fab-OL. Esta construcción evita que la forma CODV-Fab se agregue.

En una realización del CODV-Fab-OL, tanto F_c como F_{c3} son variantes de inmunoglobulina en las que el dominio CH3 se ha modificado: cada uno de F_c y F_{c3} se ha modificado por ingeniería genética en la interfase CH3-CH3 para estimular la formación de heteromultímero según la tecnología denominada "Botón en ojal" que se ha descrito en las patentes US5731168 y US8216805, principalmente, y que se incorporan en la presente memoria por referencia.

De acuerdo con esto, en una realización, el dominio CH3 de uno de F_c y F_{c3} contiene las mutaciones Y349C, T366S, L368A, e Y407V, mientras el dominio CH del otro de F_c y F_{c3} contiene las mutaciones S354C y T366W (estando indicada la posición del aminoácido por referencia a una secuencia de IgG1).

Los ejemplos de parejas F_c y F_{c3} adecuadas incluyen la pareja SEQ ID NO: 396 (F_c) y SEQ ID NO: 397 (F_{c3}), y la pareja SEQ ID NO: 394 (F_c) y SEQ ID NO: 398 (F_{c3}).

En una realización de la invención, la primera inmunoglobulina o la segunda inmunoglobulina es un anticuerpo anti-CD3 como se define en la sección «anticuerpos anti-CD3» anterior.

En otra realización de la invención, la primera inmunoglobulina o la segunda inmunoglobulina es un anticuerpo anti-CD123 como se define en la sección «anticuerpos anti-CD123» anterior.

30

Según una realización de la invención, V_{D1} y V_{D2} de polipéptido de fórmula I o fórmula [IV] son ambos bien dominios variables de cadenas ligeras, o dominios variables de cadenas pesadas, y V_{D3} y V_{D4} de polipéptido II o III son ambos dominios variables de cadenas pesadas o de cadenas ligeras. Esta posibilidad de intercambio

también se refiere como "posibilidad de permuta" y determina así la configuración dual variable entrecruzada (CODV) de las proteínas de unión semejantes a anticuerpo de la invención.

Según la definición anterior, V_{D1} y V_{D4} son dominios variables de cadena pesada o ligera de una primera inmunoglobulina y V_{D2} y V_{D3} son dominios variables de cadena pesada o ligera de una segunda inmunoglobulina, V_{D1} y V_{D4} se deben considerar por lo tanto como dominios cognados así como V_{D2} y V_{D3} .

De acuerdo con esto, el término "entrecruzado" se refiere al alineamiento permutado de V_{D1} o V_{D2} de polipéptido de fórmula [I] o fórmula [IV] respecto a su dominio variable cognado V_{D4} o V_{D3} de polipéptido de fórmula [II] o fórmula [III].

En una realización particular, V_{D1} y V_{D2} son dominios variables de cadena ligera y V_{D3} y V_{D4} son dominios variables de cadena pesada.

Las proteínas de unión semejantes a anticuerpo de la invención pueden prepararse usando dominios o secuencias obtenidas o derivadas de cualquier anticuerpo humano o no humano, incluyendo, por ejemplo, anticuerpos humanos, de rata, o humanizados.

En una realización, la inmunoglobulina es una inmunoglobulina IgG.

De acuerdo con esto, en una realización, C_L es un dominio constante de cadena ligera de una inmunoglobulina IgG. En una realización adicional, C_{H1} es un dominio constante C_{H1} de cadena pesada de una inmunoglobulina IgG.

En una realización, la proteína de unión semejante a anticuerpo de la invención puede prepararse usando dominios o secuencias del anticuerpo anti-CD3 y anticuerpo anti-CD123 descrito en la presente memoria.

El término "conector" tal y como se usa en la presente memoria se refiere a uno o más residuos de aminoácidos insertados entre dominios de inmunoglobulina para proporcionar una movilidad suficiente para que los dominios de las cadenas ligera y pesada se plieguen en inmunoglobulinas de región variable dual entrecruzada. En algunas realizaciones, un conector consiste en 0 aminoácidos lo que significa que el conector está ausente. Un conector se inserta en la transición entre dominios variables o entre dominios variables y constantes, respectivamente, a nivel de secuencia. La transición entre dominios puede identificarse porque el tamaño aproximado de los dominios de inmunoglobulina se comprende bien. La localización precisa de una

transición de dominio puede determinarse localizando cadenas peptídicas que no forman elementos estructurales secundarios tales como láminas beta o hélices alfa según se demuestra por datos experimentales o como puede asumirse por técnicas de modelado o predicción de la estructura secundaria. Los conectores descritos en el contexto de la invención son los conectores L_1 , L_2 , L_3 , L_4 y L_5 . L_1 está localizado entre el dominio N-terminal V_{D1} y el dominio V_{D2} ; L_2 está localizado entre el V_{D2} y el dominio C-terminal C_L . Los conectores L_3 y L_4 están localizados en el polipéptido como se define según la fórmula II o III de las proteínas de unión semejantes a anticuerpo. Más precisamente, L_3 está localizado entre el N-terminal V_{D3} y los dominios V_{D4} y L_4 está localizado entre el V_{D4} y los dominios C-terminal C_{H1} -Fc. L_5 está localizado entre C_L y el N-terminal F_{c2} . Los conectores L_1 , L_2 , L_3 , L_4 y L_5 son independientes, pero en algunas realizaciones, tienen la misma secuencia y/o longitud.

En algunas proteínas de unión semejantes a anticuerpo de la invención, la longitud de L_3 es al menos dos veces la longitud de L_1 . En otras proteínas de unión semejantes a anticuerpo e la invención, la longitud de L_4 es al menos dos veces la longitud de L_2 . En algunas proteínas de unión semejantes a anticuerpo de la invención, la longitud de L_1 es al menos dos veces la longitud de L_3 . En otras proteínas de unión semejantes a anticuerpo de la invención, la longitud de L_2 es al menos dos veces la longitud de L_4 .

En una realización, el conector L_1 , L_2 , L_3 y L_4 comprenden 0 a 20 aminoácidos. En una realización, L_5 comprende 0 a 10 aminoácidos.

En algunas proteínas de unión semejantes a anticuerpo de la invención, L_1 tiene una longitud de 3 a 12 residuos de aminoácidos, L_2 tiene una longitud de 3 a 14 residuos de aminoácidos, L_3 tiene una longitud de 1 a 8 residuos de aminoácidos, y L_4 tiene una longitud de 1 a 3 residuos de aminoácidos. En otras proteínas de unión semejantes a anticuerpo, L_1 tiene una longitud de 5 a 10 residuos de aminoácidos, L_2 tiene una longitud de 5 a 8 residuos de aminoácidos, L_3 tiene una longitud de 1 a 5 residuos de aminoácidos, y L_4 tiene una longitud de 1 a 2 residuos de aminoácidos. En una proteína de unión semejante a anticuerpo preferida, L_1 tiene una longitud de 7 residuos de aminoácidos, L_2 tiene una longitud de 5 residuos de aminoácidos, L_3 tiene una longitud de 1 residuo de aminoácidos, y L_4 tiene una longitud de 2 residuos de aminoácidos.

En algunas proteínas de unión semejantes a anticuerpo de la invención, L_1 tiene una longitud de 1 a 3 residuos de aminoácidos, L_2 tiene una longitud de 1 a 4 residuos

de aminoácidos, L_3 tiene una longitud de 2 a 15 residuos de aminoácidos, y L_4 tiene una longitud de 2 a 15 residuos de aminoácidos. En otras proteínas de unión semejantes a anticuerpo, L_1 tiene una longitud de 1 a 2 residuos de aminoácidos, L_2 tiene una longitud de 1 a 2 residuos de aminoácidos, L_3 tiene una longitud de 4 a 12 residuos de aminoácidos, y L_4 tiene una longitud de 2 a 12 residuos de aminoácidos. En una proteína de unión semejante a anticuerpo preferida, L_1 tiene una longitud de 1 residuo de aminoácidos, L_2 tiene una longitud de 2 residuos de aminoácidos, L_3 tiene una longitud de 7 residuos de aminoácidos, y L_4 tiene una longitud de 5 residuos de aminoácidos.

En algunas proteínas de unión semejantes a anticuerpo de la invención, L_1 , L_3 , o L_4 pueden ser iguales a cero. Sin embargo, en proteínas de unión semejantes a anticuerpo en las que L_3 , o L_4 es igual a cero, el conector de transición correspondiente entre la región variable y región constante o entre los dominios variables duales en la otra cadena pueden no ser cero. En algunas realizaciones, L_1 es igual a cero y L_3 es 2 o más residuos de aminoácidos, L_3 es igual a cero y L_1 es igual a 1 o más residuos de aminoácidos, o L_4 es igual a 0 Y L_2 es 3 o más residuos de aminoácidos.

En algunas proteínas de unión semejantes a anticuerpo de la invención, al menos uno de los conectores seleccionados del grupo que consiste en L_2 , L_3 , y L_4 contiene al menos un residuo de cisteína.

Los ejemplos de conectores adecuados incluyen un único residuo de glicina, treonina o serina; un dipéptido tal como dipéptido diglicina, péptido histidina-treonina o un dipéptido glicina-serina; un tripéptido con tres glicinas, el tripéptido Thr-His-Thr, el tripéptido Gly-Gly-Ser; un péptido con cuatro residuos de glicina; un péptido con cinco residuos de glicina; un péptido con seis residuos de glicina; un péptido con siete residuos de glicina; un péptido con ocho residuos de glicina. Pueden usarse otras combinaciones de residuos de aminoácidos tales como el péptido Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 354), el péptido Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 344), el péptido Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 355), el péptido Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 356), el péptido Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 357), el péptido Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 358), y el péptido Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 345). Otros conectores adecuados incluyen una única Ser, y residuo Val; el dipéptido Arg-Thr, Gin-Pro, Ser-Ser, Thr-Lys, y Ser-Leu; Lys-Thr-His-Thr (SEQ ID NO: 359); Lys-Thr-His-Thr-Ser (SEQ ID NO: 360); Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser (SEQ ID NO: 361); Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro (SEQ ID NO: 362); Ser-Asp-

Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro (SEQ ID NO: 363); Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro (SEQ ID NO: 364); Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser (SEQ ID NO: 365); Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser (SEQ ID NO: 366); Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro (SEQ ID NO: 367); Glu-Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro (SEQ ID NO: 368); Glu-Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro-Gly (SEQ ID NO: 369); Gly-Glu-Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro-Gly (SEQ ID NO: 370); Gly-Glu-Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro-Gly-Gly (SEQ ID NO: 371); Gly-Gly-Glu-Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro-Gly-Gly (SEQ ID NO: 372); Gly-Gly-Glu-Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 373); Gly-Gly-Gly-Glu-Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 374); Thr-Val-Ala-Ala-Pro (SEQ ID NO: 346), Gln-Pro-Lys-Ala-Ala (SEQ ID NO: 347), Gln-Arg-Ile-Glu-Gly (SEQ ID NO: 348); Ala-Ser-Thr-Lys-Gly-Pro-Ser (SEQ ID NO: 349), Arg-Thr-Val-Ala-Ala-Pro-Ser (SEQ ID NO: 350), Gly-Gln-Pro-Lys-Ala-Ala-Pro (SEQ ID NO: 307), Thr-Lys-Gly-Pro-Ser (SEQ ID NO: 309), His-Ile-Asp-Ser-Pro-Asn-Lys (SEQ ID NO: 351), y Gly-Gly-Ser-Gly-Ser-Ser-Gly-Ser-Gly-Gly (SEQ ID NO: 389). Los ejemplos listados anteriormente no se pretende que limiten el alcance de la invención de ninguna manera, y los conectores que comprenden aminoácidos seleccionados aleatoriamente seleccionados del grupo que consiste en valina, leucina, isoleucina, serina, treonina, lisina, arginina, histidina, aspartato, glutamato, asparagina, glutamina, glicina, y prolina se han mostrado que son adecuados en las proteínas de unión semejantes a anticuerpo de la invención.

La identidad y secuencia de los residuos de aminoácidos en el conector pueden variar dependiendo del tipo de elemento estructural secundario necesario para conseguir en el conector. Por ejemplo, glicina, serina, y alanina son los mejores para conectores que tienen una máxima flexibilidad. Algunas combinaciones de glicina, prolina, treonina, y serina son útiles si es necesario un conector más rígido y extendido. Cualquier residuo de aminoácido puede considerarse como un conector en combinación con otros residuos de aminoácidos para construir conectores peptídicos más largos según sea necesario dependiendo de las propiedades deseadas.

En una realización, el conector L_1 tiene la secuencia Gly-Gln-Pro-Lys-Ala-Ala-Pro (SEQ ID NO: 307), el conector L_2 tiene la secuencia Thr-Lys-Gly-Pro-Ser (SEQ ID NO: 309), el conector L_3 tiene la secuencia 'S' y el conector L_4 tiene la secuencia 'RT'.

En una realización adicional, las secuencias de los conectores L₁, L₂, L₃, y L₄ se seleccionan del grupo que consiste en treonina; un dipéptido tal como un péptido histidina-treonina; el tripéptido Thr-His-Thr, Lys-Thr-His-Thr (SEQ ID NO: 359); Lys-Thr-His-Thr-Ser (SEQ ID NO: 360); Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser (SEQ ID NO: 361); Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro (SEQ ID NO: 362); Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro (SEQ ID NO: 363); Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro (SEQ ID NO: 364); Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser (SEQ ID NO: 365); Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser (SEQ ID NO: 366); Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro (SEQ ID NO: 367); Glu-Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro (SEQ ID NO: 368); Glu-Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro-Gly (SEQ ID NO: 369); Gly-Glu-Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro-Gly (SEQ ID NO: 370); Gly-Glu-Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro-Gly-Gly (SEQ ID NO: 371); Gly-Gly-Glu-Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro-Gly-Gly (SEQ ID NO: 372); Gly-Gly-Glu-Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 373) y Gly-Gly-Gly-Glu-Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 374). En una realización, la secuencia del conector L₅ se selecciona del grupo que consiste en un único residuo de serina, un dipéptido tal como un dipéptido glicina-serina; un tripéptido Gly-Gly-Ser, el péptido Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 354), el péptido Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 344), el péptido Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 355), el péptido Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 356), el péptido Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 357), el péptido Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 358), el péptido Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 345), y el péptido Gly-Gly-Ser-Gly-Ser-Ser-Gly-Ser-Gly-Gly (SEQ ID NO: 389).

El término "dominio Fc" tal y como se usa en la presente memoria engloba Fc nativo y variantes y secuencias de Fc como se ha definido anteriormente. Como con las variantes de Fc y moléculas Fc nativas, el término "dominio Fc" incluye moléculas en forma monomérica o multimérica, ya estén digeridas del anticuerpo completo o producidas por otros medios.

El término "Fc nativo" tal y como se usa en la presente memoria se refiere a una molécula que comprende la secuencia de un fragmento no de unión a antígeno que resulta de la digestión de un anticuerpo o se produce por otros medios, ya sea en forma monomérica o multimérica, y puede contener la región bisagra. La fuente de inmunoglobulina original del Fc nativo es, en particular, de origen humano y puede ser

cualquiera de las inmunoglobulinas, aunque se prefieren IgG1 e IgG2. Las moléculas Fc nativas están compuestas por polipéptidos monoméricos que pueden estar unidos en formas diméricas o multiméricas por asociación covalente (es decir, enlaces disulfuro) y no covalente. El número de enlaces disulfuro intermoleculares entre subunidades monoméricas de moléculas Fc nativas varía de 1 a 4 dependiendo de la clase (por ejemplo, IgG, IgA, e IgE) o subclase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgA1, e IgGA2). Un ejemplo de un Fc nativo es un dímero unido por disulfuro que resulta de la digestión con papaína de una IgG. El término "Fc nativo" tal y como se usa en la presente memoria es genérico para las formas monomérica, dimérica, y multimérica.

El término "variante de Fc" tal y como se usa en la presente memoria se refiere a una molécula o secuencia que está modificada de un Fc nativo pero que todavía comprende un sitio de unión para el receptor salvaje, FcRn (receptor de Fc neonatal). Las variantes de Fc ejemplares, y su interacción con el receptor salvaje, se conocen en la técnica. Así, el término "variante de Fc" puede comprender una molécula o secuencia que está humanizada de un Fc nativo no humano. Además, un Fc nativo comprende regiones que pueden eliminarse porque proporcionan características estructurales o actividad biológica que no se requieren para las proteínas de unión semejantes a anticuerpo de la invención. Así, el término "variante de Fc" comprende una molécula o secuencia que carece de uno o más sitios o residuos de Fc nativo, o en la que uno o más sitios o residuos de Fc se han modificado, que afectan o están implicados en: (1) formación de enlace disulfuro, (2) incompatibilidad con una célula huésped seleccionada, (3) heterogeneidad N-terminal después de la expresión en una célula huésped seleccionada, (4) glicosilación, (5) interacción con complemento, (6) unión a un receptor de Fc distinto de un receptor salvaje, o (7) citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC).

En algunas realizaciones, cuando la proteína de unión semejante a anticuerpo contiene dos dominios F_c, es decir, en el CODV-Ig (F_c y F_{c2}), CODV-Fab-TL (dos dominios F_c), y CODV-Fab-OL (F_c y F_{c3}), los dos dominios F_c son del mismo isotipo o subclase de isotipo de inmunoglobulina. De acuerdo con esto, en algunas realizaciones, tanto F_c como F_{c2} de CODV-Ig, o ambos dominios F_c de CODV-Fab-TL, o tanto F_c como F_{c3} de CODV-Fab-OL son de la subclase IgG1, o de la subclase IgG2, o de la subclase IgG3, o de la subclase IgG4.

Todas las proteínas de unión semejantes a anticuerpo como se describe en la presente memoria no tienen función efectora. Esto significa que cuando la proteína de

unión semejante a anticuerpo contiene uno o más dominios F_c (es decir, F_c en la fórmula [III], F_{c2} en la fórmula [IV][y/o F_{c3}] de la subclase IgG1, dicho uno o más dominios F_c del núcleo de IgG1 contienen una doble mutación L234A y L235A (denominada "mutación LALA") que suprime la función efectora de F_c . El doble mutante de F_c L234A y L235A no se une a $Fc\gamma R$ o C1q, y las dos funciones ADCC y CDC del dominio F_c de la subclase IgG1 están suprimidas (Hezareh, M. et al., J. Virol. 2001 Dic; 75(24): 12161-12168).

En un ejemplo, la región F_c comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 330, SEQ ID NO: 394, o SEQ ID NO: 396. En una realización, la región F_{c2} comprende dos intercambios de aminoácidos en el dominio CH3 H435R y Y436F, como se describe en Jendeberg, L. et al. (1997, J. Immunological Meth. 201: 25-34). De acuerdo con esto, en una realización, la región F_{c2} comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 327. En otra realización, la región F_{c2} comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 392.

La proteína de unión semejante a anticuerpo denominada CODV-Fab "7G3x20G6" comprende:

- un polipéptido según la fórmula I de la secuencia de aminoácidos DVVMTQTPVSLSVSLGGQVSISCRSSQSLVHNNGNTYLSWYLQKPGQSPQSLIYKVSN RFSGFSDFSGSGSGTDFTLKISRVPDDDLGVYYCGQGTQYPFTFGSGTKLEIK**GQPK****AAP**DFVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYLQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDLAVYYCQNDYSYPYTFGGGTKLEIK**TKGPS**RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 306, los conectores se indican en negrita y subrayados) que comprende V_{D1} de secuencia SEQ ID NO: 9, L_1 de secuencia SEQ ID NO: 307, V_{D2} de secuencia SEQ ID NO: 308, L_2 de secuencia SEQ ID NO: 309 y C_L de secuencia SEQ ID NO: 310, y

- polipéptido según la fórmula II de la secuencia de aminoácidos EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYYMKWVKQSHGKSLEWIGDIIPSNGAT FYNQKFKGKATLTVDRSSSTAYMHLNSLTSEDSAVYYCTRSHLLRASWFAYWGQGTLVTVSA**SE**VQLVETGGSLVQPGKSLKLTCAATSGFTFTKAWMHWRQSPKQLEWVAQIKDKSNSYATYYAESVKGRFTISRDDSKSTIYLMNSLKEEDTAIYYCRGVYYALSPFDYWGQGVMVTVSS**RT**ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV (SEQ

ID NO: 311, los conectores se indican en negrita y subrayados) que comprende V_{D3} de secuencia SEQ ID NO: 312, L_3 de la secuencia de aminoácidos 'S', V_{D4} de secuencia SEQ ID NO: 5, L_4 de la secuencia de aminoácidos 'RT' y C_{H1} de secuencia SEQ ID NO: 313.

5

La proteína de unión semejante a anticuerpo denominada CODV-Fab "7G3x4E7" comprende:

- un polipéptido según la fórmula I de la secuencia de aminoácidos DVVMTQTPVSLSVSLGGQVSISCRSSQSLEHNNGNTYLSWYLQKPGQSPQPLIYKVSN
 10 RFSGISDRFSGSGSGTDFTLKISRVEPDDLGVYYCGQGTQYPFTFGPGTKLELK**GQPK**
AAPDFVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYLQKPGQPPKLLIY
 WASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDLAVYYCQNDYSYPYTFGGGTKLEIK
TKGPSRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
 ESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ

15 ID NO: 314, los conectores se indican en negrita y subrayados) que comprende V_{D1} de secuencia SEQ ID NO: 21, L_1 de secuencia SEQ ID NO: 307, V_{D2} de secuencia SEQ ID NO: 308, L_2 de secuencia SEQ ID NO: 309 y C_L de secuencia SEQ ID NO: 310, y

- un polipéptido según la fórmula II de la secuencia de aminoácidos EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYYMKWVKQSHGKSLEWIGDIIPSNAT
 20 FYNQKFKGKATLTVDRSSSTAYMHLNSLTSEDSAVYYCTRSHLLRASWFAYWGQGT
 LTVSA**S**EVQVWETGGSLVQPGKSLKLTCASTSGFTFSNAWMHWVRQSPEKQLEWVAQI
 KDKSNNYATYYAESLKGRFTISRDDPKRSIYLMNSLREEDTAIYYCRYVHYGIGYAMD
 AWGQGTSTVTVSS**RT**ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS
 GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV (SEQ

25 ID NO: 315, los conectores se indican en negrita y subrayados) que comprende V_{D3} de secuencia SEQ ID NO: 312, L_3 de la secuencia de aminoácidos 'S', V_{D4} de secuencia SEQ ID NO: 18, L_4 de la secuencia de aminoácidos 'RT' y C_{H1} de secuencia SEQ ID NO: 313.

30 La proteína de unión semejante a anticuerpo denominada CODV-Fab "7G3x4B4" comprende:

- un polipéptido según la fórmula I de la secuencia de aminoácidos DVVMTQTPVSLSVSLGGQVSISCRSSQSLVHDNGNTYLSWSLQRPQSPQVLIYKVSN
 RFSGTSDRFTGSGSGTDFTLKISRVEPDDLGVYYCGQGTQYPFTFGSGTKLEIK**GQPK**

AAPDFVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYLQKPGQPPKLLIY
WASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDYSYPYTFGGG**TKLEIK**
TKGPS**RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ**

5 ID NO: 316, los conectores se indican en negrita y subrayados) que comprende V_{D1} de secuencia SEQ ID NO: 16, L_1 de secuencia SEQ ID NO: 307, V_{D2} de secuencia SEQ ID NO: 308, L_2 de secuencia SEQ ID NO: 309 y C_L de secuencia SEQ ID NO: 310, y

- un polipéptido según la fórmula II de la secuencia de aminoácidos
 EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYYMKWVKQSHGKSLEWIGDIIPSN

10 FYNQKFKGKATLTVDRSSSTAYMHLNSLTSEDSAVYYCTRSHLLRASWFAYWGQGT
 LTVSA**SE**EVQLVETGGRLVQPGRSLKLTCASTGFTFSNAWMHWVRQSPEKQLEWVAQI
 KARSNNYATYYAESVKGRFTISRDDSKSTIYLMNSLKEEDTAIYYCRGTYASKPFDY
 WGQGVMTVSS**RT**ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
 ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV (SEQ

15 ID NO: 317, los conectores se indican en negrita y subrayados) que comprende V_{D3} de secuencia SEQ ID NO: 312, L_3 de la secuencia de aminoácidos 'S', V_{D4} de secuencia SEQ ID NO: 12, L_4 de la secuencia de aminoácidos 'RT' y C_{H1} de secuencia SEQ ID NO: 313.

20 La proteína de unión semejante a anticuerpo denominada CODV-Fab "7G3x18F5" comprende:

- un polipéptido según la fórmula I de la secuencia de aminoácidos
 DVLMTQTPVSLSVSLGGQVSISCRSSQSLVHTNGNTYLSWYLQKPGQSPQLLIYKVS
 NRLSGISDRFSGSGSGTDFTLKISRVEPDDLGVYYCGQGTHYPFTFGAGTKLELK**GOPK**

25 **AAPDFVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYLQKPGQPPKLLIY**
WASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDYSYPYTFGGG**TKLEIK**
TKGPS**RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ**
ESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ

ID NO: 318, los conectores se indican en negrita y subrayados) que comprende V_{D1} de secuencia SEQ ID NO: 26, L_1 de secuencia SEQ ID NO: 307, V_{D2} de secuencia SEQ ID NO: 308, L_2 de secuencia SEQ ID NO: 309 y C_L de secuencia SEQ ID NO: 310, y

- un polipéptido según la fórmula II de la secuencia de aminoácidos
 EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYYMKWVKQSHGKSLEWIGDIIPSN
 GATFYNQKFKGKATLTVDRSSSTAYMHLNSLTSEDSAVYYCTRSHLLRASWFAYWGQGT

VTVSASSEVQVETGGSLVQPGKSLKLTCA⁵SGFTFTNAWMHWRRSPEKQLEWVAQI
 KDKSN⁵NYATYYAESVKGRFTISRDDSKSS⁵YLQMNSLKEEDTAIYYCRYVHYRFAYALD
 AWGRGTSVSVSS⁵RTASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS
 GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV (SEQ
 ID NO: 319, los conectores se indican en negrita y subrayados) que comprende V_{D3} de
 secuencia SEQ ID NO: 312, L_3 de la secuencia de aminoácidos 'S', V_{D4} de secuencia
 SEQ ID NO: 23, L_4 de la secuencia de aminoácidos 'RT' y C_{H1} de secuencia SEQ ID
 NO: 313.

La proteína de unión semejante a anticuerpo denominada CODV-Fab
 "hz20G6x7G3" comprende:

- un polipéptido según la fórmula I de la secuencia de aminoácidos
 DFMVTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLN¹⁰SGNQKNYLTWYLQKPGQPPKLLIYWAS
 TRESGV¹⁰PDRFTGSGSGTDFTLTIS¹⁰SVQAEDLAVYYCQNDYSYPYTFGGG¹⁰TKLEIKGOP
KAAPDIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLVHNNGNTYLSWYLQKPGQSPQSLIYK
 VSNR¹⁵FGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCGQGTQYPFTFGSGTKVEIKT
KGPSRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV¹⁵VCLLN¹⁵FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
 SVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ
 ID NO: 320, los conectores se indican en negrita y subrayados) que comprende V_{D1} de
 secuencia SEQ ID NO: 308, L_1 de secuencia SEQ ID NO: 307, V_{D2} de secuencia SEQ ID
 NO: 143, L_2 de secuencia SEQ ID NO: 309 y C_L de secuencia SEQ ID NO: 310, y

- un polipéptido según la fórmula II de la secuencia de aminoácidos
 QVQLVESGGGVVQPG²⁰RLRLSCAASGFTFTKAWMHWRQAPGKQLEWVAQIKDKSN
 SYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCRGVYYALSPFDYWGQ
 GTLVTVSSSEVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYYMKWKQSHGKSLEWI
 GDIIP²⁵SN²⁵GATFYNQKFKGKATLTVD²⁵RSSTAYMHLNSLTSEDSAVYYCT²⁵RSHLLRASWF
 AYWGQGTLVTVSAS²⁵RTASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
 SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV
 (SEQ ID NO: 321, los conectores se indican en negrita y subrayados) que comprende
 V_{D3} de secuencia SEQ ID NO: 138, L_3 de la secuencia de aminoácidos 'S', V_{D4} de
 secuencia SEQ ID NO: 312, L_4 de la secuencia de aminoácidos 'RT' y C_{H1} de secuencia
 SEQ ID NO: 313.

La proteína de unión semejante a anticuerpo denominada CODV-Fab “7G3xhz4B4” comprende:

- un polipéptido según la fórmula I de la secuencia de aminoácidos

DVVMQTQTPVSLSVSVGGRVSISCRSSQSLVHDNGNTYLSWSLQKPGKSPKVLIIYKVS
 5 RFSGVSSRFTGSGSGTDFTLKISSVQPDDLGVYYCGQGTQYPFTFGSGTKLEIK**GQPK**
AAPDFVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYLQKPGQPPKLLIY
 WASTRESGVDPDRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDLAVYYCQNDYSYPYTFGGGTKLEIK
TKGPSRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
 ESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

10 (SEQ ID NO: 322, los conectores se indican en negrita y subrayados) que comprende
 V_{D1} de secuencia SEQ ID NO: 158, L₁ de secuencia SEQ ID NO: 307, V_{D2} de secuencia
 SEQ ID NO: 308, L₂ de secuencia SEQ ID NO: 309 y C_L de secuencia SEQ ID NO: 310,
 y

- un polipéptido según la fórmula II de la secuencia de aminoácidos

15 EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYYMKWVKQSHGKSLEWIGDIIPSNGAT
 FYNQKFKGKATLTVDRSSSTAYMHLNSLTSEDSAVYYCTRSHLLRASWFAYWGQGT
 LTVSA**S**QVQLVETGGGLVKPGQSLKLTCASTGFTFSNAWMHWVRQSPEKGLEWVAQI
 KARSNNYATYYAESVKGRFTISRDDSKSTIYLQMNSLTPEDTAIYYCRGTYASKPFDY
 WGQGVMTVSS**RT**ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
 20 ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV (SEQ
 ID NO: 323, los conectores se indican en negrita y subrayados) que comprende V_{D3} de
 secuencia SEQ ID NO: 312, L₃ de la secuencia de aminoácidos ‘S’, V_{D4} de secuencia
 SEQ ID NO: 171, L₄ de la secuencia de aminoácidos ‘RT’ y C_{H1} de secuencia SEQ ID
 NO: 313.

25

La proteína de unión semejante a anticuerpo denominada CODV-Fab “hz4B4x3E3” comprende:

- un polipéptido según la fórmula I de la secuencia de aminoácidos

QFVLTQPNVSTNLGSTVKLSCKRNTGNIGSNYVNWYQQHEGRSPTTMIYRDDKRPD
 30 GVPDRFSGSIDRSSNSALLTINNVTEDADYFCQSYSSGINIIFGGGTLTVL**GQPKAA**
PDVVMQTQTPVSLSVSVGGRVSISCRSSQSLVHDNGNTYLSWSLQKPGKSPKVLIIYKVS
 NRFSGVSSRFTGSGSGTDFTLKISSVQPDDLGVYYCGQGTQYPFTFGSGTKLEIK**TKG**
PSRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV
 TEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID

NO: 324, los conectores se indican en negrita y subrayados) que comprende V_{D1} de secuencia SEQ ID NO: 230, L_1 de secuencia SEQ ID NO: 307, V_{D2} de secuencia SEQ ID NO: 158, L_2 de secuencia SEQ ID NO: 309 y C_L de secuencia SEQ ID NO: 310, y

- un polipéptido según la fórmula II de la secuencia de aminoácidos

5 QVQLVETGGGLVKPGQSLKLTCA¹SGFTFSNAWMHWVRQSP²EKGLEWVAQIKARSN
 NYATYYAESVKGRFTISRDDSKSTIYLQMNSLTPE³DTAIYYCRGTY⁴YASKPF⁵DYWGQGV
 MVTVSSSQVQLQESGPGLVQPSQTLSTCTVSGFSLTTYDVHWVRQPPGKGLEW⁶MG
 RIQNGGITDYNSALKSR⁷LIISRDTSKSQVFLKMNSVQTEDTAMYFCAK⁸TGSYFYAFDHW
 GQGTLVTVSSRTASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
 10 TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV⁹PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV (SEQ ID
 NO: 325, los conectores se indican en negrita y subrayados) que comprende V_{D3} de
 secuencia SEQ ID NO: 171, L_3 de la secuencia de aminoácidos 'S', V_{D4} de secuencia
 SEQ ID NO: 226, L_4 de la secuencia de aminoácidos 'RT' y C_{H1} de secuencia SEQ ID
 NO: 313.

15

La proteína de unión semejante a anticuerpo denominada CODV-Fab
 "hz20G6xhz7G3" comprende:

- un polipéptido según la fórmula [I] que consiste esencialmente en la secuencia
 de aminoácidos:

20 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCESSQSL¹NSGNQKNYLTWYQQKPGQP²PKPLIY
 WASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIS³SLQAEDVAVYYCQNDYSYPYTFGQGT⁴KLEIK
GGSGSSGSGGDIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLVHNNANTYLSWYLQKPGQ
 SPQSLIYKVS⁵NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCGQGTQYPFTFGS
 GTKVEIKGGSGSSGSGGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW
 25 KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
 KSFNRGEC (SEQ ID NO: 388, los conectores se indican en negrita y subrayados) que
 comprende V_{D1} de secuencia SEQ ID NO: 385, L_1 de secuencia SEQ ID NO: 389, V_{D2}
 de secuencia SEQ ID NO: 141, L_2 de secuencia SEQ ID NO: 389 y C_L de secuencia
 SEQ ID NO: 310, y

30 - un polipéptido según la fórmula [II] que consiste esencialmente en la secuencia
 de aminoácidos

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFTKAWMHWRQAPGKQLEWVAQIK
 DKSNSYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCRGVYYALSPFDY
 WGQGT¹LVTVSSEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTDYYMKWARQMPGKGL

EWMGDIIPSSGATFYNQKFKGQVTISADKSISTTYLQWSSLKASDTAMYYCARSHLLRA
SWFAYWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
 NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV

- (SEQ ID NO: 390) que comprende VD₃ de secuencia SEQ ID NO: 138, L₃ es 0 aminoácido, VD₄ de secuencia SEQ ID NO: 383 (en *itálica y subrayado*), L₄ es 0 aminoácido y CH₁ de secuencia SEQ ID NO: 313.

En un ejemplo, los polipéptidos según la fórmula II de las proteínas de unión semejantes a anticuerpo denominadas CODV-Fab "7G3x20G6", "7G3x4E7", "7G3x4B4", "7G3x18F5", "hz20G6x7G3", "7G3xhz4B4", "hz4B4x3E3" y "hz20G6xhz7G3" comprenden además la secuencia EPKSCDKTHTHHHHH (SEQ ID NO: 352) correspondiente a una secuencia bisagra y una etiqueta His usada, por ejemplo, para la purificación.

La proteína de unión semejante a anticuerpo denominada CODV-Fab "hz20G6x7G3-TL4" (también denominada CODV-Fab-TL4 "hz20G6x7G3") comprende:
 - un polipéptido según la fórmula [IV] que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos

DFVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYLQKPGQPPKLLIYWAS
 TRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDLAVYYCQNDYSYPYTFGGGTKLEIK**GQP**
KAAPDIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLVHNNGNTYLSWYLQKPGQSPQSLIYK
 VSNRFGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCGQGTQYPFTFGSGTKVEIK**T**
KGPSRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
 SVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECES**KY****G**
PPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAK
GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQOPENNYKTTTPVL
DSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSLG (SEQ ID NO:
 326, los conectores se indican en **negrita y subrayados**) que comprende V_{D1} de
 secuencia SEQ ID NO: 308, L₁ de secuencia SEQ ID NO: 307, V_{D2} de secuencia SEQ ID
 NO: 143, L₂ de secuencia SEQ ID NO: 309, C_L de secuencia SEQ ID NO: 310 y F_{c2}
 (subrayado) de secuencia SEQ ID NO: 327, y
 - un polipéptido según la fórmula [III] de la secuencia de aminoácidos
 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFTKAWMHWRQAPGKQLEWVAQIKDKSN
 SYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCRGVYYALSPFDYWQG

GTLVTVSSSEVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYYMKWVKQSHGKSLEWI
 GDIIPSNNGATFYNQKFKGKATLTVDRSSSTAYMHLNSLTSEDSAVYYCTRSHLLRASWF
 AYWGGQGLVTVSARRTASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS
 GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESK
 5 YGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYV
 DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS
 KAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
 PPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID
 NO: 328, los conectores se indican en negrita y subrayados) que comprende V_{D3} de
 10 secuencia SEQ ID NO: 138, L_3 de la secuencia de aminoácidos 'S', V_{D4} de secuencia
 SEQ ID NO: 312, L_4 de la secuencia de aminoácidos 'RT', y C_{H1} de secuencia SEQ ID
 NO: 329, y F_c de secuencia SEQ ID NO: 330.

En la proteína de unión semejante a anticuerpo anterior CODV-Fab-TL4
 15 "hz20G6x7G3", la F_c de secuencia SEQ ID NO: 330 y F_{c2} de secuencia SEQ ID NO:
 327 son de un núcleo IgG4. Dicha proteína de unión semejante a anticuerpo está en un
 formato CODV-Fab-TL y contiene o consiste en un polipéptido de fórmula III y un
 polipéptido fórmula IV.

20 La proteína de unión semejante a anticuerpo denominada CODV-Fab-TL1
 "hz20G6xhz7G3" comprende:

- un polipéptido según la fórmula IV de la secuencia de aminoácidos

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCESSQSLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKPLIYWAS
 TRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQNDYSYPYTFGQGTKLEIKGGS
 25 GSSGSGGDIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLVHNNANTYLSWYLQKPGQSPQS
 LIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCGQGTQYPFTFGSGTKV
 EIKGSGSGSGSGGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN
 ALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN
 RGECDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVK
 30 FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPG
 (SEQ ID NO: 391, los conectores se indican en negrita y subrayados) que comprende
 V_{D1} de secuencia SEQ ID NO: 385, L_1 de secuencia SEQ ID NO: 389, V_{D2} de secuencia

SEQ ID NO: 141, L_2 de secuencia SEQ ID NO: 389, C_L de secuencia SEQ ID NO: 310, L_5 que contiene 0 aminoácidos, y F_{c2} (subrayado) de secuencia SEQ ID NO: 392; y

- un polipéptido según la fórmula III de la secuencia de aminoácidos

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFTKAWMHVWRQAPGKQLEWVAQIKDKSN
 5 SYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCRGVYYALSPFDYWGQ
 GTLTVTSSEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTDYMKWARQMPGKGLEWM
 GDIIPSSGATFYNQFKGQVTISADKSISTTYLQWSSLKASDTAMYYCARSHLLRASWF
 AYWGQGTMTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
 ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
 10 DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP
PVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

(SEQ ID NO : 393) que comprende V_{D3} de secuencia SEQ ID NO: 138, L_3 es 0 aminoácidos, V_{D4} de secuencia SEQ ID NO: 383 (en itálica), L_4 es 0 aminoácidos, C_{H1} de secuencia SEQ ID NO: 313, y F_c (subrayado) de secuencia SEQ ID NO: 394.

En la proteína de unión semejante a anticuerpo CODV-Fab-TL1 “hz20G6x7G3, el F_c de secuencia SEQ ID NO: 394 y F_{c2} de secuencia SEQ ID NO: 392 son de un núcleo IgG1. Dicha proteína de unión semejante a anticuerpo está en un formato CODV-Fab-
 20 TL. Contiene o consiste en un polipéptido de fórmula IV y un polipéptido de fórmula III.

La proteína de unión semejante a anticuerpo denominada CODV-Fab-OL1 “hz20G6xhz7G3” comprende:

- un polipéptido según la fórmula I de la secuencia de aminoácidos

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCESSQSLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKPLIWAS
 25 TRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQNDYSYPYTFGQGTKLEIK**GGS**
GSSGSGGDIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLVHNNANTYLSWYLQKPGQSPQS
 LIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCGQGTQYPFTFGSGTKV
 EIK**GGS****GSSGSGG**RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN
 30 ALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN
 RGEC

(SEQ ID NO: 388, los conectores se indican en negrita y subrayados) que comprende V_{D1} de secuencia SEQ ID NO: 385, L_1 de secuencia SEQ ID NO: 389, V_{D2} de secuencia

SEQ ID NO: 141, L₂ de secuencia SEQ ID NO: 389, y C_L de secuencia SEQ ID NO: 310;
y

- un polipéptido según la fórmula III de la secuencia de aminoácidos

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFTKAWMHWRQAPGKQLEWVAQIKDKSN
5 SYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCRGVYYALSPFDYWGQ
GTLVTVSSEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTDYMKWARQMPGKGLEWM
GDIIPSSGATFYNQKFKGQVTISADKSISTTYLQWSSLKASDTAMYYCARSHLLRASWF
AYWGQGTMTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
10 DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN**R**FTQKSLSLSPG

(SEQ ID NO : 395) que comprende V_{D3} de secuencia SEQ ID NO: 138, L₃ es 0
15 aminoácidos, V_{D4} de secuencia SEQ ID NO: 383 (en itálica y subrayado), L₄ es 0
aminoácidos, C_{H1} de secuencia SEQ ID NO: 313, y F_c (subrayado) de secuencia SEQ ID
NO: 396;

y en el que la proteína de unión semejante a anticuerpo denominada CODV-Fab-
OL1 “hz20G6xhz7G3” comprende además una porción Fc (F_{c3}) de la secuencia de
20 aminoácidos:

GSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVCTLPISRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN**H**YTQKSLSLSPG

25 (SEQ ID NO: 397) u que heterodimeriza con la región Fc del polipéptido según la
fórmula III.

Dicha proteína de unión semejante a anticuerpo está en un formato CODV-Fab-
OL, es decir, contiene o consiste en un polipéptido de fórmula I, un polipéptido de
fórmula III, y una porción Fc. Sus secuencias de F_c y F_{c3} se han modificado por
30 ingeniería según la tecnología “Botón en ojal” y contienen además la doble mutación
L234A y L235A.

La secuencia de F_c de secuencia SEQ ID NO: 396 se ha diseñado para contener
residuos RF en las posiciones 200-221 (en negrita anteriormente), en lugar de residuos
HY que hubieran estado presentes de otra manera en estas posiciones de la región Fc.

La mutación HY > RF (es decir, H435R y Y436F en el dominio CH3 como se describe por Jendeborg, L. et al. 1997, J. Immunological Meth., 201: 25-34) es ventajosa para propósitos de purificación ya que suprime la unión a proteína A. En el caso de CODV-Fab-OL1 “hz20G6xhz7G3”, la porción el F_c de secuencia SEQ ID NO: 397 comprende
 5 residuos HY en las posiciones 217-218 (en negrita anteriormente).

La proteína de unión semejante a anticuerpo denominada CODV-Fab-OL1a “hz20G6xhz7G3” comprende:

- un polipéptido según la fórmula I de la secuencia de aminoácidos

10 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCESSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKPLIYWAS
 TRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQNDYSYPYTFGQGTKLEIK**GGG**
GSSGSGGDIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLVHNNANTYLSWYLQKPGQSPQS
 LIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCGQGTQYPFTFGSGTKV
 EIK**GGGSGSSGSGG**RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN
 15 ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN
 RGEC

(SEQ ID NO: 388) que comprende V_{D1} de secuencia SEQ ID NO: 385, L₁ de secuencia SEQ ID NO: 389, V_{D2} de secuencia SEQ ID NO: 141, L₂ de secuencia SEQ ID NO: 389, y C_L de secuencia SEQ ID NO: 310;

20 - un polipéptido según la fórmula III de la secuencia de aminoácidos:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFTKAWMHWRQAPGKQLEWVAQIKDKSN
 SYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCRGVYYALSPFDYWGQ
 GTLTVTSSEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTDYMKWARQMPGKGLEWM
GDIIPSSGATFYNQKFKGQVTISADKSISTTYLQWSSLKASDTAMYICARSHLLRASWF
 25 AYWGQGTMTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
 ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
 30 PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

(SEQ ID NO: 399) que comprende V_{D3} de secuencia SEQ ID NO: 138, L₃ es 0 aminoácidos, V_{D4} de secuencia SEQ ID NO: 383 (en itálica y subrayado), L₄ es 0 aminoácidos, C_{H1} de secuencia SEQ ID NO: 313, y F_c (subrayado) de secuencia SEQ ID NO: 400;

- y en el que la proteína de unión semejante a anticuerpo denominada CODV-Fab-OL1a "hz20G6xhz7G3" comprende además una porción Fc (Fc₃) de la secuencia de aminoácidos:

GSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
 5 WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
 KTISKAKGQPREPQVCTLPSPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
 KTTTPVLDSGSSFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN**RFT**QKSLSLSPG
 (SEQ ID NO: 398) que heterodimeriza con la región Fc del polipéptido según la fórmula III.

10 El Fc de secuencia SEQ ID NO: 400 comprende residuos HY en las posiciones 200-221 (en negrita anteriormente) mientras la porción el Fc de secuencia SEQ ID NO: 398 comprende residuos RF en las posiciones 217-218 (en negrita anteriormente).

Dicha proteína de unión semejante a anticuerpo está en un formato CODV-Fab-OL, es decir, contiene o consiste en un polipéptido de fórmula I, un polipéptido de
 15 fórmula III y una porción Fc. Sus secuencias de Fc y Fc₃ se han modificado por ingeniería según la tecnología "Botón en ojal" y contienen la doble mutación L234A y L235A.

En una realización, la primera inmunoglobulina o la segunda inmunoglobulina es un anticuerpo anti-CD123 seleccionado de los anticuerpos anti-CD123 denominados
 20 "3E3-D3", "1E1-G5", "2B8-F3", "2F8-D6", "3B10-E6", "5A5-B4", "6B10-E4", "6C10-C4", "6D6-B8", "8B11-B7", "9B8-G6", "9D7-C8", y "9F6-G3", o una forma humanizada de éstos, o el anticuerpo anti-CD123 "7G3" descrito más adelante en la presente memoria, por ejemplo, los anticuerpos anti-CD123 "3E3-D3" o "7G3", o una forma humanizada de éstos.

25

En una realización, la primera inmunoglobulina o la segunda inmunoglobulina es un anticuerpo anti-CD3 seleccionado de los anticuerpos anti-CD3 denominados "20G6-F3", "4B4-D7", "4E7-C9", "18F5-H10", "12D2-E5", "11D7-C3", "11H3-E5", "13H2-C2", "13C1-F6", "18H11-F10", "1E6-C9", "10F4-C10", "10E6-G6", "18G9-H11", "11F3-B9",
 30 "12G3-E8", "5B1-G2", "16F8-A7", "11F9-F8", "3G5-E10", "9D7-F3", "8C2-F7", "20E5-F10", "20B5-F10", "6C9-C9", "3E8-G1", "3H6-D2", y "8H2", o una forma humanizada de éstos, por ejemplo, los anticuerpos anti-CD3 denominados "20G6-F3", "4B4-D7", "4E7-C9", "18F5-H10", y "hz20G6", por ejemplo, los anticuerpos anti-CD3 denominados "20G6-F3", "4B4-D7".

De acuerdo con esto, V_{D1} y V_{D4} , o V_{D2} y V_{D3} son los dominios variables de una cadena pesada o ligera de un anticuerpo anti-CD3, en el que dicho anticuerpo anti-CD3 comprende:

- 5 a) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 6, CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 7, CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 8 y un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 142, CDR2-L de secuencia 'KVS' y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 11; o
- 10 b) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 13, CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 14, CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 15 y un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 184, CDR2-L de secuencia 'KVS' y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 11; o
- 15 c) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 13, CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 19, CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 20 y un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 22, CDR2-L de secuencia 'KVS' y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 11; o
- 20 d) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 24, CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 19, CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 25 y un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 27, CDR2-L de secuencia 'KVS' y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 28, y
- 25 en el que V_{D1} es el dominio variable de cadena pesada como se ha definido anteriormente si V_{D4} es el dominio variable de cadena ligera o V_{D1} es el dominio variable de la cadena ligera como se ha definido anteriormente si V_{D4} es el dominio variable de la cadena pesada, o
- 30 V_{D2} es el dominio variable de cadena pesada como se ha definido anteriormente si V_{D3} es el dominio variable de cadena ligera o V_{D2} es el dominio variable de la cadena ligera como se ha definido anteriormente si V_{D3} es el dominio variable de la cadena pesada.

En una realización adicional, V_{D1} y V_{D4} o V_{D2} y V_{D3} son los dominios variables de una cadena pesada o ligera de un anticuerpo anti-CD3, en el que dicho anticuerpo anti-CD3 es un anticuerpo humanizado y comprende:

- 5 a) un dominio variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID NO: 138, o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta y/o un dominio variable de cadena ligera de secuencia SEQ ID NO: 143, o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta; o
 - 10 b) un dominio variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID NO: 171, o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta y/o un dominio variable de cadena ligera de secuencia SEQ ID NO: 158, o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta; o
 - 15 c) un dominio variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID NO: 176, o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta y/o un dominio variable de cadena ligera de secuencia SEQ ID NO: 164, o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta; o
- en el que V_{D1} es el dominio variable de cadena pesada como se ha definido anteriormente si V_{D4} es el dominio variable de cadena ligera o V_{D1} es el dominio variable de la cadena ligera como se ha definido anteriormente si V_{D4} es el dominio variable de la cadena pesada, o
- 20 V_{D2} es el dominio variable de cadena pesada como se ha definido anteriormente si V_{D3} es el dominio variable de cadena ligera o V_{D2} es el dominio variable de la cadena ligera como se ha definido anteriormente si V_{D3} es el dominio variable de la cadena pesada.

25 En dicha secuencia al menos 85% idéntica a SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 176, o SEQ ID NO: 164, las secuencias de las 6 CDR no están cambiadas comparadas con las 6 CDR presentes en la secuencia de referencia SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 176, or SEQ ID NO: 164.

30 En una realización, la proteína de unión semejante a anticuerpo de la invención se une a CD3 humano. En otra realización, la proteína de unión semejante a anticuerpo de la invención se une además a CD3 de *Macaca fascicularis*. En particular, la proteína de unión semejante a anticuerpo de la invención se une al dominio extracelular de CD3

humano, o tanto de CD3 humano como de *Macaca fascicularis*. Más específicamente, el anticuerpo se une a CD3ε. Más específicamente, la proteína de unión semejante a anticuerpo se une al dominio extracelular humano o humano y de *Macaca fascicularis* de CD3ε. La proteína de unión semejante a anticuerpo se une a CD3ε cuando está presente en la forma de un complejo, tal como un complejo CD3ε/δ, o cuando está presente como una única proteína, independientemente de si se expresa en forma aislada, o está presente en un dominio extracelular soluble o CD3ε de longitud completa anclada a la membrana como está presente, por ejemplo, en las células T. La proteína de unión semejante a anticuerpo según la invención es específica para la proteína CD3 de superficie humana, o proteínas CD3 tanto humana como de *Macaca fascicularis*, en particular para CD3ε.

La proteína de unión semejante a anticuerpo según la invención tiene una proporción de afinidad para CD3 de *Macaca fascicularis* sobre afinidad para CD3 humana ($KD(\textit{Macaca fascicularis}) / KD(\textit{humana})$) que es ≤ 10 , en particular ≤ 6 , ≤ 5 , ≤ 4 , ≤ 3 , ≤ 2 , ≤ 1 ó $\leq 0,5$. Así, la proteína de unión semejante a anticuerpo según la invención puede usarse en estudios toxicológicos realizados en monos, siendo el perfil de toxicidad observado en monos relevante para anticipar efectos adversos potenciales en los seres humanos.

Además, la proteína de unión semejante a anticuerpo según la invención tiene una afinidad (KD) para CD3 humana o CD3 de *Macaca fascicularis*, o ambas, que es $\leq 50\text{nM}$, $\leq 40\text{nM}$, o $\leq 30\text{nM}$, por ejemplo, $\leq 20\text{nM}$, por ejemplo una afinidad de 0,1 nM a 30 nM, en particular de 0,4 nM a 20 nM, o de 0,4 nM a 15 nM.

En una realización, la proteína de unión semejante a anticuerpo de la invención tiene una activación de células T que es menor que menos de 20%, menos de 18%, menos de 16%, menos de 14%, menos de 12%, menos de 10% en ausencia de células diana.

En una realización, la proteína de unión semejante a anticuerpo de la invención tiene una activación de células T que es mayor de 55%, mayor de 60%, mayor de 62%, mayor de 64%, mayor de 66%, mayor de 68%, mayor de 70% en presencia de células diana.

“Baja activación de células T” en el contexto de las proteínas de unión semejantes a anticuerpo de la invención se refiere a una activación de células T que es menos de 20%, menos de 18%, menos de 16%, menos de 14%, menos de 12%, menos de 10%.

5 “Células diana” en la presente memoria se refiere a células que expresan el segundo antígeno, en un ejemplo células diana en la presente memoria se refiere a células que expresan CD123 tales como células THP-1.

“Alta activación de células T” en la presente memoria se refiere a una activación de células T mayor de 50%, mayor de 55%, mayor de 60%, mayor de 62%, mayor de 64%, mayor de 66%, mayor de 68%, mayor de 70%.

10

En una realización adicional, la invención se refiere a una proteína de unión semejante a anticuerpo que tiene especificidad biológica e inmunológica para al menos un antígeno diana adicional.

15 Por lo tanto, en un aspecto de la invención, la proteína de unión semejante a anticuerpo se une además al menos a otro antígeno diana. De acuerdo con esto, en una realización, la proteína de unión semejante a anticuerpo de la invención es biespecífica y capaz de unirse a dos antígenos diana o epítomos diferentes.

20 De acuerdo con esto, en una realización, la primera inmunoglobulina es una inmunoglobulina dirigida frente al menos una diana adicional si la segunda inmunoglobulina es un anticuerpo anti-CD123 como se define en la sección «anticuerpos anti-CD123» anterior, o la segunda inmunoglobulina es una inmunoglobulina dirigida frente al menos una diana adicional si la primera inmunoglobulina es un anticuerpo anti-CD123 como se define en la sección «anticuerpos anti-CD123» anterior.

25 En una realización adicional, la primera inmunoglobulina es una inmunoglobulina dirigida frente al menos una diana adicional si la segunda inmunoglobulina es un anticuerpo anti-CD3 como se define en la sección «anticuerpos anti-CD3» anterior, o la segunda inmunoglobulina es una inmunoglobulina dirigida frente al menos una diana adicional si la primera inmunoglobulina es un anticuerpo anti-CD3 como se define en la
30 sección «anticuerpos anti-CD3» anterior.

La proteína de unión semejante a anticuerpo de la invención tiene un efecto conector de células T. Este efecto conector de células T induce citotoxicidad en la célula

diana. En una realización, la célula diana es una célula que expresa CD123, tal como una célula de cáncer que expresa CD123, por ejemplo THP-1 o TF-1.

De acuerdo con esto, en una realización, la proteína de unión semejante a anticuerpo según la invención es capaz de conectar células T primarias y lisar las células diana *in vitro* en el que la (CE₅₀) es ≤40pM, ≤35pM, por ejemplo, ≤30pM.

“Citotoxicidad” en la presente memoria se refiere a la cualidad de un compuesto, tal como la proteína de unión semejante a anticuerpo o un anticuerpo anti-CD123 de la invención, de ser tóxica para células. La citotoxicidad puede inducirse por mecanismos de acción diferentes y puede dividirse así en citotoxicidad mediada por células, apoptosis, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC) o citotoxicidad dependiente de complemento (CDC).

“Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo” o “ADCC” se refiere a un mecanismo de defensa inmune mediada por células mediante el cual una célula efectora del sistema inmune lisa activamente una célula diana, cuyos antígenos de superficie de membrana han sido unidos por anticuerpos específicos.

“Citotoxicidad dependiente de complemento” o “CDC”, en el contexto de la invención, se refiere a la lisis de una célula diana en presencia de proteínas del sistema del complemento.

“Citotoxicidad mediada por células” se refiere a la citolisis de una célula diana por linfocitos efectores, tales como linfocitos T citotóxicos o células asesinas naturales y puede distinguirse así en citotoxicidad mediada por células T y citotoxicidad de células NK.

En una realización, la citotoxicidad en la presente memoria se refiere a citotoxicidad mediada por células por ejemplo citotoxicidad mediada por células T.

Además, en una realización, la citotoxicidad mediada por células se refiere a citotoxicidad mediada por células por células T.

De acuerdo con esto, la proteína de unión semejante a anticuerpo de la invención induce la citotoxicidad mediada por células en la célula diana mediada por células T.

Los métodos para medir la citotoxicidad son conocidos para el experto en la técnica e incluyen usar el ensayo de liberación de 51-Cromio (Cr), tinción de células vivas/muertas de células diana incluyendo yoduro de propidio, 7-AAD, y otras tinciones que son conocidas para el experto en la técnica, detección de moléculas líticas liberadas por las células T incluyendo granzima y perforina por citometría de flujo o

ELISA, detección de lactato deshidrogenasa (LDH) liberada en el medio por células dañadas como un biomarcador de citotoxicidad y citolisis celular, detección de movilización en la superficie celular de CD107a, Anexina V (proteínas de unión de fosfolípidos dependientes de calcio) tinción de células diana apoptóticas y por ejemplo detección de Caspasa-3 activada (CASP3).. Además, el experto en la técnica puede distinguir entre los diferentes mecanismos de citotoxicidad tomando como base el ensayo seleccionado y tomando como base la disposición experimental.

En un ejemplo, la citotoxicidad mediada por células puede medirse por ejemplo usando CFSE para marcar las células diana y 7-AAD para marcar las células muertas como se describe, por ejemplo, en el ejemplo 3.2.

En una realización adicional, la proteína de unión semejante a anticuerpo es capaz de unirse a CD3 y al menos una diana antigénica adicional, por ejemplo CD123.

En una realización, la proteína de unión semejante a anticuerpo es capaz de inhibir la función de esta diana antigénica adicional, por ejemplo CD123.

En un aspecto de la invención, la proteína de unión semejante a anticuerpo se une a CD123 humano. En otra realización, la proteína de unión semejante a anticuerpo se une además a CD123 de *Macaca fascicularis*. En particular, la proteína de unión semejante a anticuerpo de la invención se une al dominio extracelular de CD123 humano, o tanto de CD123 humano como de *Macaca fascicularis*. Más específicamente, la proteína de unión semejante a anticuerpo se une al resto distal de CD123, por ejemplo, a los aminoácidos que empiezan desde la posición 19 a 49 de CD123 humano de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 104. La proteína de unión semejante a anticuerpo se une a CD123, independientemente de si se expresa en forma aislada, o está presente en un dominio soluble extracelular o CD123 anclado a membrana de longitud completa como está presente en células que expresan CD123 tales como células AML o células transfectadas con CD123. La proteína de unión semejante a anticuerpo según la invención es específica de células que expresan proteínas CD123 humanas o humanas y de *Macaca fascicularis* en su superficie, por ejemplo células de cáncer que expresan CD123.

De acuerdo con esto, la proteína de unión semejante a anticuerpo según la invención tiene una afinidad (KD) para CD123 humana o CD123 de *Macaca fascicularis*,

o ambas, que es $\leq 20\text{nM}$, $\leq 15\text{nM}$, o $\leq 10\text{nM}$, por ejemplo, $\leq 5\text{nM}$, por ejemplo una afinidad de $0,01\text{ nM}$ a 5 nM , en particular de $0,1\text{ nM}$ a 5 nM .

De acuerdo con esto, en una realización, la primera inmunoglobulina es un anticuerpo anti-CD3 seleccionado de los anticuerpos anti-CD3 denominados “20G6-F3”, “4B4-D7”, “4E7-C9”, “18F5-H10”, “12D2-E5”, “11D7-C3”, “11H3-E5”, “13H2-C2”, “13C1-F6”, “18H11-F10”, “1E6-C9”, “10F4-C10”, “10E6-G6”, “18G9-H11”, “11F3-B9”, “12G3-E8”, “5B1-G2”, “16F8-A7”, “11F9-F8”, “3G5-E10”, “9D7-F3”, “8C2-F7”, “20E5-F10”, “20B5-F10”, “6C9-C9”, “3E8-G1”, “3H6-D2”, y “8H2”, o una forma humanizada de éstos, por ejemplo, los anticuerpos anti-CD3 denominados “20G6-F3”, “4B4-D7”, “4E7-C9”, “18F5-H10”, “hz4B4” y “hz20G6”, y la segunda inmunoglobulina es un anticuerpo anti-CD123 seleccionado de los anticuerpos anti-CD123 denominados “3E3-D3”, “1E1-G5”, “2B8-F3”, “2F8-D6”, “3B10-E6”, “5A5-B4”, “6B10-E4”, “6C10-C4”, “6D6-B8”, “8B11-B7”, “9B8-G6”, “9D7-C8”, y “9F6-G3”.

De acuerdo con esto, en una realización adicional, la segunda inmunoglobulina es un anticuerpo anti-CD3 seleccionado de los anticuerpos anti-CD3 denominados “20G6-F3”, “4B4-D7”, “4E7-C9”, “18F5-H10”, “12D2-E5”, “11D7-C3”, “11H3-E5”, “13H2-C2”, “13C1-F6”, “18H11-F10”, “1E6-C9”, “10F4-C10”, “10E6-G6”, “18G9-H11”, “11F3-B9”, “12G3-E8”, “5B1-G2”, “16F8-A7”, “11F9-F8”, “3G5-E10”, “9D7-F3”, “8C2-F7”, “20E5-F10”, “20B5-F10”, “6C9-C9”, “3E8-G1”, “3H6-D2”, y “8H2”, o una forma humanizada de éstos, por ejemplo, los anticuerpos anti-CD3 denominados “20G6-F3”, “4B4-D7”, “4E7-C9”, “18F5-H10”, “hz4B4” y “hz20G6”, y la primera inmunoglobulina es un anticuerpo anti-CD123 seleccionado de los anticuerpos anti-CD123 denominados “3E3-D3”, “1E1-G5”, “2B8-F3”, “2F8-D6”, “3B10-E6”, “5A5-B4”, “6B10-E4”, “6C10-C4”, “6D6-B8”, “8B11-B7”, “9B8-G6”, “9D7-C8”, y “9F6-G3”.

De acuerdo con esto, en una realización, el V_{D1} y V_{D4} o V_{D2} y V_{D3} comprenden un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera, cada uno de ellos bien definido por tres secuencias CDR o por secuencias de dominio variable de cadena pesada y ligera de uno de los 13 anticuerpos anti-CD123 denominados “3E3-D3”, “1E1-G5”, “2B8-F3”, “2F8-D6”, “3B10-E6”, “5A5-B4”, “6B10-E4”, “6C10-C4”, “6D6-B8”, “8B11-B7”, “9B8-G6”, “9D7-C8”, y “9F6-G3” como se ha definido anteriormente,

en el que V_{D1} y V_{D4} , ambos comprenden las tres secuencias CDR de las secuencias de dominio variable de cadena pesada y ligera de uno de los anticuerpos

anti-CD123 como se ha definido anteriormente, si V_{D2} y V_{D3} , ambos comprenden tres secuencias CDR de secuencias de dominio variable de cadena pesada y ligera de uno de los anticuerpos anti-CD3 como se ha definido anteriormente, o

5 en el que V_{D2} y V_{D3} , ambos comprenden las tres CDR de las secuencias de dominio variable de cadena pesada y ligera de uno de los anticuerpos anti-CD123 como se ha definido anteriormente, si V_{D1} y V_{D4} , comprenden secuencias CDR de secuencias de dominio variable de cadena pesada y ligera de uno de los anticuerpos anti-CD3 como se ha definido anteriormente.

10 De acuerdo con esto, en una realización, V_{D1} y V_{D4} son el dominio variable de cadena pesada o ligera de un anticuerpo anti-CD3, en el que dicho anticuerpo anti-CD3 comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 6, CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 7, CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 8 y un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de
15 secuencia SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 142, CDR2-L de secuencia 'KVS' y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 11 y V_{D2} y V_{D3} son el dominio variable de cadena pesada o ligera de un anticuerpo anti-CD123 seleccionado del grupo que consiste en los anticuerpos anti-CD123 "3E3-D3", "1E1-G5", "2B8-F3", "2F8-D6", "3B10-E6", "5A5-B4", "6B10-E4", "6C10-C4", "6D6-B8", "8B11-B7", "9B8-G6", "9D7-C8", "9F6-G3" como se ha
20 descrito anteriormente en la sección "anticuerpos anti-CD123",

en el que V_{D1} y V_{D2} son ambos dominios variables de cadenas ligeras si V_{D3} y V_{D4} son ambos dominios variables de cadenas pesadas o V_{D1} y V_{D2} son ambos dominios variables de cadenas pesadas si V_{D3} y V_{D4} son ambos dominios variables de cadenas ligeras.

25

De acuerdo con esto, en una realización adicional, V_{D2} y V_{D3} son el dominio variable de cadena pesada o ligera de un anticuerpo anti-CD3, en el que dicho anticuerpo anti-CD3 comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 6, CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 7, CDR3-H
30 de secuencia SEQ ID NO: 8 y un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 142, CDR2-L de secuencia 'KVS' y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 11 y V_{D1} y V_{D4} son el dominio variable de cadena pesada o ligera de un anticuerpo anti-CD123 seleccionado del grupo que consiste en los anticuerpos anti-CD123 "3E3-D3", "1E1-G5", "2B8-F3", "2F8-D6", "3B10-E6", "5A5-

B4", "6B10-E4", "6C10-C4", "6D6-B8", "8B11-B7", "9B8-G6", "9D7-C8", "9F6-G3" como se ha descrito anteriormente en la sección "anticuerpos anti-CD123",

en el que V_{D1} y V_{D2} son ambos dominios variables de cadenas ligeras si V_{D3} y V_{D4} son ambos dominios variables de cadenas pesadas o V_{D1} y V_{D2} son ambos dominios variables de cadenas pesadas si V_{D3} y V_{D4} son ambos dominios variables de cadenas ligeras.

De acuerdo con esto, en una realización adicional, V_{D1} y V_{D4} son el dominio variable de cadena pesada o ligera de un anticuerpo anti-CD3, en el que dicho anticuerpo anti-CD3 comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 13, CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 14, CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 15 y un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 184, CDR2-L de secuencia 'KVS'y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 11 y V_{D2} y V_{D3} son el dominio variable de cadena pesada o ligera de un anticuerpo anti-CD123 seleccionado del grupo que consiste en los anticuerpos anti-CD123 "3E3-D3", "1E1-G5", "2B8-F3", "2F8-D6", "3B10-E6", "5A5-B4", "6B10-E4", "6C10-C4", "6D6-B8", "8B11-B7", "9B8-G6", "9D7-C8", "9F6-G3" como se ha descrito anteriormente en la sección "anticuerpos anti-CD123",

en el que V_{D1} y V_{D2} son ambos dominios variables de cadenas ligeras si V_{D3} y V_{D4} son ambos dominios variables de cadenas pesadas o V_{D1} y V_{D2} son ambos dominios variables de cadenas pesadas si V_{D3} y V_{D4} son ambos dominios variables de cadenas ligeras.

De acuerdo con esto, en una realización adicional, V_{D1} y V_{D4} son el dominio variable de cadena pesada o ligera de un anticuerpo anti-CD3, en el que dicho anticuerpo anti-CD3 comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 13, CDR2-H de secuencia SEQ ID NO: 14, CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 15 y un dominio variable de cadena ligera que comprende CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 184, CDR2-L de secuencia 'KVS' y CDR3-L de secuencia SEQ ID NO: 11 y V_{D2} y V_{D3} son el dominio variable de cadena pesada o ligera de un anticuerpo anti-CD123 seleccionado del grupo que consiste en los anticuerpos anti-CD123 "3E3-D3", "1E1-G5", "2B8-F3", "2F8-D6", "3B10-E6", "5A5-B4", "6B10-E4", "6C10-C4", "6D6-B8", "8B11-B7", "9B8-G6", "9D7-C8", "9F6-G3" como se ha descrito anteriormente en la sección "anticuerpos anti-CD123",

en el que V_{D1} y V_{D2} son ambos dominios variables de cadenas ligeras si V_{D3} y V_{D4} son ambos dominios variables de cadenas pesadas o V_{D1} y V_{D2} son ambos dominios variables de cadenas pesadas si V_{D3} y V_{D4} son ambos dominios variables de cadenas ligeras.

5

En una realización adicional, V_{D1} y V_{D4} son el dominio variable de cadena pesada o ligera de un anticuerpo anti-CD3 humanizado, en el que dicho anticuerpo anti-CD3 comprende un dominio variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID NO: 138 y/o un dominio variable de cadena ligera de secuencia SEQ ID NO: 143 y V_{D2} y V_{D3} son el dominio variable de cadena pesada o ligera de un anticuerpo anti-CD123 seleccionado del grupo que consiste en los anticuerpos anti-CD123 "3E3-D3", "1E1-G5", "2B8-F3", "2F8-D6", "3B10-E6", "5A5-B4", "6B10-E4", "6C10-C4", "6D6-B8", "8B11-B7", "9B8-G6", "9D7-C8", "9F6-G3" como se ha descrito anteriormente en la sección "anticuerpos anti-CD123",

10

15

en el que V_{D1} y V_{D2} son ambos dominios variables de cadenas ligeras si V_{D3} y V_{D4} son ambos dominios variables de cadenas pesadas o V_{D1} y V_{D2} son ambos dominios variables de cadenas pesadas si V_{D3} y V_{D4} son ambos dominios variables de cadenas ligeras.

20

En una realización adicional, V_{D2} y V_{D3} son el dominio variable de cadena pesada o ligera de un anticuerpo anti-CD3 humanizado, en el que dicho anticuerpo anti-CD3 comprende un dominio variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID NO: 138 y/o un dominio variable de cadena ligera de secuencia SEQ ID NO: 143 y V_{D1} y V_{D4} son el dominio variable de cadena pesada o ligera de un anticuerpo anti-CD123 seleccionado del grupo que consiste en los anticuerpos anti-CD123 "3E3-D3", "1E1-G5", "2B8-F3", "2F8-D6", "3B10-E6", "5A5-B4", "6B10-E4", "6C10-C4", "6D6-B8", "8B11-B7", "9B8-G6", "9D7-C8", "9F6-G3" como se ha descrito anteriormente en la sección "anticuerpos anti-CD123",

25

30

en el que V_{D1} y V_{D2} son ambos dominios variables de cadenas ligeras si V_{D3} y V_{D4} son ambos dominios variables de cadenas pesadas o V_{D1} y V_{D2} son ambos dominios variables de cadenas pesadas si V_{D3} y V_{D4} son ambos dominios variables de cadenas ligeras.

En una realización adicional, V_{D1} y V_{D4} son el dominio variable de cadena pesada o ligera de un anticuerpo anti-CD3 humanizado, en el que dicho anticuerpo anti-CD3 comprende un dominio variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID NO: 171 y/o un dominio variable de cadena ligera de secuencia SEQ ID NO: 158 y V_{D2} y V_{D3} son el dominio variable de cadena pesada o ligera de un anticuerpo anti-CD123 seleccionado del grupo que consiste en los anticuerpos anti-CD123 "3E3-D3", "1E1-G5", "2B8-F3", "2F8-D6", "3B10-E6", "5A5-B4", "6B10-E4", "6C10-C4", "6D6-B8", "8B11-B7", "9B8-G6", "9D7-C8", "9F6-G3" como se ha descrito anteriormente en la sección "anticuerpos anti-CD123",

en el que V_{D1} y V_{D2} son ambos dominios variables de cadenas ligeras si V_{D3} y V_{D4} son ambos dominios variables de cadenas pesadas o V_{D1} y V_{D2} son ambos dominios variables de cadenas pesadas si V_{D3} y V_{D4} son ambos dominios variables de cadenas ligeras.

En una realización adicional, V_{D2} y V_{D3} son el dominio variable de cadena pesada o ligera de un anticuerpo anti-CD3 humanizado, en el que dicho anticuerpo anti-CD3 comprende un dominio variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID NO: 171 y/o un dominio variable de cadena ligera de secuencia SEQ ID NO: 158 y V_{D1} y V_{D4} son el dominio variable de cadena pesada o ligera de un anticuerpo anti-CD123 seleccionado del grupo que consiste en los anticuerpos anti-CD123 "3E3-D3", "1E1-G5", "2B8-F3", "2F8-D6", "3B10-E6", "5A5-B4", "6B10-E4", "6C10-C4", "6D6-B8", "8B11-B7", "9B8-G6", "9D7-C8", "9F6-G3" como se ha descrito anteriormente en la sección "anticuerpos anti-CD123",

en el que V_{D1} y V_{D2} son ambos dominios variables de cadenas ligeras si V_{D3} y V_{D4} son ambos dominios variables de cadenas pesadas o V_{D1} y V_{D2} son ambos dominios variables de cadenas pesadas si V_{D3} y V_{D4} son ambos dominios variables de cadenas ligeras.

En una realización adicional, V_{D1} y V_{D4} son el dominio variable de cadena pesada o ligera de un anticuerpo anti-CD3 humanizado, en el que dicho anticuerpo anti-CD3 comprende un dominio variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID NO: 176 y/o un dominio variable de cadena ligera de secuencia SEQ ID NO: 164 y V_{D2} y V_{D3} son el dominio variable de cadena pesada o ligera de un anticuerpo anti-CD123 seleccionado del grupo que consiste en los anticuerpos anti-CD123 "3E3-D3", "1E1-G5", "2B8-F3",

“2F8-D6”, “3B10-E6”, “5A5-B4”, “6B10-E4”, “6C10-C4”, “6D6-B8”, “8B11-B7”, “9B8-G6”, “9D7-C8”, “9F6-G3” como se ha descrito anteriormente en la sección “anticuerpos anti-CD123”,

5 en el que V_{D1} y V_{D2} son ambos dominios variables de cadenas ligeras si V_{D3} y V_{D4} son ambos dominios variables de cadenas pesadas o V_{D1} y V_{D2} son ambos dominios variables de cadenas pesadas si V_{D3} y V_{D4} son ambos dominios variables de cadenas ligeras.

10 En una realización adicional, V_{D2} y V_{D3} son el dominio variable de cadena pesada o ligera de un anticuerpo anti-CD3 humanizado, en el que dicho anticuerpo anti-CD3 comprende un dominio variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID NO: 176 y/o un dominio variable de cadena ligera de secuencia SEQ ID NO: 164 y V_{D1} y V_{D4} son el dominio variable de cadena pesada o ligera de un anticuerpo anti-CD123 seleccionado del grupo que consiste en los anticuerpos anti-CD123 “3E3-D3”, “1E1-G5”, “2B8-F3”,
15 “2F8-D6”, “3B10-E6”, “5A5-B4”, “6B10-E4”, “6C10-C4”, “6D6-B8”, “8B11-B7”, “9B8-G6”, “9D7-C8”, “9F6-G3” como se ha descrito anteriormente en la sección “anticuerpos anti-CD123”,

20 en el que V_{D1} y V_{D2} son ambos dominios variables de cadenas ligeras si V_{D3} y V_{D4} son ambos dominios variables de cadenas pesadas o V_{D1} y V_{D2} son ambos dominios variables de cadenas pesadas si V_{D3} y V_{D4} son ambos dominios variables de cadenas ligeras.

25 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, la primera o segunda inmunoglobulina es el anticuerpo anti-CD123 7G3. Por lo tanto, en una realización, V_{D1} y V_{D4} o V_{D2} y V_{D3} comprenden un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera como se define por las secuencias CDR de secuencias de dominio variable de cadena pesada y ligera del anticuerpo 7G3 como se define más adelante en la presente memoria. En una realización, V_{D1} y V_{D4} , o V_{D2} y V_{D3} comprenden un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera del
30 anticuerpo 7G3 como se describe en la solicitud de patente WO2013/173820, que se incorpora en la presente memoria por referencia.

De acuerdo con esto, el anticuerpo anti-CD123 denominado “7G3” como se usa en la presente memoria comprende:

-un dominio variable de cadena pesada que consiste en la secuencia
EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKAS**GYTFTDY**MKWVKQSHGKSLEWIGDI**IPSNGA**
TFYNQKFKGKATLTVDRSSSTAYMHLNSLTSEDSAVYYCT**RS****HLLRASWFAYWGQGT**
LVTVSA (SEQ ID NO: 312, con las CDR mostradas en caracteres en negrita) que
5 comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 375, una CDR2-H de secuencia SEQ ID
NO: 376, y una CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 377 y

-un dominio variable de cadena ligera que consiste en la secuencia
DFVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSS**Q****LLNSGNQ**KNYLTWYLQKPGQPPKLLI**YWA**
STRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTIS**S**VQAEDLAVYYC**QNDYSYPY**TFGGG**T**KLEIK
10 (SEQ ID NO: 308, con las CDR mostradas en caracteres en negrita) que comprende
CDR1-L de secuencia SEQ ID NO: 378, una CDR2-L de secuencia 'WAS', y una CDR3-
L de secuencia SEQ ID NO: 379.

En un aspecto adicional de la invención, el anticuerpo 7G3 también puede ser un
anticuerpo humanizado o un fragmento de un anticuerpo humanizado. De acuerdo con
15 esto, en una realización, el anticuerpo 7G3 de la invención es un anticuerpo
humanizado que comprende

- un dominio variable de cadena pesada que consiste en la secuencia
EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKG**S****GY****SFTDY**MKWARQMPGKGLEWMGDI**IPSNGA**
TFYNQKFKGQVTISADKSISTTYLQWSSLKASDTAMYYC**AR****S****HLLRASWFAYWGQGT**
20 MVTVSS (SEQ ID NO: 380, con las CDR mostradas en caracteres en negrita) que
comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 381, una CDR2-H de secuencia SEQ ID
NO: 377, y una CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 382 , o

un dominio variable de cadena ligera que consiste en la secuencia
EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKG**S****GY****SFTDY**MKWARQMPGKGLEWMGDI**IPSSGA**
25 TFYNQKFKGQVTISADKSISTTYLQWSSLKASDTAMYYC**AR****S****HLLRASWFAYWGQGT**
MVTVSS (SEQ ID NO: 383, con las CDR mostradas en caracteres en negrita) que
comprende CDR1-H de secuencia SEQ ID NO: 381, una CDR2-H de secuencia SEQ ID
NO: 384, y una CDR3-H de secuencia SEQ ID NO: 382 , o

- un dominio variable de cadena ligera que consiste en la secuencia
30 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCESS**Q****LLNSGNQ**KNYLTWYQKPGQPPKPLI**YWAS**
TRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIS**S**LQAEDVAVYYC**QNDYSYPY**TFGQGT**K**KLEIK (SEQ
ID NO: 385, con las CDR mostradas en caracteres en negrita) que comprende CDR1-L
de secuencia SEQ ID NO: 378, una CDR2-L de secuencia 'WAS', y una CDR3-L de
secuencia SEQ ID NO: 379.

En una realización, la proteína de unión semejante a anticuerpo que se une específicamente a CD3ε humana y CD123 humana comprende

- 5 a) un dominio variable de cadena ligera de una primera inmunoglobulina (V_{D1}) que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 9 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, un dominio variable de cadena ligera de una segunda inmunoglobulina (V_{D2}) que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 308 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, un dominio variable de cadena pesada de la segunda inmunoglobulina (V_{D3}) que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 312 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta y un dominio variable de cadena pesada de la primera inmunoglobulina (V_{D4}) que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 5 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, o
- 10 b) un dominio variable de cadena ligera de una primera inmunoglobulina (V_{D1}) que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 21 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, un dominio variable de cadena ligera de una segunda inmunoglobulina (V_{D2}) que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 308 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, un dominio variable de cadena pesada de la segunda inmunoglobulina (V_{D3}) que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 312 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta y un dominio variable de cadena pesada de la primera inmunoglobulina (V_{D4}) que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 18 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, o
- 15 c) un dominio variable de cadena ligera de una primera inmunoglobulina (V_{D1}) que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 16 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, un dominio variable de cadena ligera de una segunda inmunoglobulina (V_{D2}) que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 308 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, un dominio variable de cadena pesada de la segunda inmunoglobulina (V_{D3}) que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 312 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta y un dominio variable de cadena pesada de la primera inmunoglobulina (V_{D4}) que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 12 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, o
- 20 d) un dominio variable de cadena ligera de una primera inmunoglobulina (V_{D1}) que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 26 o una secuencia
- 25
- 30

- al menos 85% idéntica a ésta, un dominio variable de cadena ligera de una segunda inmunoglobulina (V_{D2}) que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 308 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, un dominio variable de cadena pesada de la segunda inmunoglobulina (V_{D3}) que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 312 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta y un dominio variable de cadena pesada de la primera inmunoglobulina (V_{D4}) que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 23 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, o
- 5 e) un dominio variable de cadena ligera de una primera inmunoglobulina (V_{D1}) que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 308 o una
- 10 secuencia al menos 85% idéntica a ésta, un dominio variable de cadena ligera de una segunda inmunoglobulina (V_{D2}) que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 143 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, un dominio variable de cadena pesada de la segunda inmunoglobulina (V_{D3})
- 15 que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 138 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta y un dominio variable de cadena pesada de la primera inmunoglobulina (V_{D4}) que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 312 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, o
- 20 f) un dominio variable de cadena ligera de una primera inmunoglobulina (V_{D1}) que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 158 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, un dominio variable de cadena ligera de una segunda inmunoglobulina (V_{D2}) que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 308 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta,
- 25 un dominio variable de cadena pesada de la segunda inmunoglobulina (V_{D3}) que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 312 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta y un dominio variable de cadena pesada de una primera inmunoglobulina (V_{D4}) que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 171 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta,
- 30 g) un dominio variable de cadena ligera de una primera inmunoglobulina (V_{D1}) que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 230 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, un dominio variable de cadena ligera de una segunda inmunoglobulina (V_{D2}) que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 158 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta,

un dominio variable de cadena pesada de la segunda inmunoglobulina (V_{D3}) que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 171 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta y un dominio variable de cadena pesada de la primera inmunoglobulina (V_{D4}) que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 226 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta,

h) un dominio variable de cadena ligera de una primera inmunoglobulina (V_{D1}) que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 385 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, un dominio variable de cadena ligera de una segunda inmunoglobulina (V_{D2}) que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 141 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, un dominio variable de cadena pesada de la segunda inmunoglobulina (V_{D3}) que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 138 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta y un dominio variable de cadena pesada de la primera inmunoglobulina (V_{D4}) que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 383 o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta.

En dicha secuencia anterior al menos 85% idéntica a una secuencia de referencia (por ejemplo, una secuencia al menos 85% idéntica a SEQ ID NO: 383 o SEQ ID NO: 385), las secuencias de las 6 CDR no están cambiadas comparadas con las 6 CDR presentes en la secuencia de referencia.

En una realización, la proteína de unión a anticuerpo según cualquiera de las definiciones a) a g) comprende además el conector L_1 de secuencia SEQ ID NO: 307, L_2 de secuencia SEQ ID NO: 309, L_3 de la secuencia de aminoácidos 'S', L_4 de la secuencia de aminoácidos 'RT' y C_{H1} de secuencia SEQ ID NO: 313.

En una realización, la proteína de unión a anticuerpo según cualquiera de las definiciones a) a g) comprende además F_{c2} de secuencia SEQ ID NO: 327.

En una realización, la proteína de unión a anticuerpo según la definición h) comprende además el conector L_1 de secuencia SEQ ID NO: 389, L_2 de secuencia SEQ ID NO: 389, L_3 y L_4 que consisten en 0 aminoácidos, y C_{H1} de secuencia SEQ ID NO: 313.

En una realización, la proteína de unión a anticuerpo según la definición h) comprende además F_{c2} de secuencia SEQ ID NO: 392.

En una realización, L_5 de la proteína de unión a anticuerpo según cualquiera de las definiciones a) a h) contiene 0 aminoácidos.

En una realización adicional, la proteína de unión a anticuerpo según cualquiera de las definiciones a) a g) comprende además el conector L₁ de secuencia SEQ ID NO: 307, L₂ de secuencia SEQ ID NO: 309, L₃ de la secuencia de aminoácidos 'S', L₄ de la secuencia de aminoácidos 'RT', C_{H1} de secuencia SEQ ID NO: 329 y F_c de secuencia SEQ ID NO: 330.

En una realización adicional, la proteína de unión a anticuerpo según la definición h) comprende además el conector L₁ de secuencia SEQ ID NO: 389, L₂ de secuencia SEQ ID NO: 389, L₃ y L₄ que consisten en 0 aminoácidos, C_{H1} de secuencia SEQ ID NO: 313 y F_c de secuencia SEQ ID NO: 394.

En una realización adicional, la proteína de unión a anticuerpo según la definición h) comprende además una porción Fc de secuencia SEQ ID NO: 397 o SEQ ID NO: 398, o una secuencia al menos 85% idéntica a SEQ ID NO: 397 o SEQ ID NO: 398.

En una realización la proteína de unión a anticuerpo que se une específicamente a CD3ε humana y CD123 humana comprende, o consiste esencialmente en:

a) un polipéptido de fórmula [I] que consiste en secuencia SEQ ID NO: 388 (V_{D1} de secuencia SEQ ID NO: 385, L₁ de secuencia SEQ ID NO: 389, V_{D2} de secuencia SEQ ID NO: 141, L₂ de secuencia SEQ ID NO: 389 y C_L de secuencia SEQ ID NO: 310),

o una secuencia al menos 85% idéntica a SEQ ID NO: 388 en la que las 3 CDR de secuencias SEQ ID NO: 378, 'WAS' y SEQ ID NO: 379 del dominio variable de cadena ligera de hz7G3 (V_{D1} de secuencia SEQ ID NO: 385), y las 3 CDR de secuencias SEQ ID NO: 142, 'KVS' y SEQ ID NO: 11 del dominio variable de cadena ligera de hz20G6 (V_{D2} de secuencia SEQ ID NO: 141) están inalteradas; y

b) un polipéptido de fórmula [II] que consiste en secuencia SEQ ID NO: 390 (V_{D3} de secuencia SEQ ID NO: 138, L₃ es 0 aminoácidos, V_{D4} de secuencia SEQ ID NO: 383, L₄ es 0 aminoácidos y C_{H1} de secuencia SEQ ID NO: 313), o

una secuencia al menos 85% idéntica a SEQ ID NO: 390 en la que las 3 CDR de secuencias SEQ ID NO: 381, SEQ ID NO: 384, y SEQ ID NO: 382 del dominio variable de cadena pesada de hz7G3 (V_{D4} de secuencia SEQ ID NO: 383), y las 3 CDR de secuencias SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8

del dominio variable de cadena pesada de hz20G6 (V_{D3} de secuencia SEQ ID NO: 138) están inalteradas;

y en el que el polipéptido de fórmula [I] y el polipéptido de fórmula [II] forman una pareja entrecruzada cadena ligera-cadena pesada.

5

En una realización la proteína de unión a anticuerpo que se une específicamente a CD3 ϵ humana y CD123 humana comprende, o consiste esencialmente en:

a) un polipéptido según la fórmula [IV] de secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 391 (V_{D1} de secuencia SEQ ID NO: 385, L_1 de secuencia SEQ ID NO: 389, V_{D2} de secuencia SEQ ID NO: 141, L_2 de secuencia SEQ ID NO: 389, C_L de secuencia SEQ ID NO: 310, L_5 que contiene 0 aminoácidos, y F_{c2} de secuencia SEQ ID NO: 392), o

10

una secuencia al menos 85% idéntica a SEQ ID NO: 391 en la que las CDR de secuencias SEQ ID NO: 378, 'WAS' y SEQ ID NO: 379 del dominio variable de cadena ligera de hz7G3 (V_{D1} de secuencia SEQ ID NO: 385), y las 3 CDR de secuencias SEQ ID NO: 142, 'KVS' y SEQ ID NO: 11 del dominio variable de cadena ligera de hz20G6 (V_{D2} de secuencia SEQ ID NO: 141) están inalteradas; y

15

b) un polipéptido según la fórmula [III] de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 393 (V_{D3} de secuencia SEQ ID NO: 138, L_3 es 0 aminoácidos, V_{D4} de secuencia SEQ ID NO: 383, L_4 es 0 aminoácidos, C_{H1} de secuencia SEQ ID NO: 313, y F_c de secuencia SEQ ID NO: 394), o

20

una secuencia al menos 85% idéntica a SEQ ID NO: 393 en la que las 3 CDR de secuencias SEQ ID NO: 381, SEQ ID NO: 384, y SEQ ID NO: 382 del dominio variable de cadena pesada de hz7G3 (V_{D4} de secuencia SEQ ID NO: 383), y las 3 CDR de secuencias SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 del dominio variable de cadena pesada de hz20G6 (V_{D3} de secuencia SEQ ID NO: 138) están inalteradas;

25

y en el que el polipéptido de fórmula [IV] y el polipéptido de fórmula [III] forman una pareja entrecruzada cadena ligera-cadena pesada.

30

En dicha proteína de unión semejante a anticuerpo, las cadenas polipeptídicas representadas por las fórmulas [III] y [IV] dimerizan a través de sus regiones F_{c2} y F_c respectivas.

En una realización, la proteína de unión a anticuerpo que se une específicamente a CD3ε humana y CD123 humana comprende, o consiste esencialmente en:

a) un polipéptido según la fórmula [I] que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 388 (V_{D1} de secuencia SEQ ID NO: 385, L_1 de secuencia SEQ ID NO: 389, V_{D2} de secuencia SEQ ID NO: 141, L_2 de secuencia SEQ ID NO: 389 y C_L de secuencia SEQ ID NO: 310) o

una secuencia al menos 85% idéntica a SEQ ID NO: 388 en la que las 3 CDR de secuencias SEQ ID NO: 378, 'WAS' y SEQ ID NO: 379 del dominio variable de cadena ligera de hz7G3 (V_{D1} de secuencia SEQ ID NO: 385), y las 3 CDR de secuencias SEQ ID NO: 142, 'KVS' y SEQ ID NO: 11 del dominio variable de cadena ligera de hz20G6 (V_{D2} de secuencia SEQ ID NO: 141) están inalteradas; y

b) un polipéptido según la fórmula [III] de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 395 (V_{D3} de secuencia SEQ ID NO: 138, L_3 es 0 aminoácidos, V_{D4} de secuencia SEQ ID NO: 383, L_4 es 0 aminoácidos, C_{H1} de secuencia SEQ ID NO: 313, y F_c de secuencia SEQ ID NO: 396), o

una secuencia al menos 85% idéntica a SEQ ID NO: 395 en la que las 3 CDR de secuencias SEQ ID NO: 381, SEQ ID NO: 384, y SEQ ID NO: 382 del dominio variable de cadena pesada de hz7G3 (V_{D4} de secuencia SEQ ID NO: 383), y las 3 CDR de secuencias SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 del dominio variable de cadena ligera de hz20G6 (V_{D3} de secuencia SEQ ID NO: 138) están inalteradas; y

c) una porción F_c (polipéptido F_{c3}) de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 397, o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, en el que dicha porción F_{c3} o la secuencia al menos 85% idéntica a ésta heterodimeriza con la región F_c del polipéptido según la fórmula [III];

y en el que el polipéptido de fórmula [I] y el polipéptido de fórmula [III] forman una pareja entrecruzada cadena ligera-cadena pesada.

En una realización, la proteína de unión a anticuerpo que se une específicamente a CD3ε humana y CD123 humana comprende, o consiste esencialmente en:

a) un polipéptido según la fórmula [I] que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 388 (V_{D1} de secuencia SEQ ID NO: 385, L_1 de secuencia SEQ ID NO: 389, V_{D2} de secuencia SEQ ID NO: 141, L_2 de secuencia SEQ ID NO: 389 y C_L de secuencia SEQ ID NO: 310) o

una secuencia al menos 85% idéntica a SEQ ID NO: 388 en la que las 3 CDR de secuencias SEQ ID NO: 378, 'WAS' y SEQ ID NO: 379 del dominio variable de cadena ligera de hz7G3 (V_{D1} de secuencia SEQ ID NO: 385), y las 3 CDR de secuencias SEQ ID NO: 142, 'KVS' y SEQ ID NO: 11 del dominio variable de cadena ligera de hz20G6 (V_{D2} de secuencia SEQ ID NO: 141) están inalteradas;

b) un polipéptido según la fórmula III de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 399 (V_{D3} de secuencia SEQ ID NO: 138, L_3 es 0 aminoácidos, V_{D4} de secuencia SEQ ID NO: 383, L_4 es 0 aminoácidos, C_{H1} de secuencia SEQ ID NO: 313, y F_c de secuencia SEQ ID NO: 400), o

una secuencia al menos 85% idéntica a ésta en la que las 3 CDR de secuencias SEQ ID NO: 381, SEQ ID NO: 384, y SEQ ID NO: 382 del dominio variable de cadena pesada de hz7G3 (V_{D4} de secuencia SEQ ID NO: 383), y las 3 CDR de secuencias SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 del dominio variable de cadena pesada de hz20G6 (V_{D3} de secuencia SEQ ID NO: 138) están inalteradas; y

c) una porción F_c (polipéptido F_{c3}) de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 398, o una secuencia al menos 85% idéntica a ésta, en el que dicha porción F_{c3} o la secuencia al menos 85% idéntica a ésta heterodimeriza con la región F_c del polipéptido según la fórmula [III];

y el que el polipéptido de fórmula [I] y el polipéptido de fórmula [III] forman una pareja entrecruzada de cadena ligera-cadena pesada.

Inmunoconjugados

En una realización, el anticuerpo anti-CD123 de la invención se conjuga o une a un agente inhibidor del crecimiento, agente citotóxico, o una enzima activadora de profármaco. En particular, los anticuerpos anti-CD123 de la invención son de hecho útiles para dirigir a dicho agente inhibidor del crecimiento, agente citotóxico o un profármaco a las células cancerosas que expresan o sobre-expresan CD123 en su superficie.

Ácidos nucleicos, vectores y células huésped recombinantes

Un objeto adicional de la invención se refiere a una secuencia de ácido nucleico que comprende o consiste en una secuencia que codifica un anticuerpo anti-CD3, anticuerpo anti-CD123 o una proteína de unión semejante a anticuerpo como se ha
5 definido anteriormente.

Típicamente, dicho ácido nucleico es una molécula de ADN o ARN, que puede estar incluida en cualquier vector adecuado, tal como un plásmido, cósmido, episoma, cromosoma artificial, fago o un vector viral.

Los términos "vector", "vector de clonación" y "vector de expresión" significan el
10 vehículo mediante el cual una secuencia de ADN o ARN (por ejemplo, un gen extraño) puede introducirse en una célula huésped, de manera que se transforma el huésped y se estimula la expresión (por ejemplo, transcripción y traducción) de la secuencia introducida.

Entonces, un objeto adicional de la invención se refiere a un vector que
15 comprende un ácido nucleico de la invención.

Dichos vectores pueden comprender elementos reguladores, tales como un promotor, potenciador, terminador y semejantes, para causar o dirigir la expresión de dicho polipéptido después de la administración a un sujeto. Los ejemplos de promotores y potenciadores usados en el vector de expresión para células animales incluyen el
20 promotor temprano y potenciador de SV40 (Mizukami T. et al. 1987), promotor y potenciador LTR del virus de la leucemia de ratón Moloney (Kuwana Y et al. 1987), promotor (Mason JO et al. 1985) y potenciador (Gillies SD et al. 1983) de la cadena de inmunoglobulina H y semejantes.

Puede usarse cualquier vector de expresión para células animales, siempre que
25 un gen que codifica la región C del anticuerpo humano pueda insertarse y expresarse. Los ejemplos de vectores adecuados incluyen pAGE107 (Miyaji H et al. 1990), pAGE103 (Mizukami T et al. 1987), pHSG274 (Brady G et al. 1984), pKCR (O'Hare K et al. 1981), pSG1 beta d2-4-(Miyaji H et al. 1990) y semejantes. Otros ejemplos de plásmidos incluyen plásmidos replicantes que comprenden un origen de replicación, o
30 plásmidos integrativos, tales como por ejemplo, pUC, pcDNA, pBR, y semejantes.

Otros ejemplos de vector viral incluyen vectores adenovirales, retrovirales, del herpes virus y AAV. Dichos virus recombinantes pueden producirse por técnicas conocidas en la técnica, tales como transfectando células empaquetadoras o por transfección transitoria con plásmidos auxiliares o virus. Los ejemplos típicos de células

que empaquetan virus incluyen células PA317, células PsiCRIP, células GEnv+, células 293, etc. Los protocolos detallados para producir dichos virus recombinantes defectuosos en la replicación pueden encontrarse por ejemplo en WO 95/14785, WO 96/22378, US 5.882.877, US 6.013.516, US 4.861.719, US 5.278.056 y WO 94/19478.

- 5 Un objeto adicional de la presente invención se refiere a una célula que se ha transfectado, infectado o transformado con un ácido nucleico y/o un vector según la invención.

10 El término "transformación" significa la introducción de un gen "extraño" (es decir, extrínseco), secuencia de ADN o ARN en una célula huésped, de manera que la célula huésped expresará el gen o secuencia introducida para producir una sustancia deseada, típicamente una proteína o enzima codificada por el gen o secuencia introducida. Una célula huésped que recibe y expresa ADN o ARN introducido ha sido "transformada".

15 Los ácidos nucleicos de la invención pueden usarse para producir un anticuerpo recombinante de la invención en un sistema de expresión adecuado. El término "sistema de expresión" significa una célula huésped y vector compatible en condiciones adecuadas, por ejemplo, para la expresión de una proteína codificada por ADN extraño portado por el vector e introducido en la célula huésped.

20 Los sistemas de expresión comunes incluyen células huésped de *E. coli* y vectores plasmídicos, células huésped de insecto y vectores de Baculovirus, y células huésped de mamíferos y vectores. Otros ejemplos de células huésped incluyen, sin limitación, células procariotas (tales como bacterias) y células eucariotas (tales como células de levadura, células de mamíferos, células de insecto, células de planta, etc.). Los ejemplos específicos incluyen *E. coli*, levaduras *Kluyveromyces* o *Saccharomyces*,
25 líneas celulares de mamífero (por ejemplo, células Vero, células CHO, células 3T3, células COS, etc.) así como cultivos celulares de mamíferos primarios o establecidos (por ejemplo, producidos a partir de linfoblastos, fibroblastos, células embrionarias, células epiteliales, células nerviosas, adipocitos, etc.). Los ejemplos también incluyen
30 célula de ratón SP2/0-Ag14 (ATCC CRL1581), célula de ratón P3X63-Ag8.653 (ATCC CRL1580), célula CHO en la que es defectuoso un gen de dihidrofolato reductasa (de aquí en adelante referido como "gen DHFR") (Urlaub G et al; 1980), célula de rata YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 (ATCC CRL1662, de aquí en adelante referido como "célula YB2/0"), y semejantes. Se prefiere la célula YB2/0, ya que la actividad ADCC de los anticuerpos quiméricos o humanizados se aumenta cuando se expresa en esta célula.

En particular, para la expresión de anticuerpo humanizado o proteína de unión semejante a anticuerpo, el vector de expresión puede ser bien de un tipo en el que un gen que codifica una cadena pesada de anticuerpo y un gen que codifica una cadena ligera de anticuerpo existen en vectores separados o de un tipo en el que ambos genes existen en el mismo vector (tipo tándem). Respecto a la facilidad de construcción de un vector de expresión de anticuerpo humanizado y proteína de unión semejante a anticuerpo, la facilidad de introducción en células animales, y equilibrio entre los niveles de expresión de las cadenas H y L del anticuerpo en células animales, se prefiere el vector de expresión de anticuerpo humanizado de tipo tándem (Shitara K et al. J Immunol Methods. 1994 ene. 3;167(1-2):271-8). Los ejemplos de vector de expresión de anticuerpo humanizado de tipo tándem incluyen pKANTEX93 (WO 97/10354), pEE18 y semejantes.

La presente invención también se refiere a un método para producir una célula huésped recombinante que expresa un anticuerpo anti-CD3, anticuerpo anti-CD123 o una proteína de unión semejante a anticuerpo según la invención, comprendiendo dicho método las etapas que consisten en: (i) introducir *in vitro* o *ex vivo* un ácido nucleico recombinante o un vector como se ha descrito anteriormente en una célula huésped competente, (ii) cultivar *in vitro* o *ex vivo* la célula huésped recombinante obtenida y (iii), opcionalmente, seleccionar las células que expresan y/o secretan dicho anticuerpo.

Dichas células huésped recombinantes pueden usarse para la producción de anticuerpo anti-CD3, al menos un anticuerpo anti-CD123 o al menos una proteína de unión semejante a anticuerpo de la invención.

Métodos para producir anticuerpos proteína de unión semejante a anticuerpo de la invención

Una realización de la invención proporciona un método para preparar una proteína de unión semejante a anticuerpo que comprende dos cadenas polipeptídicas que forman dos sitios de unión a antígeno, en la que un primer polipéptido tiene una estructura representada por la fórmula [I]:



y un segundo polipéptido tiene una estructura representada por la fórmula [II]:



en la que:

V_{D1} es un dominio variable de cadena pesada o ligera de una primera inmunoglobulina;

V_{D2} es un dominio variable de cadena pesada o ligera de una segunda inmunoglobulina;

5 V_{D3} es un dominio variable de cadena pesada o ligera de dicha segunda inmunoglobulina;

V_{D4} es un dominio variable de cadena pesada o ligera de dicha primera inmunoglobulina;

C_L es un dominio constante de cadena ligera de una inmunoglobulina;

10 C_{H1} es un dominio constante C_{H1} de cadena pesada de una inmunoglobulina;

L_1 , L_2 , L_3 , y L_4 son conectores de aminoácidos;

y en la que el primer y el segundo polipéptido forman una pareja entrecruzada cadena ligera-cadena pesada, y

15 en la que V_{D1} y V_{D2} son ambos bien dominios variables de cadenas ligeras, o dominios variables de cadenas pesadas, y V_{D3} y V_{D4} son ambos dominios variables de cadenas pesadas si V_{D1} y V_{D2} son dominios variables de cadenas ligeras, o V_{D3} y V_{D4} son ambos dominios variables de cadenas ligeras si V_{D1} y V_{D2} son dominios variables de cadenas pesadas.

20 En una realización adicional, la invención proporciona un método para preparar una proteína de unión semejante a anticuerpo que comprende cuatro cadenas polipeptídicas que forman cuatro sitios de unión a antígeno, en la que dos cadenas polipeptídicas tienen una estructura representada por la fórmula [I]:

$$V_{D1}-L_1-V_{D2}-L_2-C_L \quad [I]$$

25 y dos cadenas polipeptídicas tienen una estructura representada por la fórmula (III):

$$V_{D3}-L_3-V_{D4}-L_4-C_{H1}-F_c \quad [III]$$

en la que:

V_{D1} es un dominio variable de cadena pesada o ligera de una primera inmunoglobulina;

30 V_{D2} es un dominio variable de cadena pesada o ligera de una segunda inmunoglobulina;

V_{D3} es un dominio variable de cadena pesada o ligera de dicha segunda inmunoglobulina;

V_{D4} es un dominio variable de cadena pesada o ligera de dicha primera inmunoglobulina;

C_L es un dominio constante de cadena ligera de una inmunoglobulina;

C_{H1} es un dominio constante C_{H1} de cadena pesada de una inmunoglobulina;

- 5 F_c es la región bisagra de la inmunoglobulina y CH_2 , CH_3 los dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina de una inmunoglobulina;

L_1 , L_2 , L_3 , y L_4 son conectores de aminoácidos;

y en la que los polipéptidos de fórmula I y los polipéptidos de fórmula III forman una pareja entrecruzada cadena ligera-cadena pesada, y

- 10 en la que V_{D1} y V_{D2} son ambos bien dominios variables de cadenas ligeras, o dominios variables de cadenas pesadas, y V_{D3} y V_{D4} son ambos dominios variables de cadenas pesadas si V_{D1} y V_{D2} son dominios variables de cadenas ligeras, o V_{D3} y V_{D4} son ambos dominios variables de cadenas ligeras si V_{D1} y V_{D2} son dominios variables de cadenas pesadas.

- 15 En una realización adicional, la invención proporciona un método para preparar una proteína de unión semejante a anticuerpo que comprende cuatro cadenas polipeptídicas que forman cuatro sitios de unión a antígeno, en la que dos cadenas polipeptídicas tienen una estructura representada por la fórmula [IV]:

$$V_{D1}-L_1-V_{D2}-L_2-C_L-L_5-F_{c2} \quad [IV]$$

- 20 y dos cadenas polipeptídicas tienen una estructura representada por la fórmula [III]:

$$V_{D3}-L_3-V_{D4}-L_4-C_{H1}-F_c \quad [III]$$

en la que:

V_{D1} es un dominio variable de cadena pesada o ligera de una primera inmunoglobulina;

- 25 V_{D2} es un dominio variable de cadena pesada o ligera de una segunda inmunoglobulina;

V_{D3} es un dominio variable de cadena pesada o ligera de dicha segunda inmunoglobulina;

- 30 V_{D4} es un dominio variable de cadena pesada o ligera de dicha primera inmunoglobulina;

C_L es un dominio constante de cadena ligera de una inmunoglobulina;

C_{H1} es un dominio constante C_{H1} de cadena pesada de una inmunoglobulina;

F_c es la región bisagra de la inmunoglobulina y CH_2 , CH_3 los dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina de una inmunoglobulina;

F_{c2} es la región bisagra de la inmunoglobulina y CH_2 , CH_3 los dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina de una inmunoglobulina;

L_1 , L_2 , L_3 , L_4 y L_5 son conectores de aminoácidos;

y en la que los polipéptidos de fórmula I y los polipéptidos de fórmula III forman una pareja entrecruzada cadena ligera-cadena pesada, y

5 en la que V_{D1} y V_{D2} son ambos bien dominios variables de cadenas ligeras, o dominios variables de cadenas pesadas, y V_{D3} y V_{D4} son ambos dominios variables de cadenas pesadas si V_{D1} y V_{D2} son dominios variables de cadenas ligeras, o V_{D3} y V_{D4} son ambos dominios variables de cadenas ligeras si V_{D1} y V_{D2}
10 son dominios variables de cadenas pesadas.

En una realización de la invención, la primera inmunoglobulina o la segunda inmunoglobulina es un anticuerpo anti-CD3 como se define en la sección «anticuerpos anti-CD3» anterior.

15 En otra realización de la invención, la primera inmunoglobulina o la segunda inmunoglobulina es un anticuerpo anti-CD123 como se define en la sección «anticuerpos anti-CD123» anterior.

Un anticuerpo anti-CD3, anticuerpo anti-CD123 y/o proteínas de unión semejantes
20 a anticuerpo de la invención pueden producirse por cualquier técnica conocida en la técnica, tal como, sin limitación, cualquier técnica química, biológica, genética o enzimática, bien sola o en combinación.

Conociendo la secuencia de aminoácidos de la secuencia deseada, un experto en la técnica puede producir fácilmente dichos anticuerpos o cadenas de inmunoglobulina,
25 por técnicas estándar para la producción de polipéptidos. Por ejemplo, pueden sintetizarse usando el método de fase sólida muy conocido, en particular usando un aparato de síntesis de péptidos disponible comercialmente (tal como el fabricado por Applied Biosystems, Foster City, California) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Alternativamente, los anticuerpos, cadenas de inmunoglobulina y proteínas de unión
30 semejantes a anticuerpo de la invención pueden sintetizarse por técnicas de ADN recombinante como se conoce bien en la técnica. Por ejemplo, estos fragmentos pueden obtenerse como productos de la expresión de ADN después de la incorporación de secuencias de ADN que codifican el (poli) péptido deseado en vectores de expresión e introducción de dichos vectores en huéspedes eucariotas o procariotas adecuados

que expresarán el polipéptido deseado, a partir de las cuales pueden aislarse posteriormente usando técnicas muy conocidas.

En particular, la invención se refiere además a un método para producir anticuerpos anti-CD3, anticuerpos anti-CD123 y/o proteínas de unión semejantes a anticuerpo de la invención, método que comprende las etapas que consisten en: (i) cultivar una célula huésped transformada según la invención; (ii) expresar dicho anticuerpo o polipéptido; y (iii) recuperar el anticuerpo o polipéptido expresado.

Los anticuerpos anti-CD3, anticuerpos anti-CD123 y/o proteínas de unión semejantes a anticuerpo de la invención se separan adecuadamente del medio de cultivo por procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-Sefarosa, cromatografía en hidroxilapatito, electroforesis en gel, diálisis, o cromatografía de afinidad.

En una realización particular, un anticuerpo anti-CD3 quimérico humanizado y/o anti-CD123 de la presente invención puede producirse mediante la obtención de secuencias de ácido nucleico que codifican dominios VL y VH humanizados como se ha descrito previamente, construyendo un vector de expresión de anticuerpo quimérico humano insertándolos en un vector de expresión para células animales que tiene genes que codifican CH de anticuerpo humano y CL de anticuerpo humano, y expresando la secuencia codificadora introduciendo el vector de expresión en una célula animal. De manera análoga a esto, una proteína de unión semejante a anticuerpo humanizada puede obtenerse usando para el dominio variable de cadena pesada o ligera de una primera inmunoglobulina humanizada (V_{D1}), para el dominio variable de cadena pesada o ligera de una segunda inmunoglobulina humanizada (V_{D2}), para el dominio variable de cadena pesada o ligera de dicha segunda inmunoglobulina (V_{D3}), y para el dominio variable de cadena pesada o ligera de dicha primera inmunoglobulina los dominios variables de las cadenas pesada y ligera de dos anticuerpos humanizados.

Como el dominio CH de un anticuerpo quimérico humano o el dominio CH de proteína de unión semejante a anticuerpo de la invención, puede ser cualquier región que pertenezca a las cadenas pesadas de inmunoglobulina humana, pero son adecuadas las de la clase de IgG y también puede usarse una cualquiera de las subclases que pertenecen a la clase IgG, tales como IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. También, como la CL de un anticuerpo quimérico humano o la CL de una proteína de unión semejante a anticuerpo de la invención, puede ser cualquier región que

pertenezca a las cadenas ligeras de inmunoglobulina humana, y pueden usarse las de la clase kappa o clase lambda.

Los métodos para producir anticuerpos humanizados o quiméricos implican técnicas convencionales de ADN recombinante y de transfección génica que son muy conocidas en la técnica (Véanse Morrison SL. et al. (1984) y los documentos de patente US5.202.238; y US5.204.244).

Los métodos para producir anticuerpos humanizados basados en técnicas convencionales de ADN recombinante y de transfección génica son muy conocidos en la técnica (Véanse, por ejemplo, Riechmann L. et al. 1988; Neuberger MS. et al. 1985). Los anticuerpos pueden humanizarse usando una variedad de técnicas conocidas en la técnica incluyendo, por ejemplo, la técnica descrita en la solicitud WO2009/032661, injerto de CDR (EP 239.400; publicación PCT WO91/09967; Pat. U.S. Nos. 5.225.539; 5.530.101; y 5.585.089), recubrimiento o modificación en superficie (EP 592.106; EP 519.596; Padlan EA (1991); Studnicka GM et al. (1994); Roguska MA. et al. (1994)), e intercambio de cadenas (Pat. U.S. No.5.565.332). La tecnología de ADN recombinante general para la preparación de dichos anticuerpos también es conocida (véase la Solicitud de Patente Europea EP 125023 y la Solicitud de Patente Internacional WO 96/02576).

El Fab de la presente invención puede obtenerse tratando un anticuerpo que reacciona específicamente con CD3 o CD123 con una proteasa, tal como papaína. También, el Fab puede producirse insertando secuencias de ADN que codifican ambas cadenas del Fab del anticuerpo en un vector para la expresión procariota, o para la expresión eucariota, e introduciendo el vector en células procariotas o eucariotas (según sea apropiado) para expresar el Fab.

El F(ab')₂ de la presente invención puede obtenerse tratando un anticuerpo que reacciona específicamente con CD3 o CD123 con una proteasa, pepsina. También, el F(ab')₂ puede producirse uniendo Fab' descrito más adelante mediante un enlace tioéter o un enlace disulfuro.

El Fab' de la presente invención puede obtenerse tratando F(ab')₂ que reacciona específicamente con CD3 o CD123 con un agente reductor, tal como ditiotreitól. También, el Fab' puede producirse insertando secuencias de ADN que codifican cadenas del Fab' del anticuerpo en un vector para la expresión procariota, o un vector para la expresión eucariota, e introduciendo el vector en células procariotas o eucariotas (según sea apropiado) para llevar a cabo su expresión.

El scFv de la presente invención puede producirse tomando secuencias de las CDR o dominios VH y VL como se ha descrito previamente, construyendo un ADN que codifica un fragmento scFv, insertando el ADN en un vector de expresión procariota o eucariota, e introduciendo el vector de expresión en células procariotas o eucariotas (según sea apropiado) para expresar el scFv. Para generar un fragmento scFv humanizado, puede usarse una tecnología muy conocida denominada injerto de CDR, que implica seleccionar las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) según la invención, e injertarlas en un marco de fragmento scFv humano de estructura tridimensional conocida (véanse, por ejemplo, W098/45322; WO 87/02671; US5.859.205; US5.585.089; US4.816.567; EP0173494).

Modificación de los anticuerpos de la invención

Se contemplan la o las modificaciones de la secuencia de aminoácidos de los anticuerpos o proteínas de unión semejantes a anticuerpo según se describen en la presente memoria. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/o otras propiedades biológicas del anticuerpo o proteína de unión semejante a anticuerpo. Por ejemplo, se sabe que cuando se produce un anticuerpo humanizado simplemente injertando sólo CDR en VH y VL de un anticuerpo derivado de un animal no humano en FR de los VH y VL de un anticuerpo humano, la actividad de unión a antígeno puede reducirse en comparación con la del anticuerpo original derivado de un animal no humano. Se considera que varios residuos de aminoácidos del VH y VL del anticuerpo no humano, no sólo en las CDR sino también en las FR, pueden estar directamente o indirectamente asociados con la actividad de unión a antígeno. Por lo tanto, la sustitución de estos residuos de aminoácidos con diferentes residuos de aminoácidos derivados de FR del VH y VL del anticuerpo humano reduciría la actividad de unión. Con el fin de resolver el problema, en los anticuerpos humanos injertados con CDR no humanas, se han hecho intentos para identificar, entre las secuencias de aminoácidos del FR del VH y VL de anticuerpos humanos, un residuo de aminoácido que está directamente asociado con la unión del anticuerpo, o que interacciona con un residuo de aminoácido de una CDR, o que mantiene la estructura tridimensional del anticuerpo y que está directamente asociado con la unión al antígeno. La actividad reducida de unión a antígeno podría incrementarse reemplazando los aminoácidos identificados con residuos de aminoácidos del anticuerpo original derivado de un animal no humano. Una proteína de unión semejante a anticuerpo de la invención puede comprender las

regiones variables de un anticuerpo humanizado y por lo tanto las consideraciones mencionadas en la presente memoria se aplican igualmente a proteínas de unión semejantes a anticuerpo de la invención.

5 Pueden hacerse modificaciones y cambios en la estructura de los anticuerpos de la presente invención, y en las secuencias de ADN que los codifican, y todavía resultan en un anticuerpo, proteína de unión semejante a anticuerpo o polipéptido funcional con características deseables.

10 Cuando se hacen los cambios en las secuencias de aminoácidos de polipéptidos, puede considerarse el índice hidropático de los aminoácidos. La importancia del índice hidropático de aminoácidos confiriendo una función biológica interactiva en una proteína se entiende generalmente en la técnica. Se acepta que el carácter hidropático relativo del aminoácido contribuye a la estructura secundaria de la proteína resultante, que a su vez define la interacción de la proteína con otras moléculas, por ejemplo, enzimas, sustratos, receptores, ADN, anticuerpos, antígenos, y semejantes. Se ha asignado a cada aminoácido un índice hidropático tomando como base su hidrofobicidad y características de carga, éstos son: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8) ; fenilalanina (+2,8); cisteína/cistina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); y arginina (-4,5).

Un objeto adicional de la presente invención también engloba las variantes conservativas de función de los polipéptidos de los anticuerpos anti-CD3, anticuerpos anti-CD123 y proteínas de unión semejantes a anticuerpo de la presente invención.

25 Por ejemplo, determinados aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos en una estructura proteica sin pérdida apreciable de actividad. Como la capacidad interactiva y naturaleza de una proteína define su actividad biológica funcional, pueden hacerse determinadas sustituciones de aminoácidos en una secuencia proteica, y por supuesto en su secuencia de ADN codificadora, obteniéndose sin embargo una proteína con propiedades semejantes. Se contempla así que pueden hacerse varios cambios en las secuencias de anticuerpos de la invención, o secuencias de ADN correspondientes que codifican dichos polipéptidos, sin pérdida apreciable de su actividad biológica.

30 Se sabe en la técnica que determinados aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos que tienen un índice o puntuación hidropática similar y todavía resultar en una proteína con una actividad biológica similar, es decir, obtener todavía una proteína

con funcionalidad biológica equivalente. También es posible usar tecnologías bien establecidas, tales como estrategias de escaneo de alanina, para identificar, en un anticuerpo o polipéptido de la invención, todos los aminoácidos que pueden sustituirse sin pérdida significativa de unión al antígeno. Dichos residuos pueden calificarse como

5 neutros, ya que no están implicados en la unión al antígeno o en el mantenimiento de la estructura del anticuerpo. Una o más de estas posiciones neutras pueden sustituirse por alanina o por otro aminoácido sin cambiar las características principales del anticuerpo o polipéptido de la invención.

Como se ha destacado anteriormente, las sustituciones de aminoácidos se basan

10 por lo tanto generalmente en la similitud relativa de los sustituyentes de la cadena lateral de los aminoácidos, por ejemplo, su hidrofobicidad, hidrofiliidad, carga, tamaño, y semejantes. Las sustituciones ejemplares que toman en consideración varias de las características anteriores son muy conocidas para los expertos en la técnica e incluyen: arginina y lisina; glutamato y aspartato; serina y treonina; glutamina y asparagina; y

15 valina, leucina e isoleucina.

También puede ser deseable modificar el anticuerpo anti-CD3, anticuerpo anti-CD123 y proteína de unión semejante a anticuerpo de la presente invención respecto a la función efectora, por ejemplo, para aumentar o reducir la citotoxicidad mediada por células dependiente de antígeno (ADCC) y/o la citotoxicidad dependiente de

20 complemento (CDC) del anticuerpo. Esto puede conseguirse introduciendo una o más sustituciones de aminoácidos en una región Fc del anticuerpo, denominado también en la presente memoria variantes de Fc en el contexto con las proteínas de unión semejantes a anticuerpo de la presente invención. Alternativamente o adicionalmente, pueden introducirse residuo(s) de cisteína en la región Fc, permitiendo de esta manera

25 la formación de enlaces disulfuro inter-cadena en esta región. El anticuerpo homodimérico así generado puede tener una capacidad de internalización mejorada o reducida y/o muerte celular mediada por complemento y/o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) incrementadas (Caron PC. et al. 1992; y Shopes B. 1992).

Otro tipo de modificación de aminoácidos del anticuerpo anti-CD3, anticuerpo anti-CD123 y proteína de unión semejante a anticuerpo de la invención puede ser útil para alterar el patrón de glicosilación original del anticuerpo anti-CD3, anticuerpo anti-CD123 y proteína de unión semejante a anticuerpo, es decir, delecionando uno o más restos de

30 carbohidrato encontrados en el anticuerpo anti-CD3, anticuerpo anti-CD123 y proteína

de unión semejante a anticuerpo, y/o añadiendo uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en el anticuerpo anti-CD3, anticuerpo anti-CD123 y proteína de unión semejante a anticuerpo. La presencia bien de las secuencias tripéptido asparagina-X-serina, y asparagina-X-treonina, en las que X es cualquier aminoácido excepto prolina, crea un sitio potencial de glicosilación. La adición o delección de sitios de glicosilación al anticuerpo anti-CD3, anticuerpo anti-CD123 y proteína de unión semejante a anticuerpo se consigue convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de manera que contenga una o más de las secuencias tripéptido descritas anteriormente (para sitios de glicosilación ligados a N).

Otro tipo de modificación implica la eliminación de secuencias identificadas, bien in silico o experimentalmente, como que resultan potencialmente en productos de degradación o heterogeneidad de preparaciones de anticuerpo anti-CD3, anticuerpo anti-CD123 y proteína de unión semejante a anticuerpo. Como ejemplos, la desamidación de residuos de asparagina y glutamina puede ocurrir dependiendo de factores tales como pH y exposición en superficie. Los residuos de asparagina son particularmente susceptibles a la desamidación, principalmente cuando están presentes en la secuencia Asn-Gly, y en menor grado en otras secuencias de dipéptido tales como Asn-Ala. Cuando dicho sitio de desamidación, en particular Asn-Gly, está presente en un anticuerpo anti-CD3, anticuerpo anti-CD123 y proteína de unión semejante a anticuerpo o polipéptido de la invención, puede ser deseable por lo tanto eliminar el sitio, típicamente por sustitución conservativa para eliminar uno de los residuos implicados. Dichas sustituciones en una secuencia para eliminar uno o más de los residuos implicados también se pretende que esté englobada por la presente invención.

Otro tipo de modificación covalente implica acoplar químicamente o enzimáticamente glicósidos al anticuerpo anti-CD3, anticuerpo anti-CD123 y proteína de unión semejante a anticuerpo. Estos procedimientos son ventajosos ya que no requieren la producción de anticuerpo anti-CD3, anticuerpo anti-CD123 o proteína de unión semejante a anticuerpo en una célula huésped que tiene capacidades de glicosilación para glicosilación ligada a N u O. Dependiendo del modo de acoplamiento usado, el o los azúcares pueden unirse a (a) arginina e histidina, (b) grupos carboxilo libres, (c) grupos sulfhidrilo libres tales como los de cisteína, (d) grupos hidroxilo libres tales como los de serina, treonina, o hidroxiprolina, (e) residuos aromáticos tales como los de fenilalanina, tirosina, o triptófano, o (f) el grupo amida de glutamina. Por ejemplo, dichos métodos se describen en WO87/05330.

La eliminación de cualesquiera restos de carbohidrato presentes en el anticuerpo anti-CD3, anticuerpo anti-CD123 o proteína de unión semejante a anticuerpo puede conseguirse químicamente o enzimáticamente. La desglicosilación química requiere la exposición del anticuerpo anti-CD3, anticuerpo anti-CD123 o proteína de unión semejante a anticuerpo al compuesto ácido trifluorometanosulfónico, o un compuesto equivalente. Este tratamiento resulta en la escisión de la mayor parte o todos los azúcares excepto el azúcar de unión (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), mientras deja el anticuerpo intacto. La desglicosilación química se describe por Sojahn H. et al. (1987) y por Edge, AS. et al. (1981). La escisión enzimática de restos de carbohidrato en anticuerpos puede conseguirse por el uso de una variedad de endo y exo-glicosidasas como se describe por Thotakura, NR. et al. (1987).

Otro tipo de modificación covalente del anticuerpo anti-CD3, anticuerpo anti-CD123 o proteína de unión semejante a anticuerpo comprende unir el anticuerpo a uno de una variedad de polímeros no proteínicos, por ejemplo, polietilén glicol, polipropilén glicol, o polioxialquilenos, en la manera mostrada en las Patentes US Nos. 4.640. 835; 4.496. 689; 4.301. 144; 4.670. 417; 4.791. 192 ó 4.179.337.

Composiciones farmacéuticas

El anticuerpo anti-CD3, anticuerpo anti-CD123 y/o proteína de unión semejante a anticuerpo de la invención puede combinarse con excipientes farmacéuticamente aceptables, y opcionalmente matrices de liberación sostenida, tales como polímeros biodegradables, para formar composiciones terapéuticas.

Así, otro objeto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-CD3, un anticuerpo anti-CD123 o proteína de unión semejante a anticuerpo de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La invención también se refiere a un anticuerpo anti-CD3, un anticuerpo anti-CD123 o proteína de unión semejante a anticuerpo según la invención, para uso como un medicamento. La invención también se refiere a una composición farmacéutica de la invención para uso como un medicamento.

Los términos "composición farmacéutica" o "composición terapéutica" tal y como se usan en la presente memoria se refieren a un compuesto o composición capaz de inducir un efecto terapéutico deseado cuando se administra apropiadamente a un paciente.

Dichas composiciones terapéuticas o farmacéuticas pueden comprender una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo anti-CD3, un anticuerpo anti-CD123 o proteína de unión semejante a anticuerpo o conjugados de fármacos de éstos, mezclados con un agente de formulación farmacéuticamente o fisiológicamente aceptable seleccionado por su idoneidad con el modo de administración.

"Farmacéuticamente" o "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra no deseada cuando se administra a un mamífero, especialmente un ser humano, según sea apropiado. Un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable se refiere a un material de relleno, diluyente, material de encapsulación o auxiliar de formulación no tóxico sólido, semi-sólido o líquido de cualquier tipo.

Tal y como se usa en la presente memoria, "vehículos farmacéuticamente aceptables" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, y semejantes que son fisiológicamente compatibles. Los ejemplos de vehículos, diluyentes y/o excipientes adecuados incluyen uno o más de agua, aminoácidos, disolución salina, disolución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol, y semejantes, así como combinación de éstos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, polialcoholes, o cloruro de sodio en la composición y la formulación también puede contener un antioxidante tal como triptamina y un agente estabilizador tal como Tween 20.

La forma de las composiciones farmacéuticas, la ruta de administración, la dosificación y el régimen dependen naturalmente de la afección que se va a tratar, la gravedad de la enfermedad, la edad, peso, y sexo del paciente, etc.

Las composiciones farmacéuticas de la invención, pueden formularse para administración tópica, oral, parenteral, intranasal, intravenosa, intramuscular, subcutánea o intraocular y semejantes.

En particular, las composiciones farmacéuticas pueden contener vehículos, que son farmacéuticamente aceptables para una formulación que puede de ser inyectada. Éstos pueden ser en particular isotónicos, estériles, disoluciones salinas (fosfato de monosodio o disodio, cloruro de sodio, potasio, calcio o magnesio y semejantes o mezclas de dichas sales), o composiciones secas, especialmente liofilizadas que después de la adición, dependiendo del caso, de agua esterilizada o disolución salina fisiológica, permiten la constitución de disoluciones inyectables.

Las dosis usadas para la administración pueden adaptarse como una función de varios parámetros, y en particular como una función del modo de administración usado, de la patología relevante, o alternativamente de la duración deseada del tratamiento.

5 Para preparar composiciones farmacéuticas, puede disolverse o dispersarse una cantidad efectiva del anticuerpo o inmunoconjugado de la invención en un vehículo medio acuoso farmacéuticamente aceptable.

10 Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen disoluciones o dispersiones acuosas estériles, formulaciones que incluyen aceite de sésamo, aceite de cacahuete o propilen glicol acuoso; y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida hasta el punto en el que exista una fácil jeringabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos.

15 Las disoluciones de los compuestos activos como base libre o sales farmacológicamente aceptables pueden prepararse en agua mezclada adecuadamente con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones también pueden prepararse en glicerol, polietilen glicoles líquidos, y mezclas de éstos y en aceites. En las condiciones habituales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos.

20 Un anticuerpo anti-CD3, anticuerpo anti-CD123 o proteína de unión semejante a anticuerpo de la invención puede formularse en una composición en una forma neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de adición a ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico, y semejantes. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden derivar de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio, o hierro, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, glicina, histidina, procaína y semejantes.

30 El vehículo también puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilen glicol, y polietilen glicol líquido, y semejantes), mezclas adecuadas de éstos, y aceites vegetales. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, por el uso de un recubrimiento, tales como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y por el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos

puede conseguirse por varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y semejantes. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede conseguirse por el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las disoluciones inyectables estériles se preparan incorporando los compuestos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con varios de los demás ingredientes enumerados anteriormente, como se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los varios ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los demás ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son técnicas de secado en vacío y liofilización que rinden un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una disolución previamente esterilizada por filtración de éste.

También se contempla la preparación de disoluciones más concentradas, o altamente concentradas, para inyección directa, en las que se considera el uso de DMSO como disolvente para resultar en una penetración extremadamente rápida, administrando altas concentraciones de los agentes activos en un área tumoral pequeña.

Después de la formulación, las disoluciones se administrarán de una manera compatible con la formulación de dosificación y una cantidad tal que sea terapéuticamente efectiva. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas de dosificación, tales como el tipo de disoluciones inyectables descrito anteriormente, pero también pueden emplearse cápsulas de liberación del fármaco y semejantes.

Para la administración parenteral en una disolución acuosa, por ejemplo, la disolución debería estar adecuadamente tamponada si es necesario y el diluyente líquido debe volverse en primer lugar isotónico con disolución salina o glucosa suficiente. Estas disoluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. A este respecto, los medios acuosos estériles que pueden emplearse serán conocidos para los expertos en la técnica a la vista de la presente descripción. Por ejemplo, una

dosificación podría disolverse en 1 ml de disolución isotónica de NaCl y bien añadirse a 1.000 ml de fluido de hipodermoclasia o inyectarse en el sitio propuesto de infusión, (véase, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15ª Edición, páginas 1035-1038 y 1570-1580). Necesariamente ocurrirá alguna variación en la dosificación dependiendo de la condición del sujeto que se está tratando. La persona responsable de la administración determinará, en cualquier evento, la dosis apropiada para el sujeto individual.

En una realización, un anticuerpo anti-CD3, anticuerpo anti-CD123 o proteína de unión semejante a anticuerpo de la invención se formula en una mezcla terapéutica para comprender aproximadamente 0,01 a 100 miligramos, por dosis o así.

Además del anticuerpo anti-CD3, anticuerpo anti-CD123 o proteína de unión semejante a anticuerpo formulada para administración parenteral, tal como inyección intravenosa o intramuscular, otras formas farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, comprimidos u otros sólidos para administración oral, cápsulas de liberación en el tiempo, y cualquier otra forma usada actualmente.

En determinadas realizaciones, se contempla el uso de liposomas y/o nanopartículas para la introducción de polipéptidos tales como un anticuerpo anti-CD3, anticuerpo anti-CD123 o proteína de unión semejante a anticuerpo en células huésped. La formación y uso de liposomas y/o nanopartículas son conocidos para los expertos en la técnica.

La nanocápsulas pueden incluir generalmente compuestos de una forma estable y reproducible. Para evitar efectos secundarios debidos a la sobrecarga polimérica intracelular, se diseñan generalmente estas partículas ultrafinas (con tamaño de aproximadamente 0,1 μm) usando polímeros capaces de degradarse in vivo. Las nanopartículas de polialquil-cianoacrilato biodegradables que cumplen estos requerimientos se contemplan para uso en la presente invención, y dichas partículas pueden prepararse fácilmente.

Los liposomas se forman a partir de fosfolípidos que se dispersan en un medio acuoso y forman espontáneamente vesículas bicapa concéntricas multilamelares (también denominadas vesículas multilamelares (MLV)). Las MLV tienen generalmente diámetros de 25 nm a 4 μm . La sonicación de las MLV resulta en la formación de vesículas unilamelares pequeñas (SUV) con diámetros en el intervalo de 200 a 500 Å, que contienen una disolución acuosa en el núcleo. Las características físicas de los liposomas dependen del pH, fuerza iónica y la presencia de cationes divalentes.

Una vez se ha formulado la composición farmacéutica, puede almacenarse en viales estériles como una disolución, suspensión, gel, emulsión, sólido, o como un polvo deshidratado o liofilizado. Dichas formulaciones pueden almacenarse bien en forma lista para su uso o en una forma (por ejemplo, liofilizada) que requiere reconstitución antes de la administración.

Métodos y usos terapéuticos

Los inventores han mostrado para varios compuestos bi-específicos de la invención, tales como “hz20G6x7G3”, “7G3xhz4B4”, “hz4B4x3E3” y “hz20G6x7G3–TL4” citotoxicidad mediada por células T en un modelo de línea celular tumoral positivo para CD123. Además, los inventores demostraron la capacidad de varios compuestos bi-específicos de la invención de activar células T en presencia de células diana dando lugar a citotoxicidad de las células tumorales. Los inventores demostraron además la baja activación de las células T en ausencia de activación de células T de células diana.

Es muy conocido que los anticuerpos monoclonales anti-CD123 terapéuticos pueden dar lugar a la depleción de células que portan el antígeno reconocido específicamente por el anticuerpo. Esta depleción puede estar mediada por al menos tres mecanismos: citotoxicidad celular mediada por anticuerpo (ADCC), citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) e inhibición anti-tumoral directa del crecimiento tumoral a través de señales proporcionadas mediante el antígeno diana del anticuerpo. En una realización, los anticuerpos anti-CD123 de la invención inducen citotoxicidad en una célula que expresa CD123 por citotoxicidad celular mediada por anticuerpo (ADCC), citotoxicidad dependiente de complemento (CDC).

"Citotoxicidad dependiente de complemento" o "CDC" se refiere a la lisis de una célula diana en presencia de complemento. La activación de la ruta clásica del complemento se inicia por la unión del primer componente del sistema del complemento a anticuerpos que están unidos a su antígeno cognado. Para evaluar la activación del complemento, puede realizarse un ensayo CDC, por ejemplo, como se describe en Gazzano-Santoro et al. (1997).

"Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo" o "ADCC" se refiere a una forma de citotoxicidad en la que los anticuerpos secretados unidos en receptores Fc (FcRs) presentes en determinadas células citotóxicas (por ejemplo, células Asesinas Naturales (NK), neutrófilos, y macrófagos) permiten que estas células efectoras citotóxicas se unan específicamente a una célula diana que porta antígeno y

posteriormente matan la célula diana. Para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés, puede realizarse un ensayo *in vitro* ADCC, tal como el descrito en la Patente US No. 5.500.362 ó 5.821.337.

5 Como se ha descrito anteriormente en la sección “anticuerpos anti-CD3” los anticuerpos anti-CD3 de la invención tienen una baja activación de células T, tienen así un potencial terapéutico en un sujeto para uso como un agente inmunosupresor.

Además, una proteína de unión semejante a anticuerpo como se ha definido anteriormente tiene como objetivo aumentar la respuesta inmune del paciente a tumores dirigiendo las células T a células tumorales. En una realización, la proteína de unión
10 semejante a anticuerpo como se ha definido anteriormente toma como diana la subunidad CD3 ϵ del Receptor de células T (TCR) en la superficie de la célula T y el otro brazo toma como diana una célula de cáncer que expresa CD123, en el que la co-conexión de la célula T y la célula tumoral por la construcción biespecífica da lugar a la formación de una sinapsis citolítica que induce la activación de la célula T y resulta en la
15 muerte de la célula tumoral. La muerte de la célula tumoral puede estar mediada por al menos dos mecanismos: Muerte Perforina/Granzima y Muerte FasL/Fas, por ejemplo, Muerte Perforina/Granzima.

Por lo tanto, en una realización, la invención proporciona un método para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno que comprende administrar a un sujeto que lo
20 necesita una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo anti-CD3, un anticuerpo anti-CD123, proteína de unión semejante a anticuerpo o una composición farmacéutica de la invención como se ha definido anteriormente en la sección “Composición farmacéutica”.

La invención se refiere además al uso de un anticuerpo anti-CD3, un anticuerpo
25 anti-CD123, proteína de unión semejante a anticuerpo o una composición farmacéutica de la invención para la preparación de un medicamento para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno en un sujeto. En una realización, la invención se refiere al uso de un anticuerpo anti-CD3, anticuerpo anti-CD123, proteína de unión semejante a anticuerpo o una composición farmacéutica para tratar o prevenir una enfermedad o
30 trastorno en un sujeto.

El término “sujeto” o “individuo” se usan indistintamente y pueden ser, por ejemplo, un mamífero humano o no humano. Por ejemplo, el sujeto es un murciélago; un hurón; un conejo; un felino (gato); un canino (perro); un primate (mono), un equino

(caballo); un ser humano, incluyendo hombre, mujer y niño. En una realización, un "sujeto" se refiere a un ser humano.

En el contexto de la invención, el término "tratar" o "tratamiento", se refiere a un uso terapéutico (es decir, en un sujeto que tiene una enfermedad dada) y significa
5 revertir, aliviar, inhibir el progreso de uno o más síntomas de dicho trastorno o afección. Por lo tanto, tratamiento no sólo se refiere a un tratamiento que da lugar a una cura completa de la enfermedad, sino también a tratamientos que ralentizan la progresión de la enfermedad y/o prolongan la supervivencia del sujeto.

Por "prevenir" se quiere decir un uso profiláctico (es decir, en un sujeto
10 susceptible de desarrollar una enfermedad dada).

En una realización, una "enfermedad" o "trastorno" es cualquier afección que se beneficiaría de tratamiento con el anticuerpo anti-CD123 o proteína de unión semejante a anticuerpo de la invención. En una realización, esto incluye trastornos o enfermedades crónicos y agudos incluyendo aquellas afecciones patológicas que
15 predisponen al sujeto al trastorno en cuestión. El término "que necesita tratamiento" se refiere a un sujeto que ya tiene el trastorno así como a aquellos en los que se quiere prevenir el trastorno.

En una realización, una "enfermedad" o "trastorno" es cualquier afección que se beneficiaría de tratamiento con el anticuerpo anti-CD3 de la invención. Por lo tanto, en
20 una realización, esto incluye enfermedades o trastornos caracterizados por respuestas inmunes patológicas.

Una "respuesta inmune patológica" en el contexto de la invención es una respuesta inmune inflamatoria.

En una realización, la enfermedad, caracterizada por una respuesta inmune
25 patológica, es una enfermedad autoinmune, una enfermedad relacionada con trasplante, o una enfermedad asociada con inflamación.

La enfermedad auto-inmune es, por ejemplo, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y diabetes tipo 1 o una enfermedad relacionada con trasplante tal como enfermedad de huésped frente a injerto (GVHD).

30 Por lo tanto, en una realización, el sujeto ha sido diagnosticado que padece una enfermedad o trastorno caracterizado por una respuesta inmune patológica.

En una realización, el sujeto ha sido diagnosticado que padece una enfermedad auto-inmune.

En otra realización, el trastorno se refiere a cáncer.

En una realización adicional, cáncer se refiere a cáncer hematológico, en particular a cáncer hematológico asociado con la expresión de CD123.

En una realización, la expresión de CD123 por las células de cáncer se ensaya fácilmente por ejemplo usando un anticuerpo anti-CD123 según la invención, como se describe en la sección siguiente “Usos diagnósticos”.

“Cánceres hematológicos asociados con la expresión de CD123” incluyen leucemias (tales como leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena crónica, leucemia linfóide aguda, leucemia linfóide crónica, leucemia de células pilosas y síndrome de mielodisplasia) y afecciones linfoproliferativas malignas, neoplasma de células dendríticas plasmacitoide blástico (BPDCN), mastocitosis sistémica, incluyendo linfomas (tales como mieloma múltiple, linfoma no de Hodgkin, linfoma de Burkitt, y linfoma folicular de células grandes y células pequeñas).

Como se ha descrito anteriormente en la sección ‘anticuerpos anti-CD123’ las LSCs expresan CD123.

Así, en una realización relacionada, cáncer se refiere a cáncer hematológico asociado con células madre leucémicas.

Las afecciones de cáncer hematológico asociadas con células madre leucémicas (LSC) que pueden tratarse según la presente invención incluyen leucemias (tales como leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena crónica, leucemia linfóide aguda, leucemia linfóide crónica, y síndrome de mielodisplasia) y afecciones linfoproliferativas malignas, incluyendo linfomas (tales como mieloma múltiple, linfoma no de Hodgkin, linfoma de Burkitt, y linfoma folicular de células grandes y células pequeñas).

En un aspecto de la invención, el cáncer hematológico es leucemia mielógena aguda (AML).

En una realización, el sujeto ha sido diagnosticado que padece AML.

En una realización adicional, el sujeto ya se ha tratado con quimioterapia hasta la remisión completa pero ha recaído.

La “recidiva” se define como la reaparición de AML después de remisión completa.

“Remisión completa” o “CR” se define como sigue: valores normales para neutrófilos ($>1,0 \times 10^9/L$), nivel de hemoglobina de 10g/dL y recuento de plaquetas ($>100 \times 10^9/L$) e independencia de transfusión de células rojas; células de blastos menores de 5%, sin agrupaciones o colecciones de blastos, y ausencia de bastones de

Auer en el examen de la médula ósea; y maduración normal de las células sanguíneas (morfología; mielograma) y ausencia de leucemia extramedular.

En una realización, el anticuerpo anti-CD3, anticuerpo anti-CD123 o proteína de unión semejante a anticuerpo de la invención se usa solo o en combinación con cualquier agente inhibidor del crecimiento adecuado.

Por una "cantidad terapéuticamente efectiva" del polipéptido de la invención se quiere decir una cantidad suficiente del polipéptido para tratar dicha enfermedad cancerosa, con una proporción beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico. Debe entenderse, sin embargo, que el uso diario total de los polipéptidos y composiciones de la presente invención será decidido por el médico responsable en el alcance de un criterio médico apropiado. El nivel de dosis terapéuticamente efectivo específico para cualquier paciente particular dependerá de una variedad de factores incluyendo el trastorno que se está tratando y la gravedad del trastorno; actividad del polipéptido específico empleado; la composición específica empleada, la edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del paciente; el tiempo de administración, ruta de administración, y velocidad de excreción del polipéptido específico empleado; la duración del tratamiento; fármacos usados en combinación o coincidentes con el polipéptido específico empleado; y factores semejantes muy conocidos en las técnicas médicas. Por ejemplo, es muy conocido en la experiencia de la técnica empezar con dosis del compuesto a niveles menores de los requeridos para conseguir el efecto terapéutico deseado e incrementar gradualmente la dosificación hasta que se consiga el efecto deseado.

En una realización, la eficacia del tratamiento con un anticuerpo anti-CD3, un anticuerpo anti-CD123 o proteína de unión semejante a anticuerpo de la invención o inmunoconjugado según la invención se ensaya fácilmente *in vivo*, por ejemplo, en un modelo de cáncer en ratón y midiendo, por ejemplo, cambios en el volumen tumoral entre grupos tratado y control.

Usos diagnósticos

Se ha reportado que CD123 está sobre-expresada en la superficie de una variedad de neoplasmas hematológicos.

Por lo tanto, CD123 constituye un marcador de cáncer y, por lo tanto, tiene el potencial de ser usado para indicar la eficacia de una terapia anti-cáncer o detectar la recurrencia de la enfermedad.

En una realización, el anticuerpo anti-CD123 de la invención se usa como componente de un ensayo en el contexto de una terapia dirigida a tumores que expresan CD123, con el fin de determinar la susceptibilidad del paciente al agente terapéutico, monitorizar la eficacia de la terapia anti-cáncer o detectar la recurrencia de la enfermedad después del tratamiento. En particular, el mismo anticuerpo anti-CD123 de la invención se usa tanto como componente del agente terapéutico como componente del ensayo de diagnóstico.

Así, un objeto adicional de la invención se refiere a un anticuerpo anti-CD123 según la invención para uso para detectar *in vivo* la expresión de CD123 en un sujeto, o para uso para detectar *ex vivo* la expresión de CD123 en una muestra biológica de un sujeto. En una realización, dicha detección se pretende, en particular para:

- a) diagnosticar la presencia de un cáncer en un sujeto, o
- b) determinar la susceptibilidad de un paciente que tiene cáncer a un agente terapéutico dirigido a CD123, en particular un anticuerpo anti-CD123 o proteína de unión semejante a anticuerpo según la invención, o
- c) monitorizar la eficacia de una terapia de cáncer anti-CD123 o detectar una recidiva del cáncer después de terapia de cáncer anti-CD123, en particular para terapia con un anticuerpo anti-CD123 o proteína de unión semejante a anticuerpo según la invención; mediante la detección de la expresión de la proteína de superficie CD123 en células tumorales.

En una realización, el anticuerpo se pretende para un uso *in vitro* o *ex vivo*. Por ejemplo, CD123 se detecta *in vitro* o *ex vivo* en una muestra biológica obtenida de un sujeto, usando un anticuerpo anti-CD123 de la invención. El uso según la invención también puede ser un uso *in vivo*. Por ejemplo, un anticuerpo anti-CD123 o proteína de unión semejante a anticuerpo según la invención se administra al sujeto y se detectan y/o cuantifican los complejos anticuerpo-células, mediante lo cual la detección de dichos complejos es indicativa de un cáncer.

La invención se refiere además a un método *in vitro* o *ex vivo* para detectar la presencia de un cáncer en un sujeto, que comprende las etapas que consisten en:

- (a) poner en contacto una muestra biológica de un sujeto con un anticuerpo anti-CD123 según la invención, en particular en condiciones suficientes para que el anticuerpo forme complejos con dicha muestra biológica;

- (b) medir el nivel de anticuerpo unido a dicha muestra biológica,
- (c) detectar la presencia de un cáncer comparando el nivel medido de anticuerpo unido con un control, siendo un nivel incrementado de anticuerpo unido comparado con el control indicativo de un cáncer.

5 La invención también se refiere a un método *in vitro* o *ex vivo* para determinar la susceptibilidad de un paciente que tiene cáncer a un agente terapéutico dirigido a CD123, en particular a un anticuerpo anti-CD123 o proteína de unión semejante a anticuerpo según la invención, método que comprende las etapas que consisten en:

- 10 (a) poner en contacto una muestra biológica de un paciente que tiene cáncer con un anticuerpo anti-CD123 según la invención, en particular en condiciones suficientes para que el anticuerpo forme complejos con dicha muestra biológica;
- (b) medir el nivel de anticuerpo unido a dicha muestra biológica,
- 15 (c) comparar el nivel medido de anticuerpo unido a dicha muestra biológica con el nivel de anticuerpo unido a un control;

en el que un nivel incrementado de anticuerpo unido a dicha muestra biológica comparado con el control es indicativo de un paciente susceptible a un agente terapéutico dirigido al menos a CD123.

20 En los métodos anteriores, dicho control puede ser una muestra biológica normal, no cancerosa, del mismo tipo, o un valor de referencia determinado representativo del nivel de unión del anticuerpo en una muestra biológica normal del mismo tipo.

25 En una realización, el anticuerpo anti-CD123 de la invención es útil para diagnosticar cánceres hematológicos asociados con la expresión de CD123 incluyendo leucemias (tales como leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena crónica, leucemia linfoide aguda, leucemia linfoide crónica, leucemia de células pilosas y síndrome de mielodisplasia) y afecciones linfoproliferativas malignas, neoplasma de células dendríticas plasmacitoide blástico (BPDCN), mastocitosis sistémica, incluyendo linfomas (tales como mieloma múltiple, linfoma no de Hodgkin, linfoma de Burkitt, y 30 linfoma folicular de células grandes y células pequeñas).

La invención se refiere además a un método *in vitro* o *ex vivo* para monitorizar la eficacia de terapia de cáncer anti-CD123, que comprende las etapas que consisten en:

- 5 (a) poner en contacto una muestra biológica de un sujeto que se está sometiendo a terapia de cáncer anti-CD123, con un anticuerpo anti-CD123 o proteína de unión semejante a anticuerpo según la invención, en particular en condiciones suficientes para que el anticuerpo forme complejos con dicha muestra biológica;
- (b) medir el nivel de anticuerpo unido a dicha muestra biológica,
- (c) comparar el nivel medido de anticuerpo unido con el nivel de anticuerpo unido a un control;

10 en el que un nivel disminuido de anticuerpo unido a dicha muestra biológica comparado con el control es indicativo de la eficacia de dicha terapia de cáncer anti-CD123.

 En dicho método, un nivel incrementado de anticuerpo unido a dicha muestra biológica comparado con el control es indicativo de la ineficacia de dicha terapia de cáncer anti-CD123.

15 Dicho control es en particular una muestra biológica del mismo tipo que la muestra biológica sometida a análisis, pero que se ha obtenido del sujeto previamente en el tiempo, durante el curso de la terapia de cáncer anti-CD123.

20 La invención se refiere además a un método *in vitro* o *ex vivo* para detectar recidiva de cáncer después de terapia de cáncer anti-CD123, que comprende las etapas que consisten en:

- 25 (a) poner en contacto una muestra biológica de un sujeto que ha completado terapia de cáncer anti-CD123, con un anticuerpo anti-CD123 o proteína de unión semejante a anticuerpo según la invención, en particular en condiciones suficientes para que el anticuerpo forme complejos con dicha muestra biológica;
- (b) medir el nivel de anticuerpo unido a dicha muestra biológica,
- (c) comparar el nivel medido de anticuerpo unido con el nivel de anticuerpo unido a un control;

30 en el que un nivel incrementado de anticuerpo unido a dicha muestra biológica comparado con el control es indicativo de recidiva de cáncer después de dicha terapia de cáncer anti-CD123.

Dicho control es en particular una muestra biológica del mismo tipo que la muestra biológica sometida a análisis, pero que se ha obtenido del sujeto previamente en el tiempo, posteriormente o después de la finalización de la terapia de cáncer anti-CD123.

5 Dicha terapia de cáncer anti-CD123 es en particular una terapia que usa un anticuerpo anti-CD123 o una proteína de unión semejante a anticuerpo o inmuconjugado según la invención. Dicha terapia de cáncer anti-CD123 toma como diana un cáncer que expresa CD123, en particular un cáncer hematológico asociado con la expresión de CD123 incluyendo leucemias (tales como leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena crónica, leucemia linfoide aguda, leucemia linfoide crónica, 10 leucemia de células pilosas y síndrome de mielodisplasia) y afecciones linfoproliferativas malignas, neoplasma de células dendríticas plasmacitoide blástico (BPDCN), mastocitosis sistémica, incluyendo linfomas (tales como mieloma múltiple, linfoma no de Hodgkin, linfoma de Burkitt, y linfoma folicular de células grandes y células pequeñas).

15

En una realización, el anti-CD123 de la invención se marca con una molécula o sustancia detectable, tal como una molécula fluorescente, una molécula radiactiva o cualquier otro marcador conocido que proporcione (bien directamente o indirectamente) una señal.

20

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "marcado", respecto al anticuerpo anti-CD123 según la invención, se pretende que englobe el marcaje directo del anticuerpo anti-CD123 mediante el acoplamiento (es decir, unión física) de una sustancia detectable, tal como un agente radiactivo o un fluoróforo (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína (FITC) o ficoeritrina (PE) o Indocianina (Cy5)) al 25 polipéptido, así como el marcaje indirecto del polipéptido mediante reactividad con una sustancia detectable.

30

En una realización adicional, un anticuerpo anti-CD123 de la invención se marca con una molécula radiactiva por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, las moléculas radiactivas incluyen pero no están limitadas a átomo radiactivo para estudios escintigráficos tales como I^{123} , I^{124} , In^{111} , Re^{186} , Re^{188} , Tc^{99} . En un ejemplo, los polipéptidos de la invención también se marcan con un marcador de spin para formación de imágenes por resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocido como formación de imágenes por resonancia magnética, MRI), tal como yodo-123,

indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

Una "muestra biológica" engloba una variedad de tipos de muestra obtenida de un sujeto y puede usarse en un ensayo de diagnóstico o monitorización. Las muestras biológicas incluyen pero no están limitadas a sangre y otras muestras líquidas de origen biológico, muestras de tejido sólido tal como una muestra de biopsia o cultivos de tejidos o células derivados de ellos. y la progenie de éstos. Por lo tanto, las muestras biológicas engloban muestras clínicas, células en cultivo, sobrenadantes de células, lisados de células, suero, plasma, fluido biológico, y muestras de tejido, en particular muestra de tumor.

La invención también se refiere a un método *in vivo* para detectar la presencia de un cáncer en un sujeto, que comprende las etapas que consisten en:

- a) administrar un anticuerpo según la invención marcado de forma detectable a un paciente;
- b) detectar la localización de dicho anticuerpo marcado de forma detectable en el paciente por formación de imágenes.

En una realización, los anticuerpos de la invención son útiles para establecer el estadio de un cáncer (por ejemplo, en formación de imágenes por radiactividad). Se usan, por ejemplo, solos o en combinación con otros marcadores de cáncer.

Los términos "detección" o "detectado" tal y como se usan en la presente memoria incluyen la detección cualitativa y/o cuantitativa (niveles de medición) con o sin referencia a un control.

En el contenido de la invención, el término "diagnosticar", tal y como se usa en la presente memoria, significa la determinación de la naturaleza de una afección médica que se pretende que identifique una patología que afecta al sujeto a partir de varios datos recogidos.

En dicho método, el cáncer es un cáncer que expresa CD123 como se ha definido anteriormente.

Kits

Finalmente, la invención también proporciona kits que comprenden al menos un anticuerpo anti-CD3, al menos un anticuerpo anti-CD123 o al menos una proteína de unión semejante a anticuerpo de la invención. Los kits que contienen anticuerpos anti-

CD123 o anti-CD3 de la invención encuentran uso en la detección de la proteína de superficie CD123 o CD3, o en ensayos terapéuticos o de diagnóstico. Los kits de la invención pueden contener un polipéptido o anticuerpo anti-CD3, al menos un anticuerpo anti-CD123 o al menos una proteína de unión semejante a anticuerpo acoplado a un soporte sólido, por ejemplo, una placa de cultivo tisular o lechos (por ejemplo, lechos de sefarosa). Pueden proporcionarse kits que contienen anticuerpos para la detección y cuantificación de la proteína de superficie CD123 o CD3 *in vitro*, por ejemplo, en un ELISA o una transferencia Western. En una realización, dicho anticuerpo es útil para la detección y se proporciona con un marcador tal como un marcador fluorescente o radiactivo.

En una realización, la invención engloba kits para producir una unidad de administración de dosis única. Los kits pueden contener cada uno tanto un primer contenedor que tiene una proteína seca y un segundo contenedor que tiene una formulación acuosa. También se incluyen en el alcance de esta invención kits que contienen jeringas pre-cargadas con una única o múltiples cámaras (por ejemplo, jeringas de líquido y liojeringas).

A lo largo de la presente solicitud, el término “que comprende” debe interpretarse como que engloba todas las características mencionadas específicamente así como las opcionales, adicionales, no especificadas. Tal y como se usa en la presente memoria, el uso del término “que comprende” también describe la realización en la que no están presentes características aparte de las características mencionadas específicamente (es decir, “que consiste en”). Además, el artículo indefinido “un” o “una” no excluye una pluralidad. El mero hecho de que determinadas medidas se reciten en diferentes reivindicaciones mutuamente dependientes no indica que una combinación de estas medidas no pueda usarse para conseguir una ventaja.

La invención se describirá ahora con más detalles con referencia a las figuras y ejemplos siguientes. Todos los documentos de bibliografía y patente citados en la presente memoria se incorporan en la presente memoria por referencia. Aunque la invención se ha ilustrado y descrito con detalle en la descripción anterior, los ejemplos deben considerarse ilustrativos o ejemplares y no restrictivos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS

SEQ ID NO: 1 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína CD3ε humana de longitud completa, incluyendo el péptido señal, según está disponible en la base de datos Uniprot con el número de registro P07766.

- 5 SEQ ID NO: 2 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína CD3ε de *Macaca fascicularis* de longitud completa, incluyendo el péptido señal, según está disponible en la base de datos Uniprot con el número de registro Q95LI5.

- 10 SEQ ID NO: 3 muestra la secuencia de aminoácidos de la fusión CD3ε humana madura Fc etiquetada con His que comprende los aminoácidos 23 a 126 de la proteína CD3ε humana de tipo salvaje de longitud completa.

- 15 SEQ ID NO: 4 muestra la secuencia de aminoácidos de la fusión CD3ε madura de *Macaca fascicularis* Fc que comprende los aminoácidos 23 a 117 de la proteína CD3ε de *Macaca fascicularis* de tipo salvaje de longitud completa (SEQ ID NO:2) que contiene un intercambio Ala a Val en la posición de aminoácido 35 en comparación con la posición de aminoácido 57 de la secuencia de tipo salvaje.

SEQ ID NO: 5 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada del anticuerpo denominado “20G6-F3”.

SEQ ID NO: 6, 7 y 8 muestran las secuencias de aminoácidos de CDR1-H, CDR2-H y CDR3-H del anticuerpo denominado “20G6-F3”.

- 20 SEQ ID NO: 9 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera del anticuerpo denominado “20G6-F3”.

- 25 SEQ ID NO: 10 muestra la secuencia de aminoácidos de CDR1-L de los anticuerpos denominados “20G6-F3”, “11D7-C3”, “13H2-C2”, “13C1-F6”, “1E6-C9”, “10F4-C10”, “18G9-H11”, “12G3-E8”, “5B1-G2”, “16F8-A7”, “11F9-F8”, “8C2-F7”, “20E5-F10” y “3H6-D2”.

SEQ ID NO: 11 muestra la secuencia de aminoácidos de CDR3-L de los anticuerpos denominados “20G6-F3”, “4B4-D7”, “11H3-E5”, “13H2-C2”, “13C1-F6”, “10F4-C10”, “4E7-C9”, “11F3-B9”, “12G3-E8”, “5B1-G2”, “16F8-A7”, “20E5-F10” y “3H6-D2”.

- 30 SEQ ID NO: 12 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada del anticuerpo denominado “4B4-D7”.

SEQ ID NO: 13 muestra la secuencia de aminoácidos de CDR1-H de los anticuerpos denominados “4B4-D7”, “11D7-C3”, “11H3-E5”, “13H2-C2”, “13C1-F6”,

“10F4-C10”, “18G9-H11”, “4E7-C9”, “11F3-B9”, “16F8-A7”, “11F9-F8”, “20B5-F10” y “3H6-D2”.

SEQ ID NO: 14 y 15 muestran la secuencia de aminoácidos de CDR2-H y CDR3-H del anticuerpo denominado “4B4-D7”.

5 SEQ ID NO: 16 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera del anticuerpo denominado “4B4-D7”.

SEQ ID NO: 17 muestra la secuencia de aminoácidos de CDR1-L de los anticuerpos denominados “4B4-D7”, “11H3-E5” y “11F3-B9”.

10 SEQ ID NO: 18 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada del anticuerpo denominado “4E7-C9”.

SEQ ID NO: 19 muestra la secuencia de aminoácidos de CDR2-H de los anticuerpos denominados “4E7-C9”, “18F5-H10”, “20E5-F10” y “3H6-D2”.

SEQ ID NO: 20 muestra la secuencia de aminoácidos de CDR3-H del anticuerpo denominado “4E7-C9”.

15 SEQ ID NO: 21 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera del anticuerpo denominado “4E7-C9”.

SEQ ID NO: 22 muestra la secuencia de aminoácidos de CDR1-H del anticuerpo denominado “4E7-C9”.

20 SEQ ID NO: 23 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada del anticuerpo denominado “18F5-H10”.

SEQ ID NO: 24 muestra la secuencia de aminoácidos de CDR1-H del anticuerpo denominado “18F5-H10”.

SEQ ID NO: 25 muestra la secuencia de aminoácidos de CDR3-H del anticuerpo denominado “18F5-H10”.

25 SEQ ID NO: 26 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera del anticuerpo denominado “18F5-H10”.

SEQ ID NO: 27 muestra la secuencia de aminoácidos de CDR1-L del anticuerpo anti-CD3 denominado “18F5-H10”.

30 SEQ ID NO: 28 muestra la secuencia de aminoácidos de CDR3-L de los anticuerpos anti-CD3 denominados “18F5-H10”, “11D7-C3”, “1E6-C9” y “10E6-G6”.

SEQ ID NO: 29 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada del anticuerpo anti-CD3 denominado “12D2-E5”.

SEQ ID NO: 30 y 31 muestran las secuencias de aminoácidos de CDR1-H y CDR2-H del anticuerpo anti-CD3 denominado “12D2-E5”.

SEQ ID NO: 32 muestra la secuencia de aminoácidos de CDR3-H de los anticuerpos anti-CD3 denominados “12D2-E5” y “3G5-E10”.

SEQ ID NO: 33 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera del anticuerpo anti-CD3 denominado “12D2-E5”.

5 SEQ ID NO: 34 y 35 muestran las secuencias de aminoácidos de CDR1-H y CDR3-H del anticuerpo anti-CD3 denominado “12D2-E5”.

SEQ ID NO: 36 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada del anticuerpo anti-CD3 denominado “11D7-C3”.

10 SEQ ID NO: 37 muestra la secuencia de aminoácidos de CDR2-H de los anticuerpos anti-CD3 denominados “11D7-C3”, “11H3-E5”, “13H2-C2”, “13C1-F6”, “1E6-C9”, “10F4-C10”, “18G9-H11”, “11F3-B9”, “16F8-A7”, “11F9-F8” y “20B5-F10”.

SEQ ID NO: 38 muestra la secuencia de aminoácidos de CDR3-H del anticuerpo anti-CD3 denominado “11D7-C3”.

15 SEQ ID NO: 39 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera del anticuerpo anti-CD3 denominado “11D7-C3”.

SEQ ID NO: 40 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada del anticuerpo anti-CD3 denominado “11H3-E5”.

SEQ ID NO: 41 muestra la secuencia de aminoácidos de CDR3-H del anticuerpo anti-CD3 denominado “11H3-E5”.

20 SEQ ID NO: 42 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera del anticuerpo anti-CD3 denominado “11H3-E5”.

SEQ ID NO: 43 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada del anticuerpo anti-CD3 denominado “13H2-C2”.

25 SEQ ID NO: 44 muestra la secuencia de aminoácidos de CDR3-H del anticuerpo anti-CD3 denominado “13H2-C2”.

SEQ ID NO: 45 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera del anticuerpo anti-CD3 denominado “13H2-C2”.

SEQ ID NO: 46 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada de los anticuerpos anti-CD3 denominados “13C1-F6” y “11F9-F8”.

30 SEQ ID NO: 47 muestra la secuencia de aminoácidos de CDR3-H de los anticuerpos anti-CD3 denominados “13C1-F6”, “10E6-G6” y “11F9-F8”.

SEQ ID NO: 48 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera del anticuerpo anti-CD3 denominado “13H2-C2”.

SEQ ID NO: 49 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada del anticuerpo anti-CD3 denominado "18H11-F10".

SEQ ID NO: 50, 51 y 52 muestran las secuencias de aminoácidos de CDR1-H, CDR2-H y CDR3-H del anticuerpo anti-CD3 denominado "18H11-F10".

5 SEQ ID NO: 53 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera del anticuerpo anti-CD3 denominado "18H11-F10".

SEQ ID NO: 54 y 55 muestran las secuencias de aminoácidos de CDR1-L y CDR3-L del anticuerpo anti-CD3 denominado "18H11-F10".

10 SEQ ID NO: 56 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada del anticuerpo anti-CD3 denominado "1E6-C9".

SEQ ID NO: 57 y 58 muestran las secuencias de aminoácidos de CDR1-H y CDR3-H del anticuerpo anti-CD3 denominado "1E6-C9".

SEQ ID NO: 59 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera del anticuerpo anti-CD3 denominado "1E6-C9".

15 SEQ ID NO: 60 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada del anticuerpo anti-CD3 denominado "10F4-C10".

SEQ ID NO: 61 muestra la secuencia de aminoácidos de CDR3-H del anticuerpo anti-CD3 denominado "10F4-C10".

20 SEQ ID NO: 62 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera del anticuerpo anti-CD3 denominado "10F4-C10".

SEQ ID NO: 63 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada del anticuerpo anti-CD3 denominado "10E6-G6".

SEQ ID NO: 64 y 65 muestran las secuencias de aminoácidos de CDR1-H y CDR2-H del anticuerpo anti-CD3 denominado "10E6-G6".

25 SEQ ID NO: 66 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera del anticuerpo anti-CD3 denominado "10E6-G6".

SEQ ID NO: 67 muestra la secuencia de aminoácidos de CDR1-L del anticuerpo anti-CD3 denominado "10E6-G6".

30 SEQ ID NO: 68 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada del anticuerpo anti-CD3 denominado "18G9-H11".

SEQ ID NO: 69 muestra la secuencia de aminoácidos de CDR3-H del anticuerpo anti-CD3 denominado "18G9-H11".

SEQ ID NO: 70 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera del anticuerpo anti-CD3 denominado "18G9-H11".

SEQ ID NO: 71 muestra la secuencia de aminoácidos de CDR3-L del anticuerpo anti-CD3 denominado "18G9-H11".

SEQ ID NO: 72 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada del anticuerpo anti-CD3 denominado "11F3-B9".

5 SEQ ID NO: 73 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera del anticuerpo anti-CD3 denominado "11F3-B9".

SEQ ID NO: 74 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada del anticuerpo anti-CD3 denominado "12G3-E8".

10 SEQ ID NO: 75, 76 y 77 muestran las secuencias de aminoácidos de CDR1-H, CDR2-H y CDR3-H del anticuerpo anti-CD3 denominado "12G3-E8".

SEQ ID NO: 78 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera del anticuerpo anti-CD3 denominado "12G3-E8".

SEQ ID NO: 79 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada del anticuerpo anti-CD3 denominado "5B1-G2".

15 SEQ ID NO: 80 y 81 muestran las secuencias de aminoácidos de CDR1-H y CDR3-H del anticuerpo anti-CD3 denominado "5B1-G2".

SEQ ID NO: 82 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera del anticuerpo anti-CD3 denominado "5B1-G2".

20 SEQ ID NO: 83 muestra la secuencia de aminoácidos de una parte del dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-CD3 denominado "16F8-A7".

SEQ ID NO: 84 muestra la secuencia de aminoácidos de CDR3-H de los anticuerpos anti-CD3 denominados "16F8-A7" y "11F3-B9".

SEQ ID NO: 85 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera del anticuerpo anti-CD3 denominado "16F8-A7".

25 SEQ ID NO: 86 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína CD3δ humana de longitud completa, incluyendo el péptido señal, según está disponible en la base de datos Uniprot con el número de registro P04234.

SEQ ID NO: 87 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera del anticuerpo anti-CD3 denominado "11F9-F8".

30 SEQ ID NO: 88 muestra la secuencia de aminoácidos de CDR3-L del anticuerpo anti-CD3 denominado "11F9-F8".

SEQ ID NO: 89 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada del anticuerpo anti-CD3 denominado "3G5-E10".

SEQ ID NO: 90 y 91 muestran las secuencias de aminoácidos de CDR1-H y CDR2-H del anticuerpo anti-CD3 denominado "3G5-E10".

SEQ ID NO: 92 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera del anticuerpo anti-CD3 denominado "3G5-E10".

5 SEQ ID NO: 93 y 94 muestran las secuencias de CDR1-L y CDR3-L del anticuerpo anti-CD3 denominado "3G5-E10".

SEQ ID NO: 95 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada del anticuerpo anti-CD3 denominado "9D7-F3".

10 SEQ ID NO: 96, 97 y 98 muestran las secuencias de aminoácidos de CDR1-H, CDR2-H y CDR3-H del anticuerpo anti-CD3 denominado "9D7-F3".

SEQ ID NO: 99 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera del anticuerpo anti-CD3 denominado "9D7-F3".

SEQ ID NO: 100 y 101 muestran las secuencias de aminoácidos de CDR1-L y CDR3-L del anticuerpo anti-CD3 denominado "9D7-F3" y "6C9-C9".

15 SEQ ID NO: 102 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada del anticuerpo anti-CD3 denominado "8C2-F7".

SEQ ID NO: 103, 104 y 105 muestran las secuencias de aminoácidos de CDR1-H, CDR2-H y CDR3-H del anticuerpo anti-CD3 denominado "8C2-F7".

20 SEQ ID NO: 106 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera del anticuerpo anti-CD3 denominado "8C2-F7".

SEQ ID NO: 107 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada del anticuerpo anti-CD3 denominado "20E5-F10".

SEQ ID NO: 108 muestra las secuencias de aminoácidos de CDR3-H del anticuerpo anti-CD3 denominado "20E5-F10".

25 SEQ ID NO: 109 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera del anticuerpo anti-CD3 denominado "20E5-F10".

SEQ ID NO: 110 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada del anticuerpo anti-CD3 denominado "20B5-F10".

30 SEQ ID NO: 111 muestra la secuencia de aminoácidos de CDR3-H del anticuerpo anti-CD3 denominado "20B5-F10".

SEQ ID NO: 112 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera del anticuerpo anti-CD3 denominado "20B5-F10".

SEQ ID NO: 113 y 114 muestran las secuencias de aminoácidos de CDR1-L y CDR3-L del anticuerpo anti-CD3 denominado "20B5-F10".

SEQ ID NO: 115 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada del anticuerpo anti-CD3 denominado "6C9-C9".

SEQ ID NO: 116, 117 y 118 muestran las secuencias de aminoácidos de CDR1-H, CDR2-H y CDR3-H del anticuerpo anti-CD3 denominado "6C9-C9".

5 SEQ ID NO: 119 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera del anticuerpo anti-CD3 denominado "6C9-C9".

SEQ ID NO: 120 muestra la secuencia de aminoácidos de CDR3-L del anticuerpo anti-CD3 denominado "6C9-C9".

10 SEQ ID NO: 121 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada del anticuerpo anti-CD3 denominado "3E8-G1".

SEQ ID NO: 122, 123 y 124 muestran las secuencias de aminoácidos de CDR1-H, CDR2-H y CDR3-H del anticuerpo anti-CD3 denominado "3E8-G1".

SEQ ID NO: 125 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera del anticuerpo anti-CD3 denominado "3E8-G1".

15 SEQ ID NO: 126 y 127 muestran las secuencias de aminoácidos de CDR1-L y CDR3-L del anticuerpo anti-CD3 denominado "3E8-G1".

SEQ ID NO: 128 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada del anticuerpo anti-CD3 denominado "3H6-D2".

20 SEQ ID NO: 129 muestra la secuencia de aminoácidos de CDR3-H del anticuerpo anti-CD3 denominado "3H6-D2".

SEQ ID NO: 130 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera del anticuerpo anti-CD3 denominado "3H6-D2".

SEQ ID NO: 131 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada del anticuerpo anti-CD3 denominado "8H2".

25 SEQ ID NO: 132 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera del anticuerpo anti-CD3 denominado "8H2".

SEQ ID NO: 133 y 134 muestran las secuencias de aminoácidos de CDR1-L y CDR3-L del anticuerpo anti-CD3 denominado "8H2".

30 SEQ ID NO: 135 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de VH, VH1a, del anticuerpo anti-CD3 humanizado "20G6".

SEQ ID NO: 136 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de VH, VH1b, del anticuerpo anti-CD3 humanizado "20G6".

SEQ ID NO: 137 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de VH, VH1c, del anticuerpo anti-CD3 humanizado "20G6".

SEQ ID NO: 138 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de VH, VH1d, del anticuerpo anti-CD3 humanizado "20G6".

SEQ ID NO: 139 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de VL, VL1a, del anticuerpo anti-CD3 humanizado "20G6".

5 SEQ ID NO: 140 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de VL, VL1b, del anticuerpo anti-CD3 humanizado "20G6".

SEQ ID NO: 141 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de VL, VL1c, del anticuerpo anti-CD3 humanizado "20G6".

10 SEQ ID NO: 142 muestra la secuencia de aminoácidos de la CDR1-L de la variante VL1c del anticuerpo anti-CD3 humanizado "20G6".

SEQ ID NO: 143 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de VL, VL1d, del anticuerpo anti-CD3 humanizado "20G6".

SEQ ID NO: 144 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de VH, VH2a, del anticuerpo anti-CD3 humanizado "20G6".

15 SEQ ID NO: 145 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de VH, VH2b, del anticuerpo anti-CD3 humanizado "20G6".

SEQ ID NO: 146 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de VH, VH2c, del anticuerpo anti-CD3 humanizado "20G6".

20 SEQ ID NO: 147 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de VH, VH2d, del anticuerpo anti-CD3 humanizado "20G6".

SEQ ID NO: 148 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de VL, VL2a, del anticuerpo anti-CD3 humanizado "20G6".

SEQ ID NO: 149 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de VL, VL2b, del anticuerpo anti-CD3 humanizado "20G6".

25 SEQ ID NO: 150 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de VL, VL2c, del anticuerpo anti-CD3 humanizado "20G6".

SEQ ID NO: 151 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de VL, VL2d, del anticuerpo anti-CD3 humanizado "20G6".

30 SEQ ID NO: 152 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de VH, VH3a, del anticuerpo anti-CD3 humanizado "20G6".

SEQ ID NO: 153 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de VH, VH3b, del anticuerpo anti-CD3 humanizado "20G6".

SEQ ID NO: 154 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de VL, VL3a, del anticuerpo anti-CD3 humanizado "20G6".

SEQ ID NO: 155 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de VL, VL3b, del anticuerpo anti-CD3 humanizado "20G6".

SEQ ID NO: 156 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de VL, VL3c, del anticuerpo anti-CD3 humanizado "20G6".

5 SEQ ID NO: 157 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de VL, VL3d, del anticuerpo anti-CD3 humanizado "20G6".

SEQ ID NO: 158 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de VL, VL1A, del anticuerpo anti-CD3 humanizado "4B4".

10 SEQ ID NO: 159 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de VL, VL1B, del anticuerpo anti-CD3 humanizado "4B4".

SEQ ID NO: 160 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de VL, VL2A, del anticuerpo anti-CD3 humanizado "4B4".

SEQ ID NO: 161 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de VL, VL2B, del anticuerpo anti-CD3 humanizado "4B4".

15 SEQ ID NO: 162 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de VL, VL1Cmodif1, del anticuerpo anti-CD3 humanizado "4B4".

SEQ ID NO: 163 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de VL, VL1Cmodif2, del anticuerpo anti-CD3 humanizado "4B4".

20 SEQ ID NO: 164 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de VL, VL1Cmodif3, del anticuerpo anti-CD3 humanizado "4B4".

SEQ ID NO: 165 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de VL, VL1Amodif1, del anticuerpo anti-CD3 humanizado "4B4".

SEQ ID NO: 166 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de VL, VL1Amodif2, del anticuerpo anti-CD3 humanizado "4B4".

25 SEQ ID NO: 167 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de VL, VL1Amodif3, del anticuerpo anti-CD3 humanizado "4B4".

SEQ ID NO: 168 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de VL, VL2C, del anticuerpo anti-CD3 humanizado "4B4".

30 SEQ ID NO: 169 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de VL, VL2D, del anticuerpo anti-CD3 humanizado "4B4".

SEQ ID NO: 170 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de VL, VL2F, del anticuerpo anti-CD3 humanizado "4B4".

SEQ ID NO: 171 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de VH, VH1A, del anticuerpo anti-CD3 humanizado "4B4".

SEQ ID NO: 172 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de VH, VH1B, del anticuerpo anti-CD3 humanizado “4B4”.

SEQ ID NO: 173 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de VH, VH2A, del anticuerpo anti-CD3 humanizado “4B4”.

5 SEQ ID NO: 174 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de VH, VH2B, del anticuerpo anti-CD3 humanizado “4B4”.

SEQ ID NO: 175 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de VH, VH6Bmodif1, del anticuerpo anti-CD3 humanizado “4B4”.

10 SEQ ID NO: 176 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de VH, VH6Bmodif2, del anticuerpo anti-CD3 humanizado “4B4”.

SEQ ID NO: 177 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de VH, VH6Amodif1, del anticuerpo anti-CD3 humanizado “4B4”.

SEQ ID NO: 178 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de VH, VH6Amodif2, del anticuerpo anti-CD3 humanizado “4B4”.

15 SEQ ID NO: 179 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de VH, VH6Amodif3, del anticuerpo anti-CD3 humanizado “4B4”.

SEQ ID NO: 180 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de VH, VH6C, del anticuerpo anti-CD3 humanizado “4B4”.

20 SEQ ID NO: 181 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de VH, VH6D, del anticuerpo anti-CD3 humanizado “4B4”.

SEQ ID NO: 182 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de VL, D7-VK3mut, del anticuerpo anti-CD3 humanizado “4B4”.

SEQ ID NO: 183 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de VH, D7-VH1mut, del anticuerpo anti-CD3 humanizado “4B4”.

25 SEQ ID NO: 184 muestra la secuencia de aminoácidos de la CDR1-L de las variantes VL1B, VL2B, VL1Cmodif3 y VL2F del anticuerpo anti-CD3 humanizado “4B4”.

SEQ ID NO: 185 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína CD3γ humana de longitud completa, incluyendo el péptido señal, según está disponible en la base de datos Uniprot con el número de registro P09693.

30 SEQ ID NO: 186 muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del Fab del anticuerpo anti-CD3 denominado “20G6-F3”.

SEQ ID NO: 187 muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del Fab del anticuerpo anti-CD3 denominado “20G6-F3”.

SEQ ID NO: 188 muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del Fab del anticuerpo anti-CD3 denominado “4E7-C9”.

SEQ ID NO: 189 muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del Fab del anticuerpo anti-CD3 denominado “4E7-C9”.

5 SEQ ID NO: 190 muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del Fab del anticuerpo anti-CD3 denominado “4B4-D7”.

SEQ ID NO: 191 muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del Fab del anticuerpo anti-CD3 denominado “4B4-D7”.

10 SEQ ID NO: 192 muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del Fab del anticuerpo anti-CD3 denominado “18F5-H10”.

SEQ ID NO: 193 muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del Fab del anticuerpo anti-CD3 denominado “18F5-H10”.

15 SEQ ID NO: 194 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína CD123 humana de longitud completa, incluyendo el péptido señal, según está disponible en la base de datos NCBI con NP_002174.1 y de la base de datos Uniprot con P26951.

SEQ ID NO: 195 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína CD123 de *Macaca fascicularis* de longitud completa, incluyendo el péptido señal, según está disponible en la base de datos GenBank con EHH61867.1 y en la base de datos Uniprot con G8F3K3.

20 SEQ ID NO: 196 muestra la secuencia de aminoácidos de la fusión CD123 humana madura Fc etiquetada con Strep-II que comprende los aminoácidos 22 a 305 de la proteína CD123 humana de longitud completa (SEQ ID NO: 194).

25 SEQ ID NO: 197 muestra la secuencia de aminoácidos de la fusión CD123 de *Macaca fascicularis* madura Fc etiquetada con Strep-II que comprende los aminoácidos 22 a 305 de la proteína CD123 de *Macaca fascicularis* de longitud completa (SEQ ID NO: 195).

SEQ ID NO: 198 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada del anticuerpo anti-CD123 denominado “1E1-G5”.

30 SEQ ID NO: 199 muestra las secuencias de aminoácidos de CDR1-H del anticuerpo anti-CD123 denominado “1E1-G5” y “8B11-B7”.

SEQ ID NO: 200 muestra las secuencias de aminoácidos de CDR2-H del anticuerpo anti-CD123 denominado “1E1-G5” y “6D6-B8”.

SEQ ID NO: 201 muestra las secuencias de aminoácidos de CDR3-H del anticuerpo anti-CD123 denominado “1E1-G5”, “8B11-B7” y “9F6-G3”.

SEQ ID NO: 202 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera del anticuerpo anti-CD123 denominado "1E1-G5".

SEQ ID NO: 203 y 204 muestran las secuencias de aminoácidos de CDR1-L y CDR3-L del anticuerpo anti-CD123 denominado "1E1-G5".

5 SEQ ID NO: 205 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada del anticuerpo anti-CD123 denominado "2B8-F3".

SEQ ID NO: 206, 207 y 208 muestran las secuencias de aminoácidos de CDR1-H, CDR2-H y CDR3-H del anticuerpo anti-CD123 denominado "2B8-F3".

10 SEQ ID NO: 209 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera del anticuerpo anti-CD123 denominado "2B8-F3".

SEQ ID NO: 210 y 211 muestran las secuencias de aminoácidos de CDR1-L y CDR3-L del anticuerpo anti-CD123 denominado "2B8-F3".

SEQ ID NO: 212 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada del anticuerpo anti-CD123 denominado "2F8-D6".

15 SEQ ID NO: 213, 214 y 215 muestran las secuencias de aminoácidos de CDR1-H, CDR2-H y CDR3-H del anticuerpo anti-CD123 denominado "2F8-D6".

SEQ ID NO: 216 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera del anticuerpo anti-CD123 denominado "2F8-D6".

20 SEQ ID NO: 217 y 218 muestran las secuencias de aminoácidos de CDR1-L y CDR3-L del anticuerpo anti-CD123 denominado "2F8-D6".

SEQ ID NO: 219 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada del anticuerpo anti-CD123 denominado "3B10-E6".

SEQ ID NO: 220, 221 y 222 muestran las secuencias de aminoácidos de CDR1-H, CDR2-H y CDR3-H del anticuerpo anti-CD123 denominado "3B10-E6".

25 SEQ ID NO: 223 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera del anticuerpo anti-CD123 denominado "3B10-E6".

SEQ ID NO: 224 y 225 muestran las secuencias de aminoácidos de CDR1-L y CDR3-L del anticuerpo anti-CD123 denominado "3B10-E6".

30 SEQ ID NO: 226 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada del anticuerpo anti-CD123 denominado "3E3-D3".

SEQ ID NO: 227, 228 y 229 muestran las secuencias de aminoácidos de CDR1-H, CDR2-H y CDR3-H del anticuerpo anti-CD123 denominado "3E3-D3".

SEQ ID NO: 230 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera del anticuerpo anti-CD123 denominado "3E3-D3".

SEQ ID NO: 231 y 232 muestran las secuencias de aminoácidos de CDR1-L y CDR3-L del anticuerpo anti-CD123 denominado "3E3-D3".

SEQ ID NO: 233 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada del anticuerpo anti-CD123 denominado "5A5-B4".

5 SEQ ID NO: 234, 235 y 236 muestran las secuencias de aminoácidos de CDR1-H, CDR2-H y CDR3-H del anticuerpo anti-CD123 denominado "5A5-B4".

SEQ ID NO: 237 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera del anticuerpo anti-CD123 denominado "5A5-B4".

10 SEQ ID NO: 238 y 239 muestran las secuencias de aminoácidos de CDR1-L y CDR3-L del anticuerpo anti-CD123 denominado "5A5-B4".

SEQ ID NO: 240 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada del anticuerpo anti-CD123 denominado "6B10-E4".

SEQ ID NO: 241, 242 y 243 muestran las secuencias de aminoácidos de CDR1-H, CDR2-H y CDR3-H del anticuerpo anti-CD123 denominado "6B10-E4".

15 SEQ ID NO: 244 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera del anticuerpo anti-CD123 denominado "6B10-E4".

SEQ ID NO: 245 y 246 muestran las secuencias de aminoácidos de CDR1-L y CDR3-L del anticuerpo anti-CD123 denominado "6B10-E4".

20 SEQ ID NO: 247 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada del anticuerpo anti-CD123 denominado "6C10-C4".

SEQ ID NO: 248, 249 y 250 muestran las secuencias de aminoácidos de CDR1-H, CDR2-H y CDR3-H del anticuerpo anti-CD123 denominado "6C10-C4".

SEQ ID NO: 251 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera del anticuerpo anti-CD123 denominado "6C10-C4" y "9B8-G6".

25 SEQ ID NO: 252 muestra la secuencia de aminoácidos de CDR1-L del anticuerpo anti-CD123 denominado "6C10-C4" y "9B8-G6".

SEQ ID NO: 253 muestra la secuencia de aminoácidos de CDR3-L de los anticuerpos anti-CD123 denominados "6C10-C4", "9B8-G6" y "9D7-G3".

30 SEQ ID NO: 254 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada del anticuerpo anti-CD123 denominado "6D6-B8".

SEQ ID NO: 255 muestra la secuencia de aminoácidos de CDR1-H del anticuerpo anti-CD123 denominado "6D6-B8".

SEQ ID NO: 256 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera del anticuerpo anti-CD123 denominado "6D6-B8".

SEQ ID NO: 257 y 258 muestran las secuencias de aminoácidos de CDR1-L y CDR3-L del anticuerpo anti-CD123 denominado "6D6-B8".

SEQ ID NO: 259 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada del anticuerpo anti-CD123 denominado "8B11-B7".

5 SEQ ID NO: 260 muestra la secuencia de aminoácidos de CDR2-H del anticuerpo anti-CD123 denominado "8B11-B7".

SEQ ID NO: 261 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera del anticuerpo anti-CD123 denominado "8B11-B7".

10 SEQ ID NO: 262 y 263 muestran las secuencias de aminoácidos de CDR1-L y CDR3-L del anticuerpo anti-CD123 denominado "8B11-B7".

SEQ ID NO: 264 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada del anticuerpo anti-CD123 denominado "9B8-G6".

SEQ ID NO: , 265 y 266 muestran las secuencias de aminoácidos de CDR1-H y CDR2-H de los anticuerpos anti-CD123 denominados "9B8-G6" y "9D7-C8".

15 SEQ ID NO: 267 muestra las secuencias de aminoácidos de CDR3-H del anticuerpo anti-CD123 denominado "9B8-G6".

SEQ ID NO: 268 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada del anticuerpo anti-CD123 denominado "9D7-C8".

20 SEQ ID NO: 269 muestra las secuencias de aminoácidos de CDR3-H del anticuerpo anti-CD123 denominado "9D7-C8".

SEQ ID NO: 270 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera del anticuerpo anti-CD123 denominado "9D7-C8".

SEQ ID NO: 271 muestra las secuencias de aminoácidos de CDR1-L del anticuerpo anti-CD123 denominado "9D7-C8".

25 SEQ ID NO: 272 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada del anticuerpo anti-CD123 denominado "9F6-G3".

SEQ ID NO: 273 y 274 muestran las secuencias de aminoácidos de CDR1-H y CDR2-H del anticuerpo anti-CD123 denominado "9F6-G3".

30 SEQ ID NO: 275 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera del anticuerpo anti-CD123 denominado "9F6-G3".

SEQ ID NO: 276 muestra la secuencia de aminoácidos de CDR1-L del anticuerpo anti-CD123 denominado "9F6-G3".

SEQ ID NO: 277 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de VH, VH_G45A, del anticuerpo anti-CD123 "3E3".

SEQ ID NO: 278 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de VH, VHmDG, del anticuerpo anti-CD123 “3E3”.

SEQ ID NO: 279 muestra la secuencia de aminoácidos de CDR2-H de la variante VHmDG del anticuerpo anti-CD123 “3E3” y CDR2-H de la variante VH1Fm2DG del anticuerpo anti-CD123 humanizado “3E3”.

SEQ ID NO: 280 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de VH, VH1A, del anticuerpo anti-CD123 humanizado “3E3”.

SEQ ID NO: 281 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de VH, VH1B, del anticuerpo anti-CD123 humanizado “3E3”.

10 SEQ ID NO: 282 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de VH, VH1C, del anticuerpo anti-CD123 humanizado “3E3”.

SEQ ID NO: 283 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de VH, VH1D, del anticuerpo anti-CD123 humanizado “3E3”.

15 SEQ ID NO: 284 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de VH, VH1E, del anticuerpo anti-CD123 humanizado “3E3”.

SEQ ID NO: 285 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de VH, VH1F, del anticuerpo anti-CD123 humanizado “3E3”.

SEQ ID NO: 286 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de VH, VH1G, del anticuerpo anti-CD123 humanizado “3E3”.

20 SEQ ID NO: 287 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de VH, VH1Fm1, del anticuerpo anti-CD123 humanizado “3E3”.

SEQ ID NO: 288 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de VH, VH1Fm2, del anticuerpo anti-CD123 humanizado “3E3”.

25 SEQ ID NO: 289 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de VH, VH1Fm2DG, del anticuerpo anti-CD123 humanizado “3E3”.

SEQ ID NO: 290 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de VH, VH1Dm1, del anticuerpo anti-CD123 humanizado “3E3”.

SEQ ID NO: 291 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de VH, VH1Em1, del anticuerpo anti-CD123 humanizado “3E3”.

30 SEQ ID NO: 292 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de VL, VL1A, del anticuerpo anti-CD123 humanizado “3E3”.

SEQ ID NO: 293 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de VL, VL1B, del anticuerpo anti-CD123 humanizado “3E3”.

SEQ ID NO: 294 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de VL, VL1C, del anticuerpo anti-CD123 humanizado “3E3”.

SEQ ID NO: 295 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de VL, VL1D, del anticuerpo anti-CD123 humanizado “3E3”.

5 SEQ ID NO: 296 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de VL, VL1E, del anticuerpo anti-CD123 humanizado “3E3”.

SEQ ID NO: 297 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de VL, VL1F, del anticuerpo anti-CD123 humanizado “3E3”.

10 SEQ ID NO: 298 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de VL, VL1G, del anticuerpo anti-CD123 humanizado “3E3”.

SEQ ID NO: 299 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de VL, VL1Fm1, del anticuerpo anti-CD123 humanizado “3E3”.

SEQ ID NO: 300 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de VL, VL1Fm2, del anticuerpo anti-CD123 humanizado “3E3”.

15 SEQ ID NO: 301 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de VH, VH2A, del anticuerpo anti-CD123 humanizado “3E3”.

SEQ ID NO: 302 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de VH, VH3A, del anticuerpo anti-CD123 humanizado “3E3”.

20 SEQ ID NO: 303 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de VL, VL2A, del anticuerpo anti-CD123 humanizado “3E3”.

SEQ ID NO: 304 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de VL, VL2Am1, del anticuerpo anti-CD123 humanizado “3E3”.

SEQ ID NO: 305 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de VL, VL2Am2, del anticuerpo anti-CD123 humanizado “3E3”.

25 SEQ ID NO: 306 muestra la secuencia de aminoácidos del polipéptido según la fórmula I de la proteína de unión semejante a anticuerpo denominada CODV-Fab “7G3x20G6”.

30 SEQ ID NO: 307 muestra la secuencia de aminoácidos del conector L1 de las proteínas de unión semejantes a anticuerpo denominadas CODV-Fab “7G3x20G6”, “7G3x4E7”, “7G3x4B4”, “7G3x18F5”, “hz20G6x7G3”, “7G3xhz4B4”, “hz4B4x3E3” y CODV-Fab “hz20G6x7G3-TL4”

SEQ ID NO: 308 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera de 7G3 que representa el dominio V_{D1} o V_{D2} de las proteínas de unión

semejantes a anticuerpo denominadas CODV-Fab “7G3x20G6”, “7G3x4E7”, “7G3x4B4”, “7G3x18F5”, “hz20G6x7G3”, “7G3xhz4B4” y CODV-Fab “hz20G6x7G3-TL4”.

SEQ ID NO: 309 muestra la secuencia de aminoácidos del conector L2 de las proteínas de unión semejantes a anticuerpo denominadas CODV-Fab “7G3x20G6”, “7G3x4E7”, “7G3x4B4”, “7G3x18F5”, “hz20G6x7G3”, “7G3xhz4B4”, “hz4B4x3E3” y CODV-Fab “hz20G6x7G3-TL4”.

SEQ ID NO: 310 muestra la secuencia de aminoácidos CL de las proteínas de unión semejantes a anticuerpo denominadas CODV-Fab “7G3x20G6”, “7G3x4E7”, “7G3x4B4”, “7G3x18F5”, “hz20G6x7G3”, “7G3xhz4B4” y “hz4B4x3E3”.

SEQ ID NO: 311 muestra la secuencia de aminoácidos del polipéptido según la fórmula II de la proteína de unión semejante a anticuerpo denominada CODV-Fab “7G3x20G6”.

SEQ ID NO: 312 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada de 7G3 que representa en la presente memoria el dominio V_{H1} o V_{H2} de las proteínas de unión semejantes a anticuerpo denominadas CODV-Fab “7G3x20G6”, “7G3x4E7”, “7G3x4B4”, “7G3x18F5”, “hz20G6x7G3”, “7G3xhz4B4” y CODV-Fab “hz20G6x7G3-TL4”.

SEQ ID NO: 313 muestra la secuencia de aminoácidos C_{H1} de las proteínas de unión semejantes a anticuerpo denominadas CODV-Fab “7G3x20G6”, “7G3x4E7”, “7G3x4B4”, “7G3x18F5”, “hz20G6x7G3”, “7G3xhz4B4”, “hz4B4x3E3”.

SEQ ID NO: 314 muestra la secuencia de aminoácidos del polipéptido según la fórmula I de la proteína de unión semejante a anticuerpo denominada CODV-Fab “7G3 x 4E7”.

SEQ ID NO: 315 muestra la secuencia de aminoácidos del polipéptido según la fórmula II de la proteína de unión semejante a anticuerpo denominada CODV-Fab “7G3x4E7”.

SEQ ID NO: 316 muestra la secuencia de aminoácidos del polipéptido según la fórmula I de la proteína de unión semejante a anticuerpo denominada CODV-Fab “7G3x4B4”.

SEQ ID NO: 317 muestra la secuencia de aminoácidos del polipéptido según la fórmula II de la proteína de unión semejante a anticuerpo denominada CODV-Fab “7G3x4B4”.

SEQ ID NO: 318 muestra la secuencia de aminoácidos del polipéptido según la fórmula I de la proteína de unión semejante a anticuerpo denominada CODV-Fab “7G3x18F5”.

5 SEQ ID NO: 319 muestra la secuencia de aminoácidos del polipéptido según la fórmula II de la proteína de unión semejante a anticuerpo denominada CODV-Fab “7G3x18F5”.

SEQ ID NO: 320 muestra la secuencia de aminoácidos del polipéptido según la fórmula I de la proteína de unión semejante a anticuerpo denominada CODV-Fab “hz20G6x7G3” .

10 SEQ ID NO: 321 muestra la secuencia de aminoácidos del polipéptido según la fórmula II de la proteína de unión semejante a anticuerpo denominada CODV-Fab “hz20G6x7G3” .

SEQ ID NO: 322 muestra la secuencia de aminoácidos del polipéptido según la fórmula I de la proteína de unión semejante a anticuerpo denominada CODV-Fab 15 7G3xhz4B4”.

SEQ ID NO: 323 muestra la secuencia de aminoácidos del polipéptido según la fórmula II de la proteína de unión semejante a anticuerpo denominada CODV-Fab “7G3xhz4B4” .

SEQ ID NO: 324 muestra la secuencia de aminoácidos del polipéptido según la 20 fórmula I de la proteína de unión semejante a anticuerpo denominada CODV-Fab “hz4B4x3E3”.

SEQ ID NO: 325 muestra la secuencia de aminoácidos del polipéptido según la fórmula II de la proteína de unión semejante a anticuerpo denominada CODV-Fab “hz4B4x3E3”.

25 SEQ ID NO: 326 muestra la secuencia de aminoácidos del polipéptido según la fórmula I de la proteína de unión semejante a anticuerpo denominada CODV-Fab “hz20G6x7G3 TL4”.

SEQ ID NO: 327 muestra la secuencia de aminoácidos F_{c2} de la proteína de unión semejante a anticuerpo denominada CODV-Fab “hz20G6x7G3-TL4”.

30 SEQ ID NO: 328 muestra la secuencia de aminoácidos del polipéptido según la fórmula III de la proteína de unión semejante a anticuerpo denominada CODV-Fab “hz20G6x7G3-TL4”.

SEQ ID NO: 329 muestra la secuencia de aminoácidos CH1 de la proteína de unión semejante a anticuerpo denominada CODV-Fab “hz20G6x7G3-TL4”.

SEQ ID NO: 330 muestra la secuencia de aminoácidos F_c de la proteína de unión semejante a anticuerpo denominada CODV-Fab "hz20G6x7G3-TL4".

SEQ ID NO: 331 muestra una secuencia consenso para CDR1-H de los anticuerpos anti-CD3 denominados "20G6-F3", "4B4-D7", "4E7-C9", "18F5-H10", "11D7-C3", "11H3-E5", "13H2-C2", "13C1-F6", "1E6-C9", "10F4-C10", "10E6-G6", "18G9-H11", "11F3-B9", "12G3-E8", "5B1-G2", "16F8-A7", "11F9-F8", "20E5-F10", "20B5-F10", "3H6-D2" basada en el alineamiento de secuencias.

SEQ ID NO: 332 muestra una secuencia consenso para CDR2-H de los anticuerpos anti-CD3 denominados "20G6-F3", "4B4-D7", "4E7-C9", "18F5-H10", "11D7-C3", "11H3-E5", "13H2-C2", "13C1-F6", "1E6-C9", "10F4-C10", "10E6-G6", "18G9-H11", "11F3-B9", "12G3-E8", "5B1-G2", "16F8-A7", "11F9-F8", "20E5-F10", "20B5-F10", "3H6-D2" basada en el alineamiento de secuencias.

SEQ ID NO:333 muestra una secuencia consenso para CDR3-H de los anticuerpos anti-CD3 denominados "20G6-F3", "4B4-D7", "4E7-C9", "18F5-H10", "11D7-C3", "11H3-E5", "13H2-C2", "13C1-F6", "1E6-C9", "10F4-C10", "10E6-G6", "18G9-H11", "11F3-B9", "12G3-E8", "5B1-G2", "16F8-A7", "11F9-F8", "20E5-F10", "20B5-F10", "3H6-D2" basada en el alineamiento de secuencias.

SEQ ID NO: 334 muestra una secuencia consenso para CDR1-L de los anticuerpos anti-CD3 denominados "20G6-F3", "4B4-D7", "4E7-C9", "18F5-H10", "11D7-C3", "11H3-E5", "13H2-C2", "13C1-F6", "1E6-C9", "10F4-C10", "10E6-G6", "18G9-H11", "11F3-B9", "12G3-E8", "5B1-G2", "16F8-A7", "11F9-F8", "20E5-F10", "20B5-F10", "3H6-D2" basada en el alineamiento de secuencias.

SEQ ID NO:335 muestra una secuencia consenso para CDR3-L de los anticuerpos anti-CD3 denominados "20G6-F3", "4B4-D7", "4E7-C9", "18F5-H10", "11D7-C3", "11H3-E5", "13H2-C2", "13C1-F6", "1E6-C9", "10F4-C10", "10E6-G6", "18G9-H11", "11F3-B9", "12G3-E8", "5B1-G2", "16F8-A7", "11F9-F8", "20E5-F10", "20B5-F10", "3H6-D2" basada en el alineamiento de secuencias.

SEQ ID NO: 336 muestra una secuencia consenso para CDR1-H de los anticuerpos anti-CD123 denominados "1E1-G5", "6D6-B8", "8B11-B7", "9F6-G3" basada en el alineamiento de secuencias.

SEQ ID NO: 337 muestra una secuencia consenso para CDR2-H de los anticuerpos anti-CD123 denominados "1E1-G5", "6D6-B8", "8B11-B7", "9F6-G3" basada en el alineamiento de secuencias.

SEQ ID NO: 338 muestra una secuencia consenso para CDR1-L de los

anticuerpos anti-CD123 denominados “1E1-G5”, “6D6-B8”, “8B11-B7”, “9F6-G3” basada en el alineamiento de secuencias.

5 SEQ ID NO: 339 muestra una secuencia consenso para CDR3-L de los anticuerpos anti-CD123 denominados “1E1-G5”, “6D6-B8”, “8B11-B7”, “9F6-G3” basada en el alineamiento de secuencias.

SEQ ID NO: 340 muestra una secuencia consenso para CDR1-H de los anticuerpos anti-CD123 denominados “6C10-C4”, “9B8-G6”, “9D7-C8” anti-CD123 basada en el alineamiento de secuencias.

10 SEQ ID NO: 341 muestra una secuencia consenso para CDR2-H de los anticuerpos anti-CD123 denominados “1E1-G5”, “6D6-B8”, “8B11-B7”, “9F6-G3” basada en el alineamiento de secuencias.

SEQ ID NO: 342 muestra una secuencia consenso para CDR3-H de los anticuerpos anti-CD123 denominados “1E1-G5”, “6D6-B8”, “8B11-B7”, “9F6-G3” basada en el alineamiento de secuencias.

15 SEQ ID NO: 343 muestra una secuencia consenso para CDR1-L de los anticuerpos anti-CD123 “1E1-G5”, “6D6-B8”, “8B11-B7”, “9F6-G3” basada en el alineamiento de secuencias.

SEQ ID NO: 344 muestra la secuencia de aminoácidos de una secuencia conectora (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser).

20 SEQ ID NO: 345 muestra la secuencia de aminoácidos de una secuencia conectora (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser).

SEQ ID NO: 346 muestra la secuencia de aminoácidos de una secuencia conectora (Thr-Val-Ala-Ala-Pro).

25 SEQ ID NO: 347 muestra la secuencia de aminoácidos de una secuencia conectora (Gln-Pro-Lys-Ala-Ala).

SEQ ID NO: 348 muestra la secuencia de aminoácidos de una secuencia conectora (Gln-Arg-Ile-Glu-Gly).

SEQ ID NO: 349 muestra la secuencia de aminoácidos de una secuencia conectora (Ala-Ser-Thr-Lys-Gly-Pro-Ser).

30 SEQ ID NO: 350 muestra la secuencia de aminoácidos de una secuencia conectora (Ala-Ser-Thr-Lys-Gly-Pro-Ser).

SEQ ID NO: 351 muestra la secuencia de aminoácidos de una secuencia conectora (His-Ile-Asp-Ser-Pro-Asn-Lys).

SEQ ID NO: 352 muestra la secuencia de aminoácidos de una secuencia conectora y etiqueta His añadida en el C-terminal a polipéptido según la fórmula II de las proteínas de unión semejantes a anticuerpo denominadas CODV-Fab “7G3x20G6”, “7G3x4E7”, “7G3x4B4”, “7G3x18F5”, “hz20G6x7G3”, “7G3xhz4B4” y “hz4B4x3E3”
5 correspondiente a una secuencia bisagra y una etiqueta His usada, por ejemplo, para la purificación.

SEQ ID NO: 353 muestra la secuencia de aminoácidos de CDR2-H de una variante del anticuerpo anti-CD123 denominado “3E3”.

10 SEQ ID NO: 354 muestra la secuencia de aminoácidos de una secuencia conectora (Gly-Gly-Gly-Ser).

SEQ ID NO: 355 muestra la secuencia de aminoácidos de una secuencia conectora (Ser-Gly-Gly-Gly-Ser).

SEQ ID NO: 356 muestra la secuencia de aminoácidos de una secuencia conectora (Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Ser).

15 SEQ ID NO: 357 muestra la secuencia de aminoácidos de una secuencia conectora (Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Ser).

SEQ ID NO: 358 muestra la secuencia de aminoácidos de una secuencia conectora (Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser).

20 SEQ ID NO: 359 muestra la secuencia de aminoácidos de una secuencia conectora (Lys-Thr-His-Thr).

SEQ ID NO: 360 muestra la secuencia de aminoácidos de una secuencia conectora (Lys-Thr-His-Thr-Ser).

SEQ ID NO: 361 muestra la secuencia de aminoácidos de una secuencia conectora (Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser).

25 SEQ ID NO: 362 muestra la secuencia de aminoácidos de una secuencia conectora (Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro).

SEQ ID NO: 363 muestra la secuencia de aminoácidos de una secuencia conectora (Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro).

30 SEQ ID NO: 364 muestra la secuencia de aminoácidos de una secuencia conectora (Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro).

SEQ ID NO: 365 muestra la secuencia de aminoácidos de una secuencia conectora (Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser)

SEQ ID NO: 366 muestra la secuencia de aminoácidos de una secuencia conectora (Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser).

SEQ ID NO: 367 muestra la secuencia de aminoácidos de una secuencia conectora (Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro)

SEQ ID NO: 368 muestra la secuencia de aminoácidos de una secuencia conectora (Glu-Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro)

5 SEQ ID NO: 369 muestra la secuencia de aminoácidos de una secuencia conectora (Glu-Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro-Gly).

SEQ ID NO: 370 muestra la secuencia de aminoácidos de una secuencia conectora (Gly-Glu-Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro-Gly).

10 SEQ ID NO: 371 muestra la secuencia de aminoácidos de una secuencia conectora (Gly-Glu-Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro-Gly-Gly).

SEQ ID NO: 372 muestra la secuencia de aminoácidos de una secuencia conectora (Gly-Gly-Glu-Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro-Gly-Gly)

15 SEQ ID NO: 373 muestra la secuencia de aminoácidos de una secuencia conectora (Gly-Gly-Glu-Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro-Gly-Gly-Gly).

SEQ ID NO: 374 muestra la secuencia de aminoácidos de una secuencia conectora (Gly-Gly-Gly-Glu-Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro-Gly-Gly-Gly)

20 SEQ ID NO: 375, 376 y 377 muestran las secuencias de aminoácidos de CDR1-H, CDR2-H y CDR3-H del anticuerpo denominado "7G3".

SEQ ID NO: 378 y 379 muestran las secuencias de aminoácidos de CDR1-L y CDR3-L del anticuerpo denominado "7G3".

SEQ ID NO: 380 muestra la secuencia de aminoácidos de una variante del dominio variable de cadena pesada del anticuerpo denominado "7G3" humanizado.

25 SEQ ID NO: 381 y 382 muestran las secuencias de aminoácidos de CDR1-H y CDR3-H del anticuerpo denominado "7G3" humanizado.

SEQ ID NO: 383 muestra la secuencia de aminoácidos de una variante más del dominio variable de cadena pesada del anticuerpo denominado "7G3" humanizado.

30 SEQ ID NO: 384 muestra las secuencias de aminoácidos de CDR2-H de uno de los anticuerpos denominados "7G3" humanizados.

SEQ ID NO: 385 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera del anticuerpo denominado "7G3" humanizado.

SEQ ID NO: 386 muestra la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1 como se muestra en WO2015026892.

SEQ ID NO: 387 muestra la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:3 como se muestra en WO2015026892.

SEQ ID NO: 388 muestra la secuencia de aminoácidos del polipéptido según la fórmula I de las proteínas de unión semejante a anticuerpo denominadas CODV-Fab

5 “hz20G6xhz7G3”, CODV-Fab-OL1 “hz20G6xhz7G3” y CODV-Fab-OL1a “hz20G6xhz7G3”.

SEQ ID NO: 389 muestra la secuencia de aminoácidos de una secuencia conectora (Gly-Gly-Ser-Gly-Ser-Ser-Gly-Ser-Gly-Gly).

SEQ ID NO: 390 muestra la secuencia de aminoácidos del polipéptido según la

10 fórmula II de la proteína de unión semejante a anticuerpo denominada CODV-Fab “hz20G6xhz7G3”.

SEQ ID NO: 391 muestra la secuencia de aminoácidos del polipéptido según la fórmula IV de la proteína de unión semejante a anticuerpo denominada CODV-Fab-TL1

“hz20G6xhz7G3”.

15 SEQ ID NO: 392 muestra la secuencia de aminoácidos de la región F_{c2} de la proteína de unión semejante a anticuerpo denominada CODV-Fab-TL1 “hz20G6xhz7G3”.

SEQ ID NO: 393 muestra la secuencia de aminoácidos del polipéptido según la fórmula III de la proteína de unión semejante a anticuerpo denominada CODV-Fab-TL1

“hz20G6xhz7G3”.

20 SEQ ID NO: 394 muestra la secuencia de aminoácidos de la región F_c de la denominada CODV-Fab-TL1 “hz20G6xhz7G3”.

SEQ ID NO: 395 muestra la secuencia de aminoácidos del polipéptido según la fórmula II de la proteína de unión semejante a anticuerpo denominada CODV-Fab-OL1

“hz20G6xhz7G3”.

25 SEQ ID NO: 396 muestra la secuencia de aminoácidos de la región F_c de la proteína de unión semejante a anticuerpo denominada CODV-Fab-OL1 “hz20G6xhz7G3”.

SEQ ID NO: 397 muestra la secuencia de aminoácidos de la porción F_c (F_{c3}) de la proteína de unión semejante a anticuerpo denominada CODV-Fab-OL1 “hz20G6xhz7G3”.

SEQ ID NO: 398 muestra la secuencia de aminoácidos de la porción F_c (F_{c3}) de la

30 proteína de unión semejante a anticuerpo denominada CODV-Fab-OL1a “hz20G6xhz7G3”.

SEQ ID NO: 399 muestra la secuencia de aminoácidos del polipéptido según la fórmula II de la proteína de unión semejante a anticuerpo denominada CODV-Fab-OL1a

“hz20G6xhz7G3”.

SEQ ID NO: 400 muestra la secuencia de aminoácidos de la porción Fc (Fc₃) de la proteína de unión semejante a anticuerpo denominada CODV-Fab-OL1a "hz20G6xhz7G3".

FIGURAS

Figura 1: Alineamientos de secuencias de las regiones VH de los anticuerpos anti-CD3 denominados “20G6-F3”, “4B4-D7”, “4E7-C9”, “18F5-H10”, “11D7-C3”, “11H3-E5”, “13H2-C2”, “13C1-F6”, “1E6-C9”, “10F4-C10”, “10E6-G6”, “18G9-H11”, “11F3-B9”, “12G3-E8”, “5B1-G2”, “16F8-A7”, “11F9-F8”, “20E5-F10”, “20B5-F10”, “3H6-D2”.

Figura 2: Alineamientos de secuencias de las regiones VL de los anticuerpos anti-CD3 denominados “20G6-F3”, “4B4-D7”, “4E7-C9”, “18F5-H10”, “11D7-C3”, “11H3-E5”, “13H2-C2”, “13C1-F6”, “1E6-C9”, “10F4-C10”, “10E6-G6”, “18G9-H11”, “11F3-B9”, “12G3-E8”, “5B1-G2”, “16F8-A7”, “11F9-F8”, “20E5-F10”, “20B5-F10”, “3H6-D2”.

Figura 3: Alineamientos de secuencias de las regiones VH y VL de los anticuerpos anti-CD123 denominados “1E1-G5”, “6D6-B8”, “8B11-B7”, “”, “9F6-G3”.

Figura 4: Alineamientos de secuencias de las regiones VH y VL de los anticuerpos anti-CD123 denominados “6C10-C4”, “9B8-G6”, “9D7-C8”.

Figuras 5 y 7: CODV-Fab-TL1 “hz20G6xhz7G3” IV Q3d humana completa en presencia de células T humanas inhibe el crecimiento del tumor Molm13 en cuerpo completo a todas las dosis ensayadas.

Figuras 6 y 8: CODV-Fab-TL1 “hz20G6xhz7G3” IV Q3d humana completa en presencia de células T humanas está asociada con regresión tumoral en huesos largos a todas las dosis ensayadas.

Figuras 9 y 11: CODV-Fab “hz20G6xhz7G3” IV humana completa en presencia de células T humanas inhibió el crecimiento tumoral.

Figuras 10 y 12: CODV-Fab “hz20G6xhz7G3” IV humana completa en presencia de células T humanas estaba asociada con regresión tumoral en huesos largos.

Figuras 13 y 15: CODV-Fab “hz20G6xhz7G3” CIP humana completa en presencia de células T humanas inhibió el crecimiento tumoral en cuerpo completo a una dosificación de 0,13 nmol/Kg/día o mayor.

Figuras 14 y 16: CODV-Fab “hz20G6xhz7G3” CIP humana completa en presencia de células T humanas inhibió el crecimiento tumoral en huesos largos a una dosificación de 0,13 nmol/Kg/día o mayor.

Figura 17: Representación en diagrama de la estructura de la CODV-Ig, CODV-Fab-TL y CODV-Fab-OL (que muestra además mutaciones LALA (cuando se usa Fc de núcleo IgG1) y mutaciones "Botón en ojal").

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Generación de anticuerpos

1.1 Construcción del plásmido de expresión de la fusión hCD3ε/δ-hFc (CD3ed-Fc)

5 Usando plásmidos que contienen ADN como un molde, se generaron las proteínas de fusión humana y de *Macaca fascicularis* CD3ε y CDδ, como se describe más adelante en la presente memoria con detalle, en marco de lectura con la región constante de cadena pesada incluyendo la región bisagra, los dominios CH2 y CH3 de inmunoglobulina IgG humana portando adicionalmente una etiqueta 8 x His o Strep-II
10 para la purificación tándem opcional.

Usando ADN genómico como un molde, se amplificaron los dominios extracelulares de la subunidad CD3ε humana y CDδ humana, incluyendo la secuencia señal. Los productos de PCR amplificados escindidos, y purificados resultantes se combinaron por ligación por PCR y se ligaron en el vector de expresión de mamíferos pXL por el método InFusion usando el sitio NheI y HindIII. Cada subunidad se clonó en
15 un plásmido. La secuencia de la proteína de fusión resultante CD3ε humana madura Fc etiquetada con His se describe en la presente memoria bajo SEQ ID NO: 3. Los aminoácidos 1 a 104 de SEQ ID NO: 3 corresponden a los aminoácidos 23 a 126 de la proteína CD3ε humana de longitud completa de tipo salvaje (descrita en la presente memoria bajo SEQ ID NO: 1, disponible en la base de datos Uniprot con el número de
20 registro P07766) y así el dominio extracelular de CD3ε humana.

Usando ADN genómico de mono cinomolgus como un molde, se amplificaron los dominios extracelulares de CD3ε y CDδ de *Macaca fascicularis*, incluyendo la secuencia señal. Los productos de PCR amplificados escindidos y purificados resultantes se
25 combinaron por ligación por PCR y se ligaron en el vector de expresión de mamíferos pXL por el método InFusion usando NheI y HindIII. Cada subunidad se clonó en un plásmido. Las secuencias resultantes para la proteína de fusión CD3ε madura de *Macaca fascicularis* Fc se describen bajo SEQ ID NO: 4. Los aminoácidos 1 a 95 de SEQ ID NO: 3 corresponden a los aminoácidos 23 a 117 de la proteína CD3ε de longitud completa de *Macaca fascicularis* y así comprende el dominio extracelular de
30 CD3ε de *Macaca fascicularis* de longitud completa de tipo salvaje (descrita en la presente memoria bajo SEQ ID NO: 2, disponible en la base de datos Uniprot con el

número de registro Q95LI5). La proteína de fusión clonada contiene además un intercambio Alanina a Valina en la posición de aminoácidos 35 en comparación con la posición de aminoácidos 57 de la secuencia de tipo salvaje.

1.2 Expresión y purificación de CD3 ϵ -Fc humana y de cino

5 Se transfectaron de forma transitoria células HEK293 Freestyle creciendo en cultivo en suspensión en F17 sin suero (Life) con el plásmido de expresión. Se realizó la co-transfección de ambos plásmidos que representan la subunidad de dominio extracelular de CD3 ϵ y CD3 δ (ECD) usando reactivo de transfección Cellfectin (Life). Las células se cultivaron a 37°C durante 7 días. El sobrenadante del cultivo que
10 contenía la proteína recombinante se recogió por centrifugación y se clarificó por filtración (0,22 μ m).

Para la purificación, las variantes de la proteína de fusión Fc se capturaron en matriz de proteína A (GE) y se eluyeron por desplazamiento de pH. Después de pulir la proteína por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) usando una Superdex 200
15 (GE) y una etapa de concentración por ultrafiltración final la proteína se usó para ensayos adicionales.

El heterodímero humano se aplicó adicionalmente en una columna His-Trap (GE) después de captura en proteína A y se desaló. La proteína eluida se aplicó a una columna de Estreptavidina (GE) y se eluyó con d-destiobiotina antes de un pulido final
20 por SEC usando una Superdex 200 (GE). Esta estrategia se usó para aislar heterodímeros de homodímeros.

1.3 Generación de anticuerpos anti-CD3 con reacción cruzada humano/mono cinomolgus

Los ADNc de CD3 ϵ y CD3 δ humana y de *Macaca fascicularis* se clonaron en
25 vectores de inmunización patentados Aldevron (pB8 y VV8) respectivamente, y se usaron para la inmunización genética de ratas. Las ratas del grupo de inmunización MR12-266 ("CD3-cyno") se inmunizaron inicialmente con ADNc de CD3 ϵ y CD3 δ humana, seguido de dos inmunizaciones adicionales con una mezcla de ADNc de CD3 ϵ y CD3 δ humana y de *Macaca fascicularis*. El suero inmune se tomó en el día 24 del
30 protocolo de inmunización, después de 4 aplicaciones genéticas (IS24d-4). Los sueros, diluidos en PBS 1% BSA, se ensayaron por citometría de flujo usando células de mamífero transfectadas de forma transitoria con los ADNc diana en experimentos de co-

transfección para obtener complejos de TCR CD3 ϵ y CD3 δ humano y de *Macaca fascicularis*. Además los sueros inmunes se ensayaron en las líneas celulares siguientes: Jurkat E6-1 (que expresa TCR humano), Jurkat-RT-T3.5 (negativa para TCR) y cino HSC-F (que expresa TCR de cino); no estaba disponible ninguna línea celular negativa para TCR de cino. Como anticuerpo secundario se usó un conjugado de anti-IgG rata de cabra con R-ficoeritrina (Southern Biotech, #3030-09) a 10 μ g/ml.

La reactividad específica de los sueros inmunes especialmente frente a las células transfectadas con combinaciones de los ADNc de CD3 ϵ y CD3 δ pudo detectarse en los animales inmunizados cuando se comparó con células transfectadas con un ADNc irrelevante. Lo mismo es válido para el ensayo de la línea celular positiva para TCR Jurkat (E6- 1), cuando se compara con la línea celular negativa para TCR (RT-T3.5), se detectaron señales mucho menores pero todavía señales significativas en la línea celular de cinomolgus HSC-F (véase la tabla 1).

Tabla 1: Detección de la reactividad específica de los sueros inmunes frente al complejo TCR en cada animal por citometría de flujo. Los datos se presentan como medias geométricas de las intensidades relativas de fluorescencia (rfu).

		pXL-CD3e- hum + pXL- CD3d-hum	pXL-CD3e- cino + pXL- CD3d-cino	pB1_ irrelevante	Jurkat-E6-1	Jurkat-RT- T3.5	cino HSC-F
	sin ab primario	5	5	4	7	10	6
	OKT3	-	-	-	858	25	-
	FN18	-	-	4	7	10	1.256
	Ratón -anti-HA	6	6	-	-	-	-
	Rata-anti-myc	9	7	1.033	10	14	9
rata #1	1:1.000	290	273	5	186	36	55
	1:5.000	79	86	5	65	21	20
rata #2	1:1.000	499	401	5	390	55	75
	1:5.000	147	110	4	126	28	25
rata #3	1:1.000	239	247	5	108	30	31
	1:5.000	89	92	4	32	17	9
rata #4	1:1.000	280	283	5	176	37	73
	1:5.000	97	110	4	55	22	23
rata #5	1:1.000	208	137	4	99	31	11
	1:5.000	61	65	4	47	19	7

Las ratas del grupo de inmunización MR12-265 ("CD3-hum") se co-inmunizaron con ADNc de CD3 ϵ y CD3 δ humano clonado en los vectores de expresión correspondientes. El suero inmune se tomó en el día 24 del protocolo de inmunización, después de 4 aplicaciones genéticas (IS24d-4). Los sueros, diluidos en PBS 1% BSA, se ensayaron por citometría de flujo usando células de mamífero transfectadas de forma transitoria con los ADNc diana mencionados anteriormente en experimentos de co-transfección para obtener complejos TCR CD3 ϵ y CD3 δ humano y de *Macaca fascicularis*. Como anticuerpo secundario se usó un conjugado de anti-IgG de rata de cabra con R-ficoeritrina (Southern Biotech, #3030-09) a 10 μ g/ml. Además los sueros inmunes se ensayaron en las líneas celulares siguientes: Jurkat E6-1 (que expresa TCR humano), Jurkat-RT-T3.5 (negativa para TCR) y cino HSC-F (que expresa TCR de cino); no estaba disponible ninguna línea celular negativa para TCR de cino. Como anticuerpo secundario se usó un conjugado de anti-IgG de rata de cabra con R-ficoeritrina (Southern Biotech, #3030-09) a 10 μ g/ml.

La reactividad específica de los sueros inmunes especialmente frente a las células transfectadas con combinaciones de los ADNc de CD3 ϵ y CD3 δ pudo detectarse en los animales inmunizados cuando se comparó con células transfectadas con un ADNc irrelevante. Lo mismo es válido para el ensayo de la línea celular positiva para TCR Jurkat (E6-1), cuando se compara con la línea celular negativa para TCR (RT-T3.5), pero se detectaron señales mucho menores (sin embargo en las ratas positivas todavía significativas) en la línea celular de cino HSC-F (véase la tabla 2).

Tabla 2: Detección de la reactividad específica de los sueros inmunes frente al complejo TCR en cada animal por citometría de flujo. Los datos se presentan como medias geométricas de las intensidades relativas de fluorescencia (rfu).

		pXL-CD3e- hum + pXL- CD3d-hum	pXL-CD3e- cino + pXL- CD3d-cino	pB1_ irrelevante	Jurkat-E6-1	Jurkat-RT-T3.5	cino HSC-F
	sin ab primario	5	5	4	7	10	6
	OKT3	-	-	-	858	25	-
	FN18	-	-	4	7	10	1.256
	Ratón -anti- HA	6	6	-	-	-	-
	Rata-anti-myc	9	7	1.033	10	14	9
rata #1	1:1.000	230	132	5	170	33	50
	1:5.000	78	40	4	54	19	15
rata #2	1:1.000	216	136	6	216	48	32
	1:5.000	75	40	4	66	24	11
rata #3	1:1.000	73	54	5	56	25	7
	1:5.000	25	20	4	23	15	6
rata #4	1:1.000	70	56	5	41	25	8
	1:5.000	25	18	4	15	15	6
rata #5	1:1.000	65	37	5	42	20	7
	1:5.000	24	17	4	17	14	6

Las ratas con sueros positivos se sacrificaron y las células B se fusionaron con células de mieloma de ratón. Los hibridomas resultantes se cribaron en células HEK293 transfectadas con los plásmidos de expresión de CD3ε y CD3δ humana o de cinomolgus, en Jurkat E6.1 (CD3+) y Jurkat T3.5 (CD3-) por citometría de flujo. El sobrenadante de los clones de hibridoma se usó para evaluar por resonancia de plasmón superficial cinética de único punto frente al complejo CD3ε/δ humano y de *Macaca fascicularis* fijando el analito a 25nM (datos presentados en la tabla 3).

Tabla 3: Detección de reactividad específica de diferentes sobrenadantes de clones de hibridomas por citometría de flujo y análisis Biacore. Los sobrenadantes se ensayaron en diferentes líneas celulares (Jurkat E6-1, Jurkat-RT-T3.5 y cino HSC-F). El análisis Biacore se realizó frente a complejos CD3ε/d de ser humano y mono cinomolgus respectivamente.

Muestra-ID	Biacore CD3ε/δ humano [RU]	Biacore CD3ε/δ cino [RU]
	a 25nM	a 25nM
3G5-E10	27	3
18G9-H11	7	-7
12D2-E5	27	5
6C9-C9	26	32
11F9-F8	11,5	16
8H2-F3	32,5	40
4B4-D7	11	14
4E7-C9	2,5	10
13C1-F6	17	15,5
11D7-C3	17	10
13H2-C3	16	7
10E6-G6	10,5	0
12G3-E8	24	17
11F3-B9	22	17
20E3-B5	11	5
10F4-C10	22	27
11H3-E5	7	9
18F5-H10	n.a.	n.a.
18H11-F10	35	55
20E5-F10	12	8

Muestra-ID	Biacore CD3 ϵ / δ humano [RU] a 25nM	Biacore CD3 ϵ / δ cino [RU] a 25nM
3H6-D2	9,5	7
8C2-F7	4,5	3
5B1-G2	1	0,5
7B7-F10	28	42
20B5-F10	1	9,5
16D3-E4	-2	-2
1E6-B8	n.a.	n.a.
16F8-A7	17,5	22,5
11A8-D6		
3E8-G1		
20G6-F3		
9D7-B5	n.a.	n.a.
9G5-G10		
17A11-D3		

Los clones positivos se expandieron y los ADNc respectivos para cadenas pesada y ligera variables se aislaron por RT-PCR. Las secuencias VH y VL se clonaron en vectores de expresión en fusión con bien el CH1, núcleo IGHG1 o cadena kappa humano con el fin de expresar fragmentos Fab así como IgG completas.

1.4 Expresión de IgG y fragmentos Fab

Los plásmidos de expresión que codifican la cadena pesada y ligera de las IgG y fragmentos Fab se propagaron en *E. Coli* NEB 10-beta (derivado de DH10B). Los plásmidos usados para la transfección se prepararon a partir de *E. Coli* usando el Kit de QIAGEN Plasmid Plus (No. de Cat.: 12991).

Se transfectaron células HEK 293-FS creciendo en Medio Freestyle (Invitrogen) con los plásmidos LC y HC indicados que codifican las cadenas pesadas y cadenas ligeras usando reactivo de transfección 293fectin (Invitrogen) como describe el fabricante. Las células se cultivaron a 37°C en un incubador agitador Kuhner ISF1-X a 110rpm con 8% CO₂. Después de 7 días de cultivo, las células se retiraron por centrifugación, se añadió 10% Vol/Vol 1M Tris HCl pH 8,0 y el sobrenadante se filtró

mediante un filtro superior de botella de 0,2µM para eliminar las partículas. Las construcciones CODV-IgG1 se purificaron por cromatografía de afinidad en columnas de Proteína A (HiTrap Protein A HP Columns, GE Life Sciences). Después de elución de la columna con 0,1M Citrato, pH 3,0, las construcciones CODV-IgG1 se desalaron usando Columnas de Desalado HiPrep 26/10, formuladas en PBS (Gibco 14190-136).

Las construcciones CODV-Fab biespecíficas se purificaron por columnas de Alto Rendimiento HisTrap (GE Healthcare, No. Cat.: 17-5248-02). Después de elución de la columna (Tampón de elución: 20 mM fosfato de sodio, 0,5 M NaCl, 500 mM imidazol, pH 7,4), las fracciones que contenían proteína se combinaron y desalaron usando Columnas Desaladoras HiPrep 26/10, formuladas en PBS (Gibco 14190-136).

Para separar los monómeros de los agregados, se realizó una etapa de fraccionamiento de alta resolución en PBS (Gibco 14190-136) para ambas construcciones, la CODV-IgG y la CODV-fragmento Fab, usando una columna HiLoad Superdex 200 26/60 320ml (GE Healthcare No. Cat.: 29-9893-36). Las fracciones monoméricas se combinaron y concentraron hasta 1mg/ml, usando columnas de centrifugación Vivaspin 20 (VS2002 Sartorius Stedim biotech) y se filtraron usando una membrana de 0,22 µm (Filtros de Jeringa Millex® SLGV033RS).

La concentración de proteínas se determinó por medida de absorbancia a 280 nm. Cada lote se analizó por SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras para determinar la pureza y peso molecular de cada subunidad y del monómero.

1.5 Evaluación de las afinidades de los anticuerpos anti-CD3

1.5.1 Evaluación de las afinidades tanto para CD3ε/δ humana como de *Macaca fascicularis*

Las afinidades de unión de Fabs o CODV-Fabs de unión anti-CD3 se midieron por resonancia de plasmón superficial (SPR) usando un instrumento Biacore3000 (GE Healthcare). El tampón de ensayo fue HBS-EP (BR-1001-88, GE Healthcare). La captura de las proteínas de fusión CD3ε/δ-Fc se consiguió usando el kit de captura de anticuerpo humano (GE Healthcare). El anticuerpo de captura se acopló a chips CM5 (BR-1001-88, GE Healthcare) a aprox. 12.000 RU usando el kit de acoplamiento de amina (BR-100-50, GE Healthcare). Las proteínas de fusión CD3εδ-Fc se capturaron a 10 µl/min a aprox. 70 RU para rendir valores de R_{max} de 30 RU. Las cinéticas de unión con los anti-CD3 Fabs o CODV-Fabs se midieron a 30µl/min durante 240 seg. y 600

seg. para la fase de asociación y disociación, respectivamente. Se usaron diluciones de dos veces de los Fabs de 3 a 400nM en tampón de ensayo. Todas las concentraciones de Fab se corrieron en duplicado junto con los blancos de tampón en duplicado para una doble referencia. La regeneración de la superficie de captura se realizó con una inyección de 1min de disolución 3M de MgCl₂ a 30μl/min. Para el análisis de los datos se usó el software BIAevaluation v.4.1 (GE Healthcare). Los datos se ajustaron globalmente usando un modelo 1:1 de Langmuir con transferencia de masa.

La medida de las afinidades de unión de proteínas anti-CD3 IgGs y CODV-Fc se realizó de forma análoga al ensayo de unión para Fabs y CODV-Fabs con la excepción del anticuerpo de captura. En este caso, se usó el Kit His Capture (28-9950-56, GE Healthcare) para capturar la proteína CD3-Fc humana mediante etiqueta His. Para el ensayo de unión de con CD3-Fc de *Macaca fascicularis* se usó el anticuerpo clásico Strep-MAB (2-1507-001, IBA) como el anticuerpo de captura. En este caso, la disolución de regeneración fue tampón 10mM Glicina pH2,0.

Tabla 4: Afinidades de anticuerpos CD3 seleccionados frente a complejos CD3ε/δ humanos y de *Macaca fascicularis* medidas por Biacore.

CD3 εδ	Clon (fragmento Fab)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	Rmax (RU)	KD (M)	Chi2	Proporción KD(cy)/KD(hu)
humano	12D2-E5	5,4E+06	6,2E-03	35	1,2E-09	0,34	4
cino	12D2-E5	estado estacionario	estado estacionario	8	4,8E-09	0,129	
humano	10E6-G6	1,4E+05	2,0E-03	37	1,4E-08	0,218	1
cino	10E6-G6	1,9E+05	2,4E-03	18	1,3E-08	0,218	
humano	4E7-C9	8,9E+04	1,6E-03	29	1,7E-08	0,244	1
cino	4E7-C9	9,8E+04	1,5E-03	20	1,5E-08	0,232	
humano	12G3-E8	1,1E+05	1,1E-03	30	9,3E-09	0,307	1
cino	12G3-E8	1,7E+05	1,8E-03	15	1,0E-08	0,349	
humano	5B1-G2	6,0E+04	3,9E-04	36	6,5E-09	0,218	1
cino	5B1-G2	3,4E+04	1,5E-04	20	4,3E-09	2,1	
humano	18F5-H10	2,0E+05	1,8E-04	28	8,9E-10	0,235	1
cino	18F5-H10	1,4E+05	1,3E-04	15	8,9E-10	0,224	

humano	18G9-H11	2,5E+05	1,1E-03	31	4,4E-09	0,975	6
cino	18G9-H11	5,1E+04	1,2E-03	18	2,4E-08	0,617	
humano	4B4-D7	1,1E+05	2,9E-03	22	2,7E-08	0,147	1
cino	4B4-D7	1,1E+05	2,7E-03	12	2,4E-08	0,188	
humano	1E6-B8	9,3E+04	3,9E-03	26	4,1E-08	0,157	1
cino	1E6-B8	1,0E+05	4,2E-03	15	4,2E-08	0,122	
humano	13H2-C3	1,7E+05	4,9E-03	20	2,9E-08	0,317	1
cino	13H2-C3	1,8E+05	5,9E-03	12	3,2E-08	0,166	
humano	20G6-F3	3,5E+04	2,7E-04	21	7,7E-09	0,208	1
cino	20G6-F3	2,7E+04	2,2E-04	15	8,2E-09	0,184	
humano	11F9-F8	7,7E+04	4,0E-04	22	5,2E-09	0,137	1
cino	11F9-F8	8,3E+04	3,6E-04	13	4,4E-09	0,109	
humano	20E5-F10	9,9E+04	4,3E-04	25	4,3E-09	0,125	1
cino	20E5-F10	1,2E+05	3,4E-04	14	2,9E-09	0,104	
humano	SP-34	1,1E+06	3,0E-03	34	2,7E-09	2,3E-01	5
cino	SP-34	2,2E+05	2,8E-03	34	1,3E-08	4,7E-01	

SP-34 se usó como IgG

1.5.2 Unión de anticuerpos anti-CD3 a huCD3 ϵ , huCD3 δ , y huCD3 ϵ/δ expresados en la superficie de células HEK293F por citometría de flujo

5 Para analizar la unión de anticuerpos a CD3 ϵ humano y CD3 δ humano expresados en la superficie de células, se transfectaron células HEK293F con ambas construcciones bien solas o en co-transfección y se midieron las señales por citometría de flujo. Para el procedimiento de transfección, se usó el Reactivo de Transfección FuGENE HD (Promega, #E2311) según el protocolo del fabricante.

10 Las células HEK293F se sembraron en medio Freestyle293 (Gibco) a 6E6 células por tubo en tubos de 50 ml Cellstar Cellreactor con filtro (Greiner bio-one). Las transfecciones se hicieron según el protocolo FuGENE. La preparación del complejo se hizo en OptiMEM sin rojo fenol (Gibco) a una proporción 3:1 (Protocolo para la transfección de células 293F crecidas en 8.000 μ l de medio en matraces T-25 usando

15 una proporción FuGENE®HD:ADN de 3,0:1, <http://www.promega.com/techserv/tools/FugeneHdTool/default.aspx>).

Las células se incubaron en un agitador a 37°C y 5% CO₂. En el día uno a tres después de la transfección las células se recogieron y se analizó la unión de los anticuerpos por citometría de flujo.

Los anticuerpos para tinción se sembraron a 1 µg en 50 µl por pocillo con Tampón de Tinción con FBS (BD Pharmingen) en placas de cultivo en suspensión de 96 pocillos con fondo en U (Greiner bio-one). Las células transfectadas recogidas se resuspendieron en Tampón de Tinción con FBS y se añadieron a 50 µl por pocillo a los anticuerpos. Las células se incubaron a 4°C en oscuridad durante 30 min y se lavaron dos veces. Se añadieron 0,5 µg de anticuerpo secundario F(ab')₂ de cabra Anti-IgG humana-FITC (Beckman Coulter, #732598) o F(ab')₂ de cabra Anti-kappa humana-PE (Southern Biotech, #206209), respectivamente, en combinación con 0,5 µg 7-AAD por pocillo en 100 µl de Tampón de Tinción con FBS. Las células se incubaron a 4°C en oscuridad durante 15 min y se lavaron dos veces. Para la medida, las células se resuspendieron en 200 µl de Tampón de Tinción con FBS. Las células se midieron usando el citómetro de flujo MACSQuant (Miltenyi Biotec) o LSRII (BD), respectivamente. Se realizaron análisis de datos adicionales usando el software FlowJo (Tree Star, Inc.). La lectura fue el porcentaje de células únicas negativas para 7-AAD positivas para tinción de anticuerpo (datos presentados en la tabla 5).

20 1.5.3 Unión de anti-CD3 Fabs a huCD3ε/δ y huCD3ε/γ por SPR

La unión se ensayó por SPR usando un instrumento BIAcore3000 que se corrió con tampón HBS-EP. Las proteínas huCD3 recombinantes (ε/δ (PB01226), ε/γ (PB01225)) se capturaron a 10µl/min mediante la etiqueta Fc por anticuerpo de captura anti-Fc humano MAB1302 (Millipore) inmovilizado en un chip sensor CM5. Los anti-CD3 Fabs se usaron como analitos a 100nM con tiempos de asociación y disociación de 240seg y 300seg, respectivamente a 30µl/min. Después de cada ciclo, las superficies se regeneraron por un pulso de 2 min de tampón 10mM glicina pH2,5.

Cuando sólo se expresó huCD3δ en la superficie de células HEK293F no pudo detectarse ninguna señal por citometría de flujo. Por el contrario, casi todos los anticuerpos pudieron unirse a células transfectadas con huCD3ε exclusivamente o en co-transfección con huCD3δ lo que indica que huCD3ε es necesario como epítipo. En los ensayos Biacore la unión a huCD3ε se mostró independiente de si la cadena δ o γ

se usó para la proteína recombinante lo que sugiere que huCD3 ϵ es suficiente como antígeno. El anticuerpo 12D2 excepcionalmente sólo se unió a huCD3 ϵ cuando estaba presente una co-cadena. Puede haber un efecto indirecto de co-expresión de la cadena g o d respecto a la estructura conformacional de la proteína para presentar el epítipo para este anticuerpo. El mismo efecto se mostró para el anticuerpo publicado OKT3. Se describe que este anticuerpo interacciona con un epítipo conformacional formado después de la asociación de huCD3 ϵ con huCD3 δ o γ , respectivamente (Salmeron et al., 1991, The Journal of Immunology). También se mostró que se une a la subunidad huCD3 ϵ exclusivamente (Kjer-Nielsen et al., 2004, PNAS). Debido al comportamiento similar de 12D2 y OKT3, se puede suponer una interacción con huCD3 ϵ para 12D2. Tomado todo conjuntamente, huCD3 ϵ parece ser la estructura antigénica para todos los anticuerpos analizados (datos presentados en la tabla 5).

Tabla 5: Afinidades de anticuerpos CD3 seleccionados frente a complejos huCD3 δ , huCD3 ϵ , huCD3 ϵ/δ y huCD3 ϵ/γ medidas por Citometría de flujo y Biacore.

	Citometría de flujo			Biacore	
	% células transfectadas positivas para anticuerpo (n=3-6)			RU de unión de Fab a 100nM	
Clon	huCD3 δ	huCD3 ϵ (+/- SEM)	huCD3 ϵ/δ (+/-SEM)	huCD3 ϵ/δ	huCD3 ϵ/γ
10E6	n.b.	96,3 +/- 2,2	93,3 +/- 4,7	11	8
11F9	n.b.	97,0 +/- 1,5	96,0 +/- 2,5	10	7
12D2	n.b.	n.b.	96,3 +/- 2,2	11	5
12G3	n.b.	96,3 +/- 2,2	96,7 +/- 1,9	10	7
13H2	n.b.	93,3 +/- 3,3	93,0 +/- 4,2	9	6
18F5	n.b.	70,6 +/- 11,9	70,4 +/- 9,9	13	7
18G9	n.b.	95,0 +/- 2,5	97,0 +/- 1,5	10	3
1E6	n.b.	87,7 +/- 4,4	91,7 +/- 4,9	10	7
20E5	n.b.	96,7 +/- 1,9	95,3 +/- 3,2	11	8
20G6	n.b.	68,6 +/- 12,1	67,4 +/- 10,4	7	4
4B4	n.b.	71,5 +/- 10,8	69,5 +/- 8,7	11	3
4E7	n.b.	69,0 +/- 12,3	66,4 +/- 10,0	8	6
5B1	n.b.	97,0 +/- 1,5	97,0 +/- 1,5	10	7
OKT3	n.b.	n.b.	70,2 +/- 9,6	4	3

n.b. = no unión (<20% de unión de huCD3 ϵ +huCD3 δ)

1.6 Unión de CD3 Fab a células T humanas

La capacidad de unión de los CD3-Fabs se determinó por citometría de flujo. Se usaron células T primarias humanas como células diana. Por lo tanto, se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de 200 ml de sangre periférica de donantes sanos tratado con EDTA por centrifugación de densidad Ficoll. Se precargaron 15 ml de Histopaque (Sigma-Aldrich) en un Tubo de 50 ml Leucosep (Greiner bio-one). La sangre se diluyó con Tampón de Lavado autoMACS + 1% BSA (Miltenyi Biotec) y se cargó en la membrana de un total de diez tubos preparados. Los tubos se centrifugaron sin freno durante 10 min a 1.000 xg. Las PBMC se recogieron y lavaron con Tampón de Lavado autoMACS + 1% BSA tres veces. Finalmente, las PBMC se resuspendieron en Tampón de Corrida autoMACS (Miltenyi Biotec) para el aislamiento de linfocitos T por tecnología autoMACSpro usando el Kit de aislamiento Pan T Cell (Miltenyi Biotec) según las instrucciones del fabricante. La pureza de las células T separadas se analizó por citometría de flujo MACSQuant usando el Kit de Inmunofenotipado humano de 7 Colores (Miltenyi Biotec). Las células T aisladas se resuspendieron en Tampón de Tinción con FBS (BD Pharmingen) y se sembraron 1E5 células en 100 µl por pocillo en placas de cultivo en suspensión de fondo en U de 96 pocillos (Greiner bio-one). Los anticuerpos Fab se diluyeron 1:3 de forma seriada en PBS (Invitrogen) y se añadieron 5 µl de cada uno a las células a una concentración final máxima de 30.000 ng/ml. El ensayo se incubó durante 45 min a 4°C. Las células se lavaron dos veces con Tampón de Tinción con FBS y se añadió 1 µg de anticuerpo secundario F(ab')₂ de cabra Anti-kappa humana-FITC (Beckman Coulter, #732621) por pocillo en 100 µl de Tampón de Tinción con FBS por pocillo. El ensayo se incubó durante 20 min a 4°C y se lavó dos veces después de esto. Las células se resuspendieron en 150 µl de Tampón de Tinción con FBS por pocillo y se midieron usando el citómetro de flujo MACSQuant (Miltenyi Biotec) o LSRII (BD). Se realizaron análisis de datos adicionales usando el software FlowJo (Tree Star, Inc.). La lectura fue el porcentaje de células positivas para unión de anticuerpo. Las células tratadas sólo con el anticuerpo secundario pero no el primario se usaron para establecer las selecciones. Las curvas de CE50 se calcularon por XLfit (Algoritmo 205), los valores de CE50 se calcularon como punto de inflexión de la pendiente (los datos se muestran en la tabla 6).

Tabla 6: Afinidades de CD3 Fab para células T humanas medidas por Citometría de flujo. Se presentan como valores CE50 medios calculados de las curvas.

Anticuerpo	Unión a células T humanas CE50 [nM] media +/- SEM		
12D2-E5-Fab	3,8	+/-	0,2
4B4-D7-Fab	15,3	+/-	3,0
1E6-C9-Fab	18,7	+/-	3,5
10E6-G6-Fab	4,7	+/-	0,9
4E7-C9-Fab	6,2	+/-	0,8
12G3-E8-Fab	4,4	+/-	0,3
5B1-G2-Fab	11,1	+/-	3,6
18F5-H10-Fab	4,1	+/-	0,0
18G9-H11-Fab	1,7	+/-	0,5
13H2-C2-Fab	14,3	+/-	0,9
20G6-F3-Fab	14,0		(n=1)
11F9-F8-huFab	11,6		(n=1)
20E5-F10-huFab	8,2		(n=1)

5

1.7 Seguridad de CD3 Fab

1.7.1 Seguridad de CD3 Fab medida por la expresión de CD25+ y CD69+ en células T humanas. El efecto de los anticuerpos CD3 Fab en el estado de la activación de células T como resultado de seguridad se analizó por citometría de flujo tomando como base la detección de la expresión del marcador de activación CD25 y CD69 en la superficie de células T primarias humanas.

10

Se resuspendieron linfocitos T primarios humanos aislados en RPMI + GlutaMAX I (Gibco) + 10% FCS (Invitrogen) y se sembraron 2,5E5 células en placas de cultivo en suspensión de fondo en U de 96 pocillos (Greiner bio-one) en 100 µl por pocillo.

15

Se añadieron 5µl de anticuerpos Fab CD3 a las células a una concentración final de 30.000 ng/ml. El ensayo se incubó durante 20 h a 37°C en 5% CO₂.

Después del tiempo de incubación, las células se sedimentaron y se tiñeron durante 15 min a 4°C en 100 µl de Tampón de Tinción con FBS (BD Pharmingen) por pocillo con los anticuerpos marcados siguientes: CD25-V450, CD69-APC

20

Las células se lavaron dos veces después de la tinción, se resuspendieron en 150 µl de Tampón de Tinción con FBS, y 5.000 células se midieron usando el citómetro de

flujo LSRII (BD). Se realizaron análisis de datos adicionales usando el software FlowJo (Tree Star, Inc.). La lectura fue el porcentaje de células T CD25pos y CD69pos (tabla 7).

5 **Tabla 7: Seguridad de CD3 Fab medida por la expresión de CD25+ y CD69+ en células T humanas**

Anticuerpo	CD25+% Activación de células T humanas normalizado respecto a PBS C = 30.000ng/ml n=1	CD69+% Activación de células T humanas normalizado respecto a PBS C = 30.000ng/ml n=1
11H3-E5-Fab	0,7	0,5
12D2-E5-Fab - SEC	3,2	11,1
4B4-D7-Fab	2,5	5,4
1E6-B8/B9-C9-Fab	1,8	3,2
10E6-G6-Fab	0,8	2,6
4E7-C9-Fab	0,4	0,1
12G3-E8-Fab	0,0	1,5
5B1-G2-Fab	0,4	4,2
6F4-D10-Fab	2,1	6,4
18F5-H10-Fab	0,0	0,1
18G9-H11-Fab	0,7	2,2
13H2-C2-Fab	0,5	0,4
13C1-F6-Fab	0,4	0,2
1E6-B8/B9-C9-Fab	0,6	1,7
20G6-F3-Fab	0,2	3,2
1E6-B8/B9-C9-Fab	2,5	7,8
1E6-B8/B9-C9-Fab	0,1	1,0
11F9-F8-huFab	1,0	0,8
20E5-F10-huFab	1,5	1,3

1.7.2 Seguridad de CD3 Fab medida por la expresión de CD4+/CD69+, CD4+/CD25+, CD8+/CD69+ y CD8+/CD25+ en células T humanas

10 El efecto de los anticuerpos CD3 Fab en el estado de la activación de células T como resultado de seguridad se analizó por citometría de flujo tomando como base la detección de la expresión del marcador de activación CD25 y CD69 en la superficie de

- células T primarias humanas. Se resuspendieron linfocitos T primarios humanos aislados en RPMI + GlutaMAX I (Gibco) + 10% FCS (Invitrogen) y se sembraron 2,5E5 células en placas de cultivo en suspensión de fondo en U de 96 pocillos (Greiner bio-one) en 50 µl por pocillo. Bien se ensayaron células T exclusivamente y los pocillos se
- 5 llenaron con 50 µl RPMI + GlutaMAX I + 10% FCS, o se añadieron células diana (es decir, línea celular THP-1) a 2,5E4 células por pocillo en 50 µl RPMI + GlutaMAX I + 10% FCS. Los anticuerpos biespecíficos se diluyeron 1:3 de forma seriada en PBS (Invitrogen) y se añadieron 5 µl de cada uno a las células a una concentración final máxima de 30.000 ng/ml. El ensayo se incubó durante 20 h a 37°C en 5% CO₂.
- 10 Después del tiempo de incubación, las células se sedimentaron y se tiñeron durante 15 min a 4°C en 100 µl de Tampón de Tinción con FBS (BD Pharmingen) por pocillo con los anticuerpos marcados siguientes: CD4-PE, CD8-APC-Cy7, CD25-APC, CD69-PE-Cy7. Como control de Fluorescencia Menos Uno (FMO) se tiñeron células T activadas control como se ha descrito anteriormente pero CD25 se reemplazó por su isotipo
- 15 (isotipo APC-IG1k) en un tubo y CD69 se reemplazó por su isotipo (isotipo PE-Cy7-IG1k) en un segundo tubo. Las células se lavaron dos veces después de la tinción, se resuspendieron en 150 µl de Tampón de Tinción con FBS, y 5.000 células se midieron usando el citómetro de flujo LSRII (BD). Se realizaron análisis de datos adicionales usando el software FlowJo (Tree Star, Inc.). La lectura fue el porcentaje de células T
- 20 CD4posCD25pos, CD4posCD69pos, CD8posCD25pos, y CD8posCD69pos. Las selecciones se establecieron según los controles FMO (véase la tabla 8).

Tabla 8: Seguridad de CD3 Fab medida por la expresión de CD4+/CD69+, CD4+/CD25+, CD8+/CD69+ y CD8+/CD25+ en células T humanas

25

Anticuerpo	CD4+/CD69+ % Activación normalizada respecto a PBS C=100nM media +/- SEM			CD8+/CD69+ % Activación normalizada respecto a PBS C=100nM media +/- SEM			CD4+/CD25+ % Activación normalizada respecto a PBS C=100nM media +/- SEM			CD8+/CD25+ % Activación normalizada respecto a PBS C=100nM media +/- SEM		
20G6-F3-Fab	0,1	+/-	0,1	0,0	+/-	0,0	0,4	+/-	0,1	0,0	+/-	0,1
4B4-D7-Fab	3,2	+/-	1,1	0,3	+/-	0,3	1,3	+/-	0,6	0,0	+/-	0,0

Ejemplo 2: Secuencias CD123

2.1 Construcción de plásmidos de expresión de la fusión CD123 (IL3RA) -hFc (CD123-Fc)

Usando plásmidos que contienen ADNc como un molde, se generaron proteínas de fusión CD123 humana y de *Macaca fascicularis* en marco de lectura con la región constante de cadena pesada incluyendo un conector GS (usado en la proteína de Macaca), la región bisagra, dominios CH2 y CH3 de inmunoglobulina IgG humana que portan adicionalmente una etiqueta Strep-II (sólo en la versión de proteína humana).

Usando ADN genómico humano como molde, se amplificó el dominio extracelular de CD123 humana (IL3RA), incluyendo la secuencia señal. Los productos de PCR amplificados escindidos, y purificados resultantes se combinaron por ligación por PCR y se ligaron en el vector de expresión de mamíferos pXL por el método InFusion usando el sitio NheI y HindIII. La secuencia de la proteína de fusión resultante CD123 humana madura Fc etiquetada con Strep-II se describe bajo SEQ ID NO: 196. Los aminoácidos 1 a 284 corresponden a los aminoácidos 22 a 305 de la proteína CD123 humana de longitud completa de tipo salvaje (descrita en la presente memoria bajo SEQ ID NO: 194, disponible en la base de datos NCBI con el número de registro NP_002174.1) y así el dominio extracelular de CD123 humana.

Para clonar CD123 de *Macaca fascicularis* el ADNc se preparó a partir de sangre de una población de *Macaca fascicularis*. Usando este ADNc aislado como molde, se amplificó el dominio extracelular de CD123 Macaca (IL3ra), incluyendo la secuencia señal. Los productos de PCR amplificados escindidos y purificados resultantes se combinaron por ligación por PCR y se ligaron en el vector de expresión de mamíferos pXL por el método InFusion usando NheI y HindIII. La secuencia de la proteína de fusión resultante CD123 humana madura Fc etiquetada con Strep-II se describe bajo SEQ ID NO: 197. Los aminoácidos 1 a 284 corresponden a los aminoácidos 22 a 305 de la proteína CD123 de *Macaca fascicularis* de longitud completa de tipo salvaje (descrita en la presente memoria bajo SEQ ID NO: 195, disponible en la base de datos NCBI con el número de registro NP_002174.1) y así el dominio extracelular de CD123 humana.

2.2 Expresión y purificación de CD123-Fc humana y de *Macaca fascicularis*

Se transfectaron de forma transitoria células HEK293 Freestyle creciendo en cultivo en suspensión en F17 sin suero (Life) con el plásmido de expresión. La transfección se realizó usando el reactivo de transfección Cellfectin (Life). Las células se cultivaron a 37°C durante 7 días. El sobrenadante del cultivo que contenía la proteína recombinante se recogió por centrifugación y se clarificó por filtración (0,22µm).

Para la purificación, las variantes de la proteína de fusión Fc se capturaron en matriz de proteína A (GE) y se eluyeron por desplazamiento de pH. Después de pulir la proteína por SEC en PBS usando una Superdex 200 (GE) y una etapa de concentración por ultrafiltración final, la proteína se usó para ensayos adicionales.

10 **2.3 Evaluación de las afinidades tanto para CD123 humana y de *Macaca fascicularis* de IgG de rata de hibridoma**

El cribado de IgG anti-CD123 de rata para afinidades de unión para CD123 humano y reactividades cruzadas para CD123 de cino se realizó con sobrenadantes de hibridoma usando un Proteon XPR36 (Biorad) en una estrategia de cinética "one-shot".

15 Se estableció un ensayo de captura usando anti-IgG de rata de cabra (112-005-071, Jackson Immuno Research). El anticuerpo de captura se recubrió en chips GLC (176-5011, Biorad) a aprox. 8.000 RU en la dirección vertical usando el kit de acoplamiento de amina (176-2410, Biorad). La captura de las IgG de rata a aprox. 200 RU en la dirección vertical resultó en valores de Rmax de hasta 100 RU para CD123-Fc. Las
20 cinéticas de unión con la proteína de fusión CD123-Fc humana y de cino se midieron a 100 µl/min en la dirección horizontal con 120 seg. y 600 seg. para asociación y disociación, respectivamente. Las proteínas CD123-Fc se usaron en diluciones de dos veces de 6 nM a 100 nM. Se usó tampón PBSET (176-2730, Biorad) como el tampón de ensayo. La regeneración se consiguió por inyección de tampón 10mM Glicina pH 1,5
25 durante 18 seg a 30 µl/min. El procesamiento y análisis de los datos se realizaron usando software ProteonManager v3.0. El ajuste de los sensogramas se hizo con un modelo 1:1 de Langmuir. Se seleccionaron clones tomando como base las afinidades para CD123 humana con KD < 1 nM y reactividad cruzada con CD123 de cino.

30 **Fabs y CODV-Fabs**

Las afinidades de unión de anti-CD123 Fabs o CODV-Fabs se midieron usando un instrumento Biacore3000 (GE Healthcare). El tampón de ensayo fue HBS-EP (BR-1001-88, GE Healthcare). La captura de las proteínas de fusión CD123-Fc se consiguió

usando el kit de captura de anticuerpo humano (GE Healthcare). El anticuerpo de captura se acopló a chips CM5 (BR-1001-88, GE Healthcare) a aprox. 12.000 RU usando el kit de acoplamiento de amina (BR-100-50, GE Healthcare). Las proteínas de fusión CD123-Fc se capturaron a 10 μ l/min a aprox. 70 RU para rendir valores de Rmax de 30 RU. Las cinéticas de unión con los anti-CD123 Fabs o CODV-Fabs se midieron a 30 μ l/min durante 240 seg. y 600 seg. para la fase de asociación y disociación, respectivamente. Se usaron diluciones de dos veces de los Fabs de 3 a 200nM en tampón de ensayo. Todas las concentraciones de Fab se corrieron en duplicado junto con los blancos de tampón en duplicado para una doble referencia. La regeneración de la superficie de captura se realizó con una inyección de 1min de disolución 3M de MgCl₂ a 30 μ l/min. Para el análisis de los datos se usó el software BIAevaluation v.4.1 (GE Healthcare). Los datos se ajustaron globalmente usando un modelo 1:1 de Langmuir con transferencia de masa.

15 **Proteínas IgGs y CODV-Fc**

La medida de las afinidades de unión de proteínas anti-CD123 IgGs y CODV-Fc se realizó de forma análoga al ensayo de unión para Fabs y CODV-Fabs con la excepción del anticuerpo de captura. En este caso, se usó el anticuerpo clásico Strep-MAB (2-1507-001, IBA) para capturar CD123-Fc humana mediante su etiqueta StrepII. Aquí, la disolución de regeneración fue tampón 10mM Glicina pH2,0.

2.4 Generación de anticuerpos anti-CD123 con reactividad cruzada humano y de *Macaca fascicularis*

Se clonaron los ADNc de CD123 humanos y de *Macaca fascicularis* en vectores de inmunización patentados Aldevron (pB8 y VV8) respectivamente. Tres ratas del grupo de inmunización MR13-296 se inmunizaron con el vector de inmunización IL3RA-hum.-ECD (aa19-305). El suero inmune se tomó en el día 24 del protocolo de inmunización, después de 4 aplicaciones genéticas (IS24d-4). Los sueros, diluidos en PBS 3% FBS, se ensayaron por citometría de flujo usando células de mamífero transfectadas de forma transitoria con las variantes de ADNc de IL3RA humano y de cino, IL3RA-hum.ECD y IL3RA-hum.D3.

La reactividad específica de los sueros inmunes frente a células transfectadas con pB1-IL3RA-hum.ECD, así como con IL3RA-cino (pFF1262) y las células THP-1

pudo detectarse en todos los animales inmunizados cuando se comparó con células transfectadas con un ADNc irrelevante.

Las ratas con sueros positivos se sacrificaron y las células B se fusionaron con células de mieloma de ratón. Los hibridomas resultantes se cribaron en células HEK293 transfectadas con plásmidos de expresión de CD123 humano o de cinomolgus, en diferentes líneas celulares que expresan CD123 por citometría de flujo (datos mostrados en la tabla 10).

Las células diana se sembraron a 5×10^4 células en 50 μ l de Tampón de Tinción con FBS (BD Pharmingen) por pocillo en placas de cultivo en suspensión de 96 pocillos con fondo en U (Greiner bio-one).

Los sobrenadantes de hibridoma se diluyeron 1:3 de forma seriada en PBS (Invitrogen) y se añadieron 50 μ l de cada uno a las células a una concentración final máxima de 1 μ g/ml. El ensayo se incubó durante 45 min a 4°C.

Las células se lavaron dos veces con Tampón de Tinción con FBS y se añadió 1 μ g de anticuerpo secundario Anti-IgG de rata de cabra (H+L)-Alexa Fluor 488 (Invitrogen-Life Technologies, # MH10520) en 100 μ l de Tampón de Tinción con FBS por pocillo. El ensayo se incubó durante 15 min a 4°C y se lavó dos veces después de esto.

Las células se resuspendieron en 200 μ l de Tampón de Tinción con FBS por pocillo y se midieron usando el citómetro de flujo MACSQuant (Miltenyi Biotec) o LSRII (BD). Se realizaron análisis de datos adicionales usando el software FlowJo (Tree Star, Inc.). La lectura fue el porcentaje de células positivas para unión de anticuerpo. Las células tratadas sólo con el anticuerpo secundario pero no el primario se usaron para establecer las selecciones. Se calcularon curvas por XLfit (Algoritmo 205).

La unión específica de los clones a CD123 pudo mostrarse en la superficie de HEK293 transfectadas en comparación con células HEK293 no transfectadas en las que no pudo detectarse ninguna señal (datos no mostrados). La unión de los anticuerpos fue dependiente de la concentración con un valor CE50 que varió entre 0,4 y 17,7 ng/ml (tabla 9).

Tabla 9: Unión específica de CD123 de clones de IgG de rata en sobrenadantes de hibridoma detectada por citometría de flujo. La unión dependiente de concentración de anticuerpos se midió usando HEK293 transfectadas con CD123 como células diana y un anticuerpo secundario anti-IgG de rata de cabra (H+L)-Alexa Fluor 488. Se presentan los valores CE50 calculados de las curvas.

5

10

15

20

Anticuerpo	CE50 [ng/ml]
BFX - 1A6	6,4
BFX - 1E1	2,2
BFX - 2B8	5,5
BFX - 2F4	4,5
BFX - 2F8	3,4
BFX - 2H7	17,7
BFX - 3B10	2,0
BFX - 3E3	2,0
BFX - 5A5	10,1
BFX - 6B10	5,0
BFX - 6C10	6,1
BFX - 6D6	0,9
BFX - 8B11	0,4
BFX - 9B8	1,2
BFX - 9D7	0,9
BFX - 9F6	1,3
BFX - 9H2	14,9

Tabla 10: Datos de unión de anticuerpos CD123 a células que expresan CD123 y CD123 recombinante. Los datos de unión muestran las afinidades de anticuerpos CD123 frente a la proteína CD123 recombinante de seres humanos y mono cinomolgus. La unión en la superficie celular se detectó por citometría de flujo. SP2 se refiere a células que expresan la variante truncada en el N-terminal (región D1) de CD123. Los anticuerpos se ensayaron por Proteon XPR36 para su capacidad de competir con la unión de IL3 a CD123.

Clon	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (nM) Humano	KD (nM) Cino	Molm-13	THP-1	OCI-AML3	SP2	Basófilos	Bloqueo de IL3
1E1	4,6E+05	1,1E-04	0,23	0,72	+	+	+	+	+	-
2B8	6,6E+05	1,2E-05	0,018	0,77	+	+	+	+	+	-
2F8	1,3E+05	6,6E-05	0,53	0,51	+	+	+	-	+	+
3B10	2,2E+05	0,5E-05	0,21	0,27	+	+	+	-	+	+
3E3	1,6E+05	6,4E-05	0,4	0,12	+	+	+	-	+	+
5A5	1,3E+05	1,2E-04	1,1	0,05	+	+	+	+	+	-
6B10	2,3E+05	1,5E-05	0,15	0,1	+	+	+	+	+	-
6C10	1,8E+05	1,4E-04	0,75	0,79	+	+	+	+	+	-
8B11	4,7E+05	6,2E-06	0,01	0,1	+	+	+	+	+	-
9B8	1,5E+06	2,8E-04	0,19	0,17	+	+	+	+	+	+
9D7	1,0E+06	3,2E-04	0,3	0,07	+	+	+	+	+	+
9F6	1,8E+05	6,7E-06	0,04	0,5	+	+	+	+	+	-

2.5 Humanización de secuencias de anticuerpo anti-CD123 de rata

La humanización de los anticuerpos de rata se realizó por injerto de CDR o por el método 4D (US20110027266). Para el anticuerpo anti-CD3 de rata 3E3 la secuencia de línea germinal *Rattus* más cercana identificada fue IGHV2S48*01 y IGHJ3*01 para la región variable de cadena pesada y IGLV3S2*01 y IGKJ3*01 para la región variable de cadena ligera. El índice de germinalidad de rata calculado (sólo secuencias marco) es 94,51% para la VH y 98,9% para la VL.

Se comprobaron residuos potenciales problemáticos expuestos y se modificó un residuo en CDRH2.

Usando el método de injerto, se generó una variedad de variantes humanizadas tomando como base las secuencias de línea germinal humana más cercanas identificadas: IGHV4-59*05 y IGHJ4*01 para la VH (índice de germinalidad en marcos: 75,82%); IGLV6-57*01 y IGLJ3*01 para VL (índice de germinalidad en marcos: 72,22%).

Además del injerto de CDR, se usó el protocolo de humanización 4D (US20110027266) para humanizar los dominios variables de cadena ligera (VL) y pesada (VH) del anti-CD123 de rata 3E3. Se realizó una simulación de dinámicas moleculares (MD) en el modelo de homología 3D minimizado (hecho con MOE ; PDB usado: 1FLR) de anti-CD123 de rata 3E3 y se comparó con los 49 modelos humanos derivados de las siete cadenas ligeras representativas (vk1, vk2, vk3, vk4, vlambda1, vlambda2, vlambda3) y las siete cadenas pesadas representativas (vh1a, vh1b, vh2, vh3, vh4, vh5, vh6) diseñadas por LGCR/SDI y disponible en MOE.

Se han seleccionado dos modelos para la “humanización 4D”: VI3-vh4 con y VL3-VH2 con los mejores componentes tanto hidrofóbicos como electroestáticos e identidad de secuencia fuera de las CDR. Para la asociación por pares entre el dominio variable de anti-CD123 de rata 3E3 y los dos modelos seleccionados, las secuencias se alinearon tomando como base la superposición 3D óptima de los carbonos alfa de los modelos de homología correspondientes.

Ejemplo 3: Anticuerpos en el formato CODV-Fab biespecífico

3.1 Clonación de secuencias CD3 seleccionadas en combinación con anti-CD123 mAb 7G3 en el formato CODV-Fab biespecífico para estudiar su actividad conectora de células T

Las secuencias de anticuerpo CD3 seleccionadas, tales como I2C, mAb2 (Macrogenics) y los denominados “20G6-F3”, “4E7-C9”, “4B4-D7” y “18F5-H10” se

expresaron como Fabs anti-CD3 monoespecíficos. Dichas secuencias seleccionadas también se expresaron como CD3xCD123 CODV-Fabs biespecíficos usando secuencias del anticuerpo monoclonal 7G3, resultando en las construcciones CODV-Fab “I2Cx7G3” y los denominados “7G3x20G6”, “7G3x4E7”, “7G3x4B4” y “7G3x18F5”, como se describe
 5 adicionalmente en la sección “proteínas de unión semejantes a anticuerpo” anteriormente en la presente memoria. Las proteínas purificadas se usaron en un ensayo Biacore para comparar la afinidad frente a los complejos CD3ε/δ (datos presentados en la tabla 11). No pudieron detectarse cambios en las afinidades por análisis Biacore cuando las secuencias CD3 se introdujeron en el formato CODV-Fab biespecífico.

10

Tabla 11: Comparación de afinidades entre fragmentos Fab y CODV-Fabs frente a complejos CD3ε/δ de ser humano y mono cinomolgus

	Molécula	kon hu 1/Ms	koff hu 1/s	KD hu nM	KD ci nM
Fab- fragmentos	I2C	1,1E+07	1,3E-03	0,13	0,5
	mAb2	3,1E+05	4,3E-03	13,7	16,3
	BDW-20G6-F3	3,5E+04	2,7E-04	8	8
	BDX-4E7-C9	8,9E+04	1,5E-03	17	15
	BDW-4B4-D7	1,1E+05	2,9E-03	27	24
	BDX-18F5-H10	2,0E+05	1,8E-04	1	1
CODV-Fabs	7G3xI2C	4,0E+06	2,0E-03	0,5	0,4
	7G3x20G6	7,2E+04	5,1E-04	7	7
	7G3x4E7	1,2E+05	1,9E-03	16	10
	7G3x4B4	2,7E+05	4,4E-03	17	18

15 3.2 CODV-Fabs biespecíficos dirigidos frente a CD123 y CD3 median la muerte potente redirigida de células T

Dichos CODV-Fabs biespecíficos tienen la capacidad de localizar una célula T (uniendo dicha célula T a la parte de unión de CD3 de un CODV-Fab que se une a CD3) a la localización de una célula tumoral (uniendo dicha célula de cáncer a la parte CD123
 20 del CODV-Fab). La célula T localizada puede mediar la muerte de la célula tumoral en un

proceso denominado en la presente memoria muerte "redirigida". Se construyeron CODV-Fab biespecíficos, específicos para CD123 y CD3, que tienen los dominios variables anti-CD123 del anticuerpo monoclonal 7G3 y los dominios variables anti-CD3 de anticuerpos CD3 seleccionados generados en el ejemplo 1.

5 Por lo tanto, se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de 200 ml de sangre periférica de donantes sanos tratado con EDTA por centrifugación de densidad Ficoll. Se precargaron 15 ml de Histopaque (Sigma-Aldrich) en un Tubo de 50 ml Leucosep (Greiner bio-one). La sangre se diluyó con Tampón de Lavado autoMACS + 1% BSA (Miltenyi Biotec) y se cargó en la membrana de un total de diez tubos
10 preparados. Los tubos se centrifugaron sin freno durante 10 min a 1.000 xg. Las PBMC se recogieron y lavaron con Tampón de Lavado autoMACS + 1% BSA tres veces. Finalmente, las PBMC se resuspendieron en Tampón de Corrida autoMACS (Miltenyi Biotec) para el aislamiento de linfocitos T por tecnología autoMACSpro usando el Kit de aislamiento Pan T Cell (Miltenyi Biotec) según las instrucciones del fabricante. La pureza
15 de las células T separadas se analizó por citometría de flujo MACSQuant usando el Kit de Inmunofenotipado humano de 7 Colores (Miltenyi Biotec).

El efecto conector de células T de los anticuerpos biespecíficos se analizó por un ensayo citotóxico basado en citometría de flujo. Las células diana (es decir, línea celular THP-1) se tiñeron durante 15 min a 37°C con 1 μ M CFSE en 1 ml RPMI + GlutaMAX I
20 (Gibco) por 1E7 células. Después de esto, las células se lavaron dos veces y se resuspendieron en RPMI + GlutaMAX I + 10% FCS (Invitrogen). Se sembraron 2,5E4 células diana en placas de cultivo en suspensión de fondo en U de 96 pocillos (Greiner bio-one) en 50 μ l de medio por pocillo.

Los linfocitos T primarios humanos aislados se resuspendieron en RPMI +
25 GlutaMAX I + 10% FCS y se añadieron a la proporción efector a diana indicada en 50 μ l por pocillo a las células diana (en general E:T=10:1).

Los anticuerpos biespecíficos se diluyeron 1:3 de forma seriada en PBS (Invitrogen) y se añadieron 5 μ l de cada uno a las células a una concentración final máxima de 3.000 ng/ml. El ensayo se incubó durante 20 h a 37°C en 5% CO₂.

30 Para detectar células diana muertas, todas las células se tiñeron con 7-AAD. Por lo tanto, se añadieron 5 μ g/ml 7-AAD diluido en Tampón de Tinción con FBS (BD Pharmingen) a cada pocillo y se incubaron durante 15 min a 4°C en oscuridad. Las células se midieron usando el citómetro de flujo MACSQuant (Miltenyi Biotec) o LSRII (BD), respectivamente. Se realizaron análisis de datos adicionales usando el software

FlowJo (Tree Star, Inc.). La lectura fue el porcentaje de células doble positivas para CFSE y 7-AAD.

Los resultados de estas investigaciones mostrados por ejemplo en las tablas 20 a 22 demuestran la capacidad de los CD123xCD3 CODV-Fabs para mediar la muerte redirigida de células tumorales.

3.3 Evaluación de seguridad de la muerte redirigida por células T

El efecto de los anticuerpos biespecíficos en el estado de la activación de células T como resultado de seguridad se analizó por citometría de flujo tomando como base la detección de la expresión del marcador de activación CD25 y CD69 en la superficie de células T primarias humanas.

Se resuspendieron linfocitos T primarios humanos aislados en RPMI + GlutaMAX I (Gibco) + 10% FCS (Invitrogen) y se sembraron 2,5E5 células en placas de cultivo en suspensión de fondo en U de 96 pocillos (Greiner bio-one) en 50 µl por pocillo.

Bien se ensayaron células T exclusivamente y los pocillos se llenaron con 50 µl RPMI + GlutaMAX I + 10% FCS, o se añadieron células diana (es decir, línea celular THP-1) a 2,5E4 células por pocillo en 50 µl RPMI + GlutaMAX I + 10% FCS.

Los anticuerpos biespecíficos se diluyeron 1:3 de forma seriada en PBS (Invitrogen) y se añadieron 5 µl de cada uno a las células a una concentración final máxima de 30.000 ng/ml. El ensayo se incubó durante 20 h a 37°C en 5% CO₂.

Después del tiempo de incubación, las células se sedimentaron y se tiñeron durante 15 min a 4°C en 100 µl de Tampón de Tinción con FBS (BD Pharmingen) por pocillo con los anticuerpos marcados siguientes: CD4-PE, CD8-APC-Cy7, CD25-APC, CD69-PE-Cy7

Como control de Fluorescencia Menos Uno (FMO) se tiñeron células T activadas control como se ha descrito anteriormente pero CD25 se reemplazó por su isotipo (isotipo APC-IG1k) en un tubo y CD69 se reemplazó por su isotipo (isotipo PE-Cy7-IG1k) en un segundo tubo.

Las células se lavaron dos veces después de la tinción, se resuspendieron en 150 µl de Tampón de Tinción con FBS, y 5.000 células se midieron usando el citómetro de flujo LSR II (BD). Se realizaron análisis de datos adicionales usando el software FlowJo (Tree Star, Inc.). La lectura fue el porcentaje de células T CD4posCD25pos, CD4posCD69pos, CD8posCD25pos, y CD8posCD69pos. Las selecciones se establecieron según los controles FMO (véase la tabla 12).

Tabla 12: Actividad de CD123 x CD3 CODV-Fabs medida en un ensayo citotóxico y seguridad medida por la expresión de CD69

Molécula	Actividad CE50 [ng/ml]	Seguridad Expresión de CD69 %células/%max
7G3 x I2C	20 ± 9	25,8 ± 7,6
7G3 x OKT3	16 ± 5	25,5 ± 8,0
7G3 x 20G6	18 ± 5	8,7 ± 0,8
7G3 x 4E7	12 ± 3	12,3 ± 2,5
7G3 x 4B4	11 ± 2	11,6 ± 0,8
7G3 x 18F5	61 ± 15	9,8 ± 1,1

5 3.4 Humanización de secuencias de anticuerpo anti-CD3 de rata y anticuerpos biespecíficos

La humanización de los anticuerpos de rata se realizó por injerto de CDR o por el método 4D (US20110027266).

10 Para el anticuerpo anti-CD3 de rata “20G6” se identificaron las secuencias de línea germinal de Rattus más cercanas como IGHV6S17*01 y IGHJ2*01 (para la región variable de cadena pesada y IGKV1S21*01 y IGKJ4*01 para la región variable de cadena ligera). El índice de germinalidad de rata calculado (sólo secuencias marco) es 97,80% para la VH y 95,5% para la VL.

15 Se generó una variedad de variantes humanizadas usando el método de injerto basado

- 1) en las secuencias de línea germinal humana más cercanas identificadas IGHV3-30-01_IGHJ4-01 para la VH con un índice de germinalidad en marco de 77%; IGK2D-29-02_IGKJ4-01 para la VL con un índice de germinalidad en marco de 80%), o
- 20 2) o basado en la secuencia de línea germinal más cercana identificada que tiene un PI menor IGVH3-48*02-IGHJ4-01 para la VH con un índice de germinalidad en marco de 75% ; IGKV2-28*01-IGKJ4-01 para la VL con un índice de germinalidad en marco de 77,5%, o

3) que consiste en una secuencia de línea germinal humana más distante (cambio en el subtipo de línea germinal) (IGVH1-46*01-IGHJ4*01 para la VH con un índice de germinalidad en marco de 56%; IGKV4*01-IGKJ4*01 para la VL con un índice de germinalidad en marco de 67,5%).

5 Las secuencias humanizadas se introdujeron en el formato CODV-Fab del denominado CODV-Fab “7G3 x 20G6” en combinación con la secuencia anti-CD123 del anticuerpo 7G3 como se ha descrito anteriormente. Se usaron CD123 x CD3 CODV-Fabs purificados en un ensayo Biacore para evaluar la afinidad para CD3 ϵ/δ (véase la tabla 13).

10

Tabla 13: Afinidad de variantes humanizadas seleccionadas del anticuerpo anti-CD3 20G6 para el complejo CD3 ϵ/δ recombinante.

Combinaciones de secuencias humanizadas usadas en el CODV-Fab “7G3 x 20G6”	ka (1/Ms)	kd (1/s)	Rmax (RU)	KD (M)
secuencia parental	2,17E+04	5,71E-04	46	2,63E-08
VL1A_VH1A	2,86E+04	4,34E-03	46	1,52E-07
VL1B_VH1A	2,99E+04	4,14E-03	45	1,38E-07
VL1C_VH1D	2,30E+04	1,01E-03	58	4,40E-08
VL1D_VH1B	1,86E+04	1,09E-03	62	5,87E-08
VL1D_VH1C	2,22E+04	7,13E-04	71	3,21E-08
VL1D_VH1D	2,40E+04	7,46E-04	59	3,10E-08

15

Para el anticuerpo anti-CD3 de rata 4B4-D7 la secuencia de línea germinal de Rattus más cercana se identificó como IGHV6S17*01 (identidad de 93%) y IGHJ2*01 (identidad de 87,5%) para la región variable de cadena pesada y IGKV1S21*01 (identidad de 93%) y IGKJ4*01 (identidad de 100%) para la región variable de cadena ligera.

El porcentaje de identidad calculado de las secuencias V de Rattus identificadas respecto a la Germinalidad Humana (sólo secuencias marco) es 79% para la VH y 77,53% para la VL.

Se generó una variedad de parejas variantes humanizadas para VH y VL por injerto con modificación por ingeniería de secuencias adicional, usando las secuencias de línea germinal humana más cercanas (IGHV3-30*01_IGHJ6*02; IGKV2-30*02/IGKV2D-39*02_IGKJ2*01). Los porcentajes de Germinalidad humana calculados (sólo 4 secuencias marco IMGT) para las secuencias V humanizadas se listan en la tabla 14.

- 10 **Tabla 14: Porcentajes de Germinalidad Humana para secuencias V humanizadas obtenidas por injerto del anticuerpo denominado “B4-D7”.** Los porcentajes se calcularon tomando como base sólo las 4 secuencia marco IMGT.

Variantes “4B4—D7” injertadas	% índice de germinalidad humana
VL1Cmodif1	92,1
VL1Cmodif2	91,0
VL1Cmodif3	91,0
VL1Amodif1	97,8
VL1Amodif2	96,6
VL1Amodif3	95,5
VL2C	95,5
VL2D	96,7
VL2F	96,7
VH6Bmodif1	92,3
VH6Bmodif2	90,1
VH6Amodif1	94,5
VH6Amodif2	92,3
VH6Amodif3	91,2
VH6C	95,5
VH6D	93,5

- 15 Además del injerto de CDR, se usó el protocolo de humanización 4D como se describe en la solicitud de patente US US20110027266 para humanizar los dominios variables ligero (VL) y pesado (VH) de anti-CD3 de rata 4B4-D7. Se realizó una simulación de dinámicas moleculares (MD) en el modelo de homología 3D minimizado

(hecho con MOE ; PDB usado: 1FLR) de anti-CD3 de rata 4B4-D7 y se comparó con los 49 modelos humanos derivados de las siete cadenas ligeras representativas (vk1, vk2, vk3, vk4, vlambda1, vlambda2, vlambda3) y las siete cadenas pesadas representativas (vh1a, vh1b, vh2, vh3, vh4, vh5, vh6) diseñadas por LGCR/SDI y disponible en MOE.

- 5 Se seleccionaron dos modelos para la “humanización 4D”: vk1-vh6 con la similitud 4D más alta, con componentes tanto hidrofóbicos como electroestáticos. vk2-vh3 con la identidad de secuencia más alta fuera de las CDR. Para la asociación por pares entre el dominio variable de anti-CD123 de rata 4B4-D7 y los dos modelos seleccionados, las secuencias se alinearon tomando como base la superposición 3D óptima de los carbonos
- 10 alfa de los modelos de homología correspondientes. Se optimizó adicionalmente una variedad de otras parejas de variantes humanizadas para VH y VL.

Los porcentajes de Germinalidad Humana calculados (sólo 4 secuencias marco IMGT) para las secuencias V humanizadas se listan en la tabla 15.

- 15 **Tabla 15: Porcentajes de Germinalidad Humana para secuencias V humanizadas obtenidas por humanización 4D del anticuerpo denominado “B4-D7”.** Los porcentajes se calcularon tomando como base sólo las 4 secuencia marco IMGT.

Variantes “4B4—D7” 4D	% índice de germinalidad humana
VL1A	75
VL1B	75
VL2A	83
VL2B	83
VH1A	80
VH1B	80
VH2A	80
VH2B	84,5

- 20 Las secuencias humanizadas se expresaron como fragmentos Fab y se purificaron seguido de un ensayo Biacore para evaluar la afinidad para CD3ε/δ (datos mostrados en la tabla 16).

Tabla 16: Afinidad de variantes humanizadas seleccionadas del anticuerpo anti-CD3 4B4-D7 para el complejo CD3 ϵ / δ recombinante.

Fab	VL	VH	Ligando	ka	kd	KD
4B4			huCD3	3,26E+05	2,85E-03	8,79E-09
			ciCD3	1,90E+05	2,37E-03	1,26E-08
4B4_1	VL1a 75%	VH1B 80%	huCD3	6,28E+05	1,74E-03	2,77E-09
			ciCD3	5,06E+05	1,58E-03	3,13E-09
4B4_2	VL1b 75%	VH1B 80%	huCD3	2,86E+05	2,14E-03	7,48E-09
			ciCD3	2,77E+05	2,10E-03	7,57E-09
4B4_5	VL2C 95,5%	VH6D 93,5%	huCD3	2,33E+05	4,23E-03	1,82E-08
			ciCD3	2,53E+05	4,20E-03	1,66E-08
4B4_6	VL1a 75%	VH1A 80%	huCD3	1,50E+06	1,85E-03	1,24E-09
			ciCD3	1,49E+06	1,77E-03	1,19E-09
4B4_7	VL1b 75%	VH1A 80%	huCD3	3,06E+05	2,48E-03	8,10E-09
			ciCD3	3,01E+05	2,19E-03	7,28E-09
4B4_9	VL2B 83%	VH2A 80%	huCD3	2,18E+05	2,91E-03	1,34E-08
			ciCD3	2,85E+05	3,44E-03	1,21E-08
4B4_10	VL1_CM2 91%	VH6_BM2 90%	huCD3	4,34E+05	3,99E-03	9,19E-09
			ciCD3	4,30E+05	3,84E-03	8,94E-09
4B4_11	VL1_CM3 91%	VH6_BM2 90%	huCD3	5,66E+05	7,74E-03	1,37E-08
			ciCD3	2,38E+05	4,86E-03	2,04E-08
4B4_17	VL2A 83%	VH2B 84,5%	huCD3	3,10E+05	2,76E-03	8,91E-09
			ciCD3	2,98E+05	2,70E-03	9,07E-09
4B4_20	VL2F 96,5%	VH6C 95,5%	huCD3	5,09E+04	1,71E-03	3,35E-08
			ciCD3	4,56E+04	1,98E-03	4,34E-08

3.5 Unión de CODV hu-Fab CD123 x CD3 a células THP-1 y TF-1

- 5 Las secuencias de anticuerpos CD123 seleccionados se clonaron en el formato CODV-Fab en combinación con una secuencia de unión CD3 y las proteínas se expresaron y purificaron.

Su capacidad de unión a células que expresan naturalmente CD123 se determinó por citometría de flujo. La línea celular THP-1 o la línea celular TF-1 se usó como células diana.

Las células diana se bloquearon con Bloqueador de FcR (Sigma). Por lo tanto, las células diana se resuspendieron en Tampón de Tinción con FBS (BD Pharmingen) y se bloquearon con 100 µl de reactivo de bloqueo por ml durante 1 h a 4°C. Las células se llenaron con Tampón de Tinción con FBS y se sembraron 1E5 células en 50 µl por pocillo en placas de cultivo en suspensión de 96 pocillos con fondo en U (Greiner bio-one).

Los anticuerpos se añadieron a 3 µg en 50 µl de Tampón de Tinción con FBS por pocillo.

El ensayo se incubó durante 30 min a 4°C.

Las células se lavaron dos veces con Tampón de Tinción con FBS y se añadió 1 µg de anticuerpo secundario F(ab')₂ de cabra Anti-kappa humana-FITC (Beckman Coulter, #732621) por pocillo en 100 µl de Tampón de Tinción con FBS por pocillo. El ensayo se incubó durante 20 min a 4°C y se lavó dos veces después de esto.

Las células se resuspendieron en 150 µl de Tampón de Tinción con FBS por pocillo y se midieron usando el citómetro de flujo MACSQuant (Miltenyi Biotec) o LSRII (BD). Se realizaron análisis de datos adicionales usando el software FlowJo (Tree Star, Inc.). La lectura fue el porcentaje de células positivas para unión de anticuerpo. Las células tratadas sólo con el anticuerpo secundario pero no el primario se usaron para establecer las selecciones.

La unión de CD123xCD3 CODV-Fabs a CD123 se mostró con dos líneas celulares diferentes que expresan CD123 bien con co-expresión de CD131 en la línea celular TF-1 o en la superficie de células THP-1 que carecen de expresión de CD131. Se muestran de forma ejemplar cinco clones diferentes que se unen a células diana. Como control negativo (control de especificidad) se usó un CD19xCD3 CODV-Fab y un CD123xCD3 CODV-Fab de referencia como control positivo (tabla 17).

Tabla 17: Unión específica de secuencias dirigidas a CD123 clonadas en un núcleo CODV-Fab en combinación con una secuencia de unión a CD3 a las líneas celulares THP-1 y TF-1. La unión de los anticuerpos se detectó usando THP-1 y TF-1 que expresan CD123 como células diana. Se añadieron 3 µg de anticuerpo y se detectó por un anticuerpo secundario anti-kappa humana-FITC de cabra. Se muestran los porcentajes de células diana positivas para anticuerpo.

Anticuerpo	% de Células positivas FITC	
	Células THP-1	Células TF-1
control de medio	0,10	0,00
control de AB sec.	0,00	0,20
control de especificidad CD19 x CD3	0,10	0,20
CODV-Fab CD123 x CD3	99,90	82,50
CODV-Fab BFX-2F8-D6 x CD3	24,00	9,30
CODV-Fab BFX-3E3-D3 x CD3	99,00	31,60
CODV-Fab BFX-9B8-G6 x CD3	48,80	31,10
CODV-Fab BFX-9D7-C8 x CD3	88,70	50,20
CODV-Fab BFX-9F6-G3 x CD3	99,70	60,70

3.6 Efecto citotóxico para células THP-1 mediado por CODV-Fab CD123 x CD3

Los efectos conectores de células T de anticuerpos biespecíficos que consisten en una nueva secuencia CD123 generada y la misma secuencia de unión a CD3 se analizaron por un ensayo de citotoxicidad basado en citometría de flujo. Las células efectoras fueron células T primarias aisladas de sangre completa de donantes sanos. Las células THP-1 se usaron como células diana que expresan CD123.

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de 200 ml de sangre periférica de donantes sanos tratado con EDTA por centrifugación de densidad Ficoll. Se precargaron 15 ml de Histopaque (Sigma-Aldrich) en un Tubo de 50 ml Leucosep (Greiner bio-one). La sangre se diluyó con Tampón de Lavado autoMACS + 1% BSA (Miltenyi Biotec) y se cargó en la membrana de un total de diez tubos preparados. Los tubos se centrifugaron sin freno durante 10 min a 1.000 xg. Las PBMC se recogieron y lavaron con Tampón de Lavado autoMACS + 1% BSA tres veces. Finalmente, las PBMC se resuspendieron en Tampón de Corrida autoMACS (Miltenyi Biotec) para el

aislamiento de linfocitos T por tecnología autoMACSpro usando el Kit de aislamiento Pan T Cell (Miltenyi Biotec) según las instrucciones del fabricante. La pureza de las células T separadas se analizó por citometría de flujo MACSQuant usando el Kit de Inmunofenotipado humano de 7 Colores (Miltenyi Biotec).

- 5 Las células diana (es decir, línea celular THP-1) se tiñeron durante 15 min a 37°C con 1 μ M CFSE en 1 ml RPMI + GlutaMAX I + 10% FCS (Invitrogen). Se sembraron 2,5E4 células diana en placas de cultivo en suspensión de fondo en U de 96 pocillos (Greiner bio-one) en 50 μ l de medio por pocillo.

- 10 Los linfocitos T primarios humanos aislados se resuspendieron en RPMI + GlutaMAX I + 10% FCS y se añadieron a la proporción efector a diana indicada en 50 μ l por pocillo a las células diana (en general E:T=10:1).

Los anticuerpos biespecíficos se diluyeron 1:3 de forma seriada en PBS (Invitrogen) y se añadieron 5 μ l de cada uno a las células a una concentración final máxima de 3.000 ng/ml. El ensayo se incubó durante 20 h a 37°C en 5% CO₂.

- 15 Para detectar células diana muertas, todas las células se tiñeron con 7-AAD. Por lo tanto, se añadieron 5 μ g/ml 7-AAD diluido en Tampón de Tinción con FBS (BD Pharmingen) a cada pocillo y se incubaron durante 15 min a 4°C en oscuridad. Las células se midieron usando el citómetro de flujo MACSQuant (Miltenyi Biotec) o LSRII (BD), respectivamente. Se realizaron análisis de datos adicionales usando el software
20 FlowJo (Tree Star, Inc.). La lectura fue el porcentaje de células doble positivas para CFSE y 7-AAD. Se calcularon curvas por XLfit (Algoritmo 205).

- Como se muestra de forma ejemplar en la tabla 18 los anticuerpos biespecíficos fueron capaces de conectar células T primarias y lisar células diana THP-1 in vitro. Pudo detectarse un incremento dependiente de la concentración de anticuerpo de células diana
25 muertas después de una co-incubación de 20 h. Para los anticuerpos mostrados aquí, se calcularon valores CE50 que varían entre 12,2 y 429,3 ng/ml.

Tabla 18: Efecto conector de células T de CODV-Fab CD123 x CD3 biespecífico detectado en ensayos citotóxicos basados en citometría de flujo. Se presentan valores CE50 medios calculados de las curvas.

Anticuerpo	CE50 [ng/ml] mediageo +/- SEM (n=4)			CE50 [nM] mediageo +/- SEM (n=4)			n
CODV-Fab BFX-2B8-F3 x CD3	106,9	+/-	33,9	1420,5	+/-	450,2	4
CODV-Fab BFX-3E3-D3 x CD3	12,2	+/-	5,9	163,0	+/-	80,1	4
CODV-Fab BFX-6B10-E4 x CD3	39,7	+/-	17,9	529,1	+/-	237,7	4
CODV-Fab BFX-9B8-G6 x CD3	106,1	+/-	36,1	1410,2	+/-	479,8	4
CODV-Fab BFX-9D7-C8 x CD3	86,3	+/-	29,3	1148,6	+/-	390,5	4
CODV-Fab BFX-9F6-G3 x CD3	13,9	+/-	7,7	185,9	+/-	104,1	3
CODV-Fab BFX-3B10-E6 x CD3	429,3	+/-	82,6	5709,3	+/-	1099,0	2

- 5 El clon CD123 3E3 se combinó con una variante humanizada del anticuerpo anti-CD3 4B4 en el formato CODV-Fab. Se analizó su efecto conector de células T y su capacidad para activar células T *in vitro*.

- Se realizaron ensayos citotóxicos como se ha descrito anteriormente. El efecto lítico de células T primarias humanas para célula diana THP-1 mediado por estas construcciones se muestra de forma ejemplar en la tabla 20 por CODV-Fab hz4B4(4D_A)x3E3. La actividad citotóxica pudo inducirse de manera fiable con un efecto dependiente de concentración con células T aisladas de siete donantes sanos diferentes (tabla 19).

- 15 **Tabla 19: Efecto conector de células T de CODV-Fab hz4B4(4D_A) x 3E3 biespecífico detectado en un ensayo citotóxico basado en citometría de flujo.** Se presentan valores CE50 medios calculados de las curvas.

CODV-Fab	Citotoxicidad (THP-1)			Citotoxicidad (THP-1)		
	mediageo CE50 [pM] +/- SEM n=7			mediageo CE50 [ng/ml] +/- SEM n=7		
hz4B4(4D_A) x 3E3 CODV-Fab	26,5	+/-	5,9	2,0	+/-	0,5

3.7 Efecto activador de células T de CODV-Fab o DART CD123xCD3

El efecto de los anticuerpos biespecíficos en el estado de la activación de células T como resultado de seguridad se analizó por citometría de flujo tomando como base la detección de la expresión del marcador de activación CD25 y CD69 en la superficie de células T primarias humanas, como se ha descrito anteriormente. La comparación incluyó el fragmento divalente bi-específico CD123 x CD3 de cadena única en formato DART (denominado en la presente memoria "MGD006") que se describió en WO2015026892 como que comprende una primera cadena polipeptídica de secuencia SEQ ID NO:386 (que es SEQ ID NO:1 como se muestra en WO2015026892) y una segunda cadena polipeptídica de secuencia SEQ ID NO:387 (que es SEQ ID NO:3 como se muestra en WO2015026892) unidas covalentemente entre sí por un enlace disulfuro.

Cuando los CODV-Fabs se incubaron con células T aisladas solo no pudo detectarse ningún incremento significativo en la expresión del marcador de activación tardío CD25 en la superficie de células T positivas para CD4 y positivas para CD8 (datos no mostrados). Igualmente, no hubo ningún incremento dependiente de la concentración en el nivel de expresión del marcador de activación temprano CD69 en ambos subconjuntos de células T (tabla 20). Por lo tanto, la construcción se evaluó como no activa (NA). Por el contrario, fue mensurable un incremento enorme en el nivel de expresión de ambos marcadores cuando se añadieron células diana THP-1 (datos de CD25 no mostrados, datos de CD69 en la tabla 21).

- 5 **Tabla 20: Efecto de CODV- Fab o DART CD123 x CD3 biespecífico en el estado de activación de células T detectado por el nivel de expresión de CD69 en un ensayo basado en citometría de flujo.** Se presentan los porcentajes medios de células T CD8 y CD4 activadas a una concentración de anticuerpo de 100nM y Concentración-Efecto-Min en ensayos con células T exclusivamente.

CODV-Fab	Seguridad - activación de células T sin células diana n=3											
	CD4+/CD69+ % Activación normalizada respecto a PBS C=100nM media +/- SEM			CD4+/CD69+ Conc-Efecto-Min [pM] media +/- SEM			CD8+/CD69+ % Activación normalizada respecto a PBS C=100nM media +/- SEM			CD8+/CD69+ Conc-Efecto-Min [pM] media +/- SEM		
hz4B4(4D_A)x3E3 CODV-Fab	14	+/-	2		NA		13	+/-	2		NA	
hz20G6xhz7G3 CODV-Fab	22	+/-	2				22	+/-	2			
hz20G6xhz7G3 CODV-Fab-TL1	18	+/-	4				15	+/-	2			
hz20G6xhz7G3 CODV-Fab-OL1	6	+/-	2				9	+/-	2			
Anticuerpo de cadena única Formato DART MGD006	82	+/-	9				83	+/-	4			

- 10 Los resultados mostrados en la Tabla 20 indican que el anticuerpo de dominio único (DART) causa significativamente más activación de células T en ausencia de células diana en las condiciones ensayadas.

Tabla 21: Efecto de CODV- Fab hz4B4(4D_A) x 3E3 biespecífico en el estado de activación de células T detectado por el nivel de expresión de CD69 en un ensayo basado en citometría de flujo. Se muestran los porcentajes medios de células T CD8 y CD4 activadas a concentración de anticuerpo máxima (Cmax) y a la concentración de anticuerpo a CE50 en ensayo citotóxico. Los ensayos se realizaron con co-incubación de células diana THP-1 y células T.

CODV-Fab	Seguridad - activación de células T con células diana THP-1 n=3											
	CD4+/CD69+ % Activación normalizada respecto a PBS C=mediaCE50 Citotox media+/- SEM			CD4+/CD69+ % Activación normalizada respecto a PBS Cmax media +/- SEM			CD8+/CD69+ % Activación normalizada respecto a PBS C=mediaCE50 Citotox media+/- SEM			CD8+/CD69+ % Activación normalizada respecto a PBS Cmax media +/- SEM		
hz4B4(4D_A)x3E3 CODV-Fab	71	+/-	4	84	+/-	2	69	+/-	6	82	+/-	4

Tabla 22: Efecto de 7G3 bi-específico totalmente humanizado que contiene moléculas CODV y Dart de cadena única en el estado de activación de células T detectado por el nivel de expresión de CD69 en un ensayo basado en citometría de flujo. Se muestran los valores CE50 de ensayos representativos de células T CD8 y CD4 activadas en ensayo citotóxico. Los ensayos se realizaron con co-incubación de células diana THP-1 y células T.

CODV-Fab	Seguridad - activación de células T con células diana THP-1	
	CD4+ células T (% CD69+ células) CE50 (pM) n=1-6	CD8+ células T (% CD69+ células) CE50 (pM) n=1-6
hz20G6xhz7G3 CODV-Fab	1,4	3,1
hz20G6xhz7G3 CODV-Fab-TL1	3,2	9,9
hz20G6xhz7G3 CODV-OL1	1,0	3,3
Anticuerpo de cadena única Formato DART MGD006	1,0	3,5

Con el fin de evaluar los efectos citotóxicos de los nuevos anticuerpo CD123 con partes CD3 humanizadas, se generaron los CODV-Fabs “hz20G6x7G3”, “7G3xhz4B4”, “hz4B4x3E3” que contienen diferentes combinaciones de Fvs. También se generó una variante que contiene Fc, la CODV-Fab “hz20G6x7G3-TL4” estando Fc etiquetado en la cadena ligera para formar heterodímeros de Fc con la cadena pesada correspondiente (variante TL4). Las afinidades para el complejo CD3 ϵ / δ y CD123 de la construcción biespecífica se midieron por Biacore. Además, se realizó un ensayo citotóxico como se ha descrito anteriormente y se midió la activación de CD4+ y la activación de CD8+.

Tabla 23: Afinidades y actividades de moléculas CODV CD123 x CD3 biespecíficas.

Molécula biespecífica	KD (CD3 ϵ /d) [nM]	KD (CD123) [nM]	Ensayo citotóxico (células THP) CE50 [pM]	Expresión de CD69 a CE50 citotox	
				% activación CD4+	% activación CD8+
hz20G6 x 7G3 CODV-Fab	5,0	0,6	30,9 $\pm$ 3,6	73	66
7G3 x hz4B4 CODV-Fab	5,4	0,1	26,7 $\pm$ 2,9	65	55
hz4B4 x 3E3 CODV-Fab	7,0	4,8	26,5 $\pm$ 5,9	71	69
Variante TL4 etiquetada Fc: hz20G6 x 7G3 CODV-Fab-TL4	13,9	1,7	16,7 $\pm$ 10,1	73	74

También se evaluaron los efectos citotóxicos de los CODV-Fab “hz20G6xhz7G3”, CODV-Fab-TL1 “hz20G6xhz7G3”, CODV-Fab-OL1 “hz20G6xhz7G3” y el Dart de cadena única MGD006. Las afinidades para el complejo CD3 ϵ / δ y CD123 de cada construcción biespecífica se midieron por Biacore. Además, se realizó un ensayo citotóxico como se ha descrito anteriormente y se midió la activación de CD4+ y activación de CD8+.

Tabla 24: Afinidades y actividades de moléculas CODV y DART (MGD006) biespecíficas CD123 x CD3

Molécula biespecífica	KD (CD3e/d) [nM]	KD (CD123) [nM]	Ensayo citotóxico (células THP) CE50 [pM] n= 3
hz20G6xhz7G3 CODV-Fab	9	0,2	2,1+/-0,2
hz20G6xhz7G3 CODV-Fab-TL1	11	0,2	1,0+/-0,1
hz20G6xhz7G3 CODV-Fab-OL1	15	0,4	0,9+/-0,1
Anticuerpo de cadena única Formato DART MGD006	9	0,2	0,3+/-0,04

- 5 Para evaluar el potencial de las moléculas para desencadenar la activación de las células T en presencia (deseada) y ausencia (no deseada) de células diana, se implementó un nuevo ensayo. Se incubaron células Jurkat NFAT-RE-luc2 (Promega células #CS176403) con células T humanas recién aisladas en una proporción efector diana de 1:1 a 37°C y 5% CO₂ en RPMI 1640, con 2 g/L (11 mM) Glucosa, con
- 10 GlutaMAX, con 25 mM HEPES en placas de 386 pocillos. Después de 5 horas, la incubación se paró y se midió la luminiscencia usando el Sistema de Ensayo de Luciferasa Bio-Glo, Promega #G7940 en un Lector de Micro Placas de Luminiscencia HTS.

Tabla 25: Activación de células T como activación inducida por moléculas CODV y MGD006 CD123 x CD3 y medida en la línea celular informadora Jurkat-NFAT-Luc.

Molécula biespecífica	Con células THP1 CE50 (pM) n= 3	Sin células diana Activación a Cmax en relación a activación max. en ensayo con células diana (%) n= 3
hz20G6xhz7G3 CODV-Fab	561±0,2	0,2±0,1
hz20G6xhz7G3 CODV-Fab-TL1	444±0,2	0,4±0,3
hz20G6xhz7G3 CODV-Fab-OL1	320±0,2	0,4±0,3
Anticuerpo de cadena única Formato DART MGD006	370±0,2	25,1±9,9

- 5 Los resultados mostrados en la Tabla 25 indican que todos los anticuerpos inducen la activación de las células informadoras con valores CE50 por debajo de nM en presencia de células diana. Para las estrategias de conexión de células T, la activación de las células T debería estar restringida a la presencia de células diana. Esto se observa para las moléculas CODV ya que no hay una señal de luminiscencia significativa en
- 10 ausencia de células diana. Por el contrario, la molécula DART de cadena única induce una mayor activación de la línea celular informadora en ausencia de células diana. Estos resultados concuerdan con los resultados obtenidos con células T primarias.

15 3.8 Actividad anti-tumoral *in vivo* de CODV-Fab-TL1 Biespecífico CD123xCD3 y CODV-Fab Biespecífico CD123xCD3

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento de de PBMC y células T humanas de sangre completa

- Las PBMC se aislaron de la sangre completa de donantes humanos sanos con una centrifugación en gradiente Ficoll. La sangre completa se diluyó 1:1 en disolución
- 20 salina tamponada con fosfato (PBS) estéril. Después, se pusieron dos volúmenes de treinta y cinco mL de la sangre diluida en dos Tubos Falcon de 50 mL en presencia de 15 mL de Ficoll-Paque. Los tubos se centrifugaron a 200g durante 40 minutos a temperatura ambiente sin freno. Las dos capas leuco-plaquetarias se recuperaron y se pusieron en seis tubos Falcon de 50 mL con 45 mL de PBS estéril y se centrifugó tres veces (entre
- 25 cada centrifugación, el sobrenadante se desechó y se añadieron 45 mL de PBS) a 100g

durante diez minutos a temperatura ambiente sin freno. Después de la última centrifugación, los dos sedimentos se pusieron juntos en un volumen final de 50 mL completado con PBS en un tubo Falcon de 50 mL. El número total de PBMC viables se definió por recuento Vicell. El sedimento se recuperó en tampón de corrida Automacs de Myltenyi Biotech (130-091-221) y las células T se aislaron de las PBMC usando el KIT de selección negativa de Miltenyi Biotech (130-091-156) y Automacs según las instrucciones del fabricante. Las células T purificadas se recuperaron y se pusieron en cultivo en medio Xvivo-15 5% HIS +peni-estrepto1X a una concentración de $2,5 \times 10^6$ células/mL.

10 *Amplificación de células T humanas*

La población de células T humanas enriquecida se activó y expandió in vitro durante 14 días usando el kit de Activación/Expansión de células T de Miltenyi Biotech (130-091-441)

15 *Preparación de células T humanas para administración in vivo*

Las células y medio de cultivo celular se centrifugaron 10 minutos a 400g. El sedimento se recuperó a una concentración de 2×10^7 células/ml en PBS estéril. La eliminación de los lechos activadores de las células T amplificadas se realizó usando el separador MACsiMAG de Myltenyi Biotech (130-092-168) según las instrucciones del fabricante. Las poblaciones de células T enriquecidas se contaron por recuento Vicell y se recuperaron en 25 mL de PBS estéril en un tubo Falcon de 50 mL. Después de una etapa de centrifugación a 400g durante 10 minutos a temperatura ambiente, el sedimento celular se recuperó en un volumen adecuado de PBS estéril para obtener una concentración final de 5×10^7 células/mL.

25

Modelo Tumoral

Las células de Leucemia Mieloide Aguda humana Molm-13 que expresan CD123 se obtuvieron de la colección Leibniz-institut DSMZ-German de microorganismos y cultivos celulares (DSMZ Braunschweig, Alemania). Las células se crecieron en cultivo (37°C, 5% CO₂, 95% humedad) en medio RPMI1640 Glutamax (completado con suero de ternera fetal 20%). Las células Molm-13 se infectaron con un vector Luciferasa (SV40-PGL4-Puro – es decir, vector Luciferasa que consiste en el promotor de Virus de Simio 40

unido a las secuencias de Luciferasa 2 y el casete de resistencia a Puromicina) portado por un lentivirus no replicativo.

Las células tumorales Molm13-luc+ se inyectaron intravenosamente (IV) a ratones NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ NSG (10E+6 células por animal en 200µl de suspensión de PBS). Veinticuatro horas después, se administraron 10E+7 células T humanas intraperitonealmente (IP) a los mismos ratones en un volumen de 0,2 mL de PBS estéril.

La formación de imágenes de bioluminiscencia de línea base en el día tres posterior al implante del tumor se realizó usando el reproductor de imágenes IVIS100 (PerkinElmer, Waltham, MA, EEUU) con el software de adquisición Living Image 3.2 (Perkin-Elmer, Waltham, M, EEUU). Se inyectó a los animales IP 120 mg/kg de disolución de sal de potasio de luciferina de escarabajo (lote 316019, Promega, Lyon, Francia) en PBS 15 minutos antes de la formación de imágenes. Los ratones se anestesiaron con ketamina®/Xilazina® (120 mg/kg; 6 mg/kg IM, 5 ml/kg) 5 minutos antes de la formación de imágenes.

Los tratamientos con CODV-Fab-TL1 “hz20G6xhz7G3”, CODV-Fab “hz20G6xhz7G3”, competidor DART biespecífico CD123xCD3 (Anticuerpo de cadena única formato DART MGD006 o un análogo cercano denominado en la presente memoria “herramienta DART”) o PBS por la ruta intravenosa (IV) o infusión intraperitoneal continua (CIP) empezaron en el día cuatro posterior al implante del tumor en tumores establecidos ya detectables en los huesos, como se indica en la tabla 26 (CODV-Fab-TL1 “hz20G6xhz7G3”), tabla 27 (CODV-Fab “hz20G6xhz7G3” IV) y tabla 28 (CODV-Fab “hz20G6xhz7G3” CIP).

Tabla 26: Diseño del estudio de evaluación de CODV-Fab-TL1 Biespecífico CD123xCD3 intravenoso (IV)

Grupo de Tratamiento	Dosis (nmoles/Kg)	Volumen/inj Ruta	Programa	Número de animales
Control	-	-	-	7
CODV-Fab-TL1 "hz20G6xhz7G3"	1,3	0,2ml IV	Q3d (4,7,10)	7
CODV-Fab-TL1 "hz20G6xhz7G3"	0,13	0,2ml IV	Q3d (4,7,10)	8
CODV-Fab-TL1 "hz20G6xhz7G3"	0,013	0,2ml IV	Q3d (4,7,10)	6
CODV-Fab "hz20G6xhz7G3"	1,3	0,2ml IV	Qd (4-13)	8
Anticuerpo de cadena única Formato DART MGD006	1,3	0,2ml IV	Qd (4-13)	7

5

Tabla 27: Diseño del estudio de evaluación de CODV-Fab Biespecífico CD123xCD3 intravenoso (IV)

Grupo de Tratamiento	Dosis (nmoles/Kg)	Volumen/inj Ruta	Programa	Número de animales
Control	-	-	-	5
CODV-Fab "hz20G6xhz7G3"	1,3	0,2ml IV	Qd (4-13)	8
CODV-Fab "hz20G6xhz7G3"	0,13	0,2ml IV	Qd (4-13)	5
Anticuerpo de cadena única Formato DART Herramienta DART	1,3	0,2ml IV	Qd (4-13)	8
Anticuerpo de cadena única Formato DART Herramienta DART	0,13	0,2ml IV	Qd (4-13)	7
CODV-Fab hz20G6x7G3	1,3	0,2ml IV	Qd (4-13)	8

Tabla 28: Diseño del estudio de evaluación de CODV-Fab Biespecífico CD123xCD3 por infusión intraperitoneal continua (CIP)

Grupo de Tratamiento	Dosis (nmoles/Kg/día)	Volumen/día Ruta	Programa	Número de animales
Vehículo	-	6µl/día ip Alzet 1002	Infusión continua (4-14)	9
CODV-Fab "hz20G6xhz7G3"	3,9	6µl/día ip Alzet 1002	Infusión continua (4-14)	9
CODV-Fab "hz20G6xhz7G3"	1,3	6µl/día ip Alzet 1002	Infusión continua (4-14)	10
Anticuerpo de cadena única Formato DART MGD006	3,9	6µl/día ip Alzet 1002	Infusión continua (4-14)	9
Anticuerpo de cadena única Formato DART MGD006	1,3	6µl/día ip Alzet 1002	Infusión continua (4-14)	9
CODV-Fab "hz20G6xhz7G3"	1,3	0,2ml IV	Qd (4-13)	10
Vehículo	-	6µl/día ip Alzet 1002	Infusión continua (4-14)	10
CODV-Fab "hz20G6xhz7G3"	0,13	6µl/día ip Alzet 1002	Infusión continua (4-14)	8
CODV-Fab "hz20G6xhz7G3"	0,013	6µl/día ip Alzet 1002	Infusión continua (4-14)	8
Anticuerpo de cadena única Formato DART MGD006	0,13	6µl/día ip Alzet 1002	Infusión continua (4-14)	8
Anticuerpo de cadena única Formato DART MGD006	0,013	6µl/día ip Alzet 1002	Infusión continua (4-14)	9
CODV-Fab "hz20G6xhz7G3"	1,3	0,2ml IV	Qd (4-13)	10

5 *Recogida de datos y criterios de eficacia*

El peso corporal de los animales se monitorizó desde el día 3 hasta el final del ensayo con el fin de seguir el impacto de la terapia. Una dosificación que producía una pérdida de peso del 20% ó pérdida de peso del 15% durante 3 días consecutivos ó 10% o más de muertes relacionadas con el fármaco, se consideró una dosificación excesivamente tóxica. Los pesos corporales de los animales incluyeron los pesos tumorales.

La carga tumoral se siguió por formación de imágenes de bioluminiscencia no invasiva (BLI). La BLI de la línea base se realizó en el día tres posterior al implante del tumor, 24 horas antes del inicio de los tratamientos. Los animales se distribuyeron en diferentes grupos tomando como base la señal de bioluminiscencia de todo el cuerpo. El crecimiento tumoral se siguió en todo el cuerpo y los huesos largos en las patas posteriores por medidas de señal BLI en los días 7, 10 y 14 después del implante del tumor. La señal de los huesos largos se midió por segmentación y pudo estar influida por la señal loco-regional próxima (por ejemplo, señal residual en tejidos blandos en puntos de tiempo tardíos). Los grupos tratados se compararon con los animales control que portaban tumor diseminado Molm13-luc+ y células T humanas.

Los puntos finales de eficacia primaria fueron la proporción de los cambios en las señales tumorales desde la línea base entre los grupos tratados y control (dT/dC), el número de regresiones tumorales parciales (PR) y el número de regresión tumoral completa (CR).

El crecimiento tumoral basado en curvas de señal de bioluminiscencia (expresado en Fot/seg) con el tiempo se monitorizó para cada animal de cada grupo de tratamiento y se representó como curva mediana $\pm$ MAD, tanto para las señales de cuerpo completo como segmentadas de hueso. Se calcularon los cambios en la señal de bioluminiscencia tumoral para cada animal control (C) o tratado (T) y para cada día restando la señal tumoral en el día del primer tratamiento (día de estadificación) de la señal tumoral en el día de observación especificado. La T mediana se calcula para el grupo tratado y la C mediana se calcula para el grupo control.

Después, se calcula la proporción T/C y se expresa como un porcentaje:

$$dT/dC = [(T \text{ mediana día obs} - T \text{ mediana día 3}) / (C \text{ mediana día obs} - C \text{ mediana día 3})] \times 100$$

La dosis se considera como terapéuticamente activa cuando dT/dC al final del experimento (día 14) es menor de 42% y muy activa cuando dT/dC es menor de 10%.

El porcentaje de regresión tumoral se define como el % de disminución de la señal tumoral en el grupo tratado en un día de observación especificado comparado con su señal en el primer día de tratamiento. En un punto de tiempo específico y para cada animal, el % de regresión se calcula como:

$$\% \text{ de regresión (a } t) = \frac{\text{Señal}_{t_0} - \text{Señal}_t}{\text{Señal}_{t_0}} \times 100$$

Dado el riesgo de variabilidad de la señal debido a las cinéticas de la luciferina y posible inyección fallida IP, la regresión de la señal para un animal se considera como una regresión tumoral verdadera sólo cuando se observa al menos en dos puntos de tiempo consecutivos.

5 Regresión Parcial (PR): Las regresiones se definen como parcial si la señal tumoral disminuye por debajo de la señal al inicio del tratamiento para dos puntos de tiempo consecutivos, uno permaneciendo superior al 50% de la señal de la línea base.

10 Regresión Completa (CR): Las regresiones se definen como completas si la señal tumoral disminuye más del 50% por debajo de la señal al inicio del tratamiento para dos puntos de tiempo consecutivos.

Análisis estadístico

Evaluación de los compuestos por la ruta IV

15 Se comparó la señal de bioluminiscencia individual de cada grupo de tratamiento con otros usando el ajuste de Bonferroni-Holm para comparaciones por pares múltiples después de un anova de dos vías con medidas repetidas por día: $p > 0,05$: NS, $0,05 > p > 0,01$: *, $p < 0,01$: **. El análisis estadístico se realizó tanto para las señales de bioluminiscencia de todo el cuerpo como para las señales de bioluminiscencia de huesos largos.

20 Evaluación de los compuestos por la ruta CIP

La evaluación de CODV-Fab “hz20G6xhz7G3” por la ruta CIP resulta en la agregación de datos de dos estudios independientes (1^{er} estudio respecto a compuestos a altas dosificaciones, 2^o estudio para bajas dosificaciones, incluyendo ambos estudios un grupo de control de vehículo y grupo control positivo CODV-Fab “hz20G6xhz7G3”
25 1,3nmoles/kg IV Qd). El análisis estadístico de la señal de bioluminiscencia de cada ratón en cada día se realizó después de la normalización de los datos por la media de la señal de bioluminiscencia del grupo vehículo en el mismo día del mismo experimento (controles de vehículo combinados $n=19$; controles positivos combinados $n=20$). La señal de bioluminiscencia normalizada individual de cada grupo de tratamiento se comparó con
30 otros grupos usando el ajuste de Bonferroni-Holm para comparaciones por pares múltiples después de un anova de dos vías con medidas repetidas por día: $p > 0,05$: NS, $0,05 > p > 0,01$: *, $p < 0,01$: **. El análisis estadístico se realiza tanto para las señales de bioluminiscencia de todo el cuerpo como para las señales de bioluminiscencia de huesos largos.

RESULTADOS

CODV-Fab-TL1 “hz20G6xhz7G3” Biespecífico CD123xCD3 IV

CODV-Fab-TL1 “hz20G6xhz7G3” completamente humano IV Q3d en presencia de células T humanas inhibió el crecimiento de tumores Molm13 a todas las dosis ensayadas (1,3, 0,13 y 0,013 nmoles/Kg Q3d) con dT/dC de 20%, 14% y 38% respectivamente en cuerpo completo (Figuras 5 y 7) y estuvo asociado con regresión tumoral en huesos largos a todas las dosis ensayadas con 4/7 CR, 6/8 CR y 2/6 CR respectivamente (Figuras 6 y 8).

La respuesta máxima de CODV-Fab-TL1 “hz20G6xhz7G3” completamente humano se obtuvo en cuerpo completo y en hueso a 0,13 nmoles/kg Q3d. A esta dosis, la actividad no fue estadísticamente diferente de DART 1,3 nmoles/kg IV Qd (cuerpo completo dT/dC 29% con 1/7CR y 1/7PR en huesos largos), y equivalente a CODV-Fab “hz20G6xhz7G3” 1,3 nmoles/kg IV Qd (cuerpo completo dT/dC 23% con 1/8CR y 1/8PR de regresión tumoral en huesos largos). Los datos se confirmaron por análisis de histopatología terminal (no mostrado).

Las diferencias observadas entre cuerpo completo y huesos largos están ligadas a crecimiento tumoral residual en ovarios y grasa abdominal como consecuencia de la diseminación tumoral extra-medular después de la inyección IV.

CODV-Fab “hz20G6xhz7G3” Biespecífico CD123xCD3 IV

CODV-Fab “hz20G6xhz7G3” completamente humano IV en presencia de células T humanas inhibió el crecimiento tumoral a todas las dosis ensayadas (1,3 y 0,13 nmoles/Kg Qd4-13) con dT/dC de 14% y 39% respectivamente (Figuras 9 y 11) asociado con regresión tumoral a 1,3 nmoles/kg en huesos largos con 5/8 CR (Figuras 10 y 12).

DART 1,3 nmoles/kg IV Qd4-13 inhibió el crecimiento tumoral con dT/dC en cuerpo completo 29% y 3/8 CR de regresión tumoral en huesos largos, pero no significativamente diferente de CODV-Fab “hz20G6xhz7G3” 1,3 nmoles/Kg IV. DART fue inactivo para inhibir la señal tumoral de cuerpo completo a 0,13 nmoles/Kg IV Qd4-13 (dT/dC 62%) a pesar de 1/7PR de regresión tumoral en huesos largos. No se observó una diferencia significativa con la misma dosificación de CODV-Fab “hz20G6xhz7G3” completamente humano al final del estudio. No pudieron observarse diferencias estadísticas entre CODV-Fab “hz20G6xhz7G3” completamente humano y el compuesto CODV-Fab hz20G6x7G3 parcialmente humanizado cuando se proporcionaron a la misma dosificación de 1,3 nmoles/kg iv QD4-13: a esta dosis CODV-Fab hz20G6x7G3 inhibió el

crecimiento tumoral en cuerpo completo con dT/dC de 34% asociado con regresiones tumorales en huesos largos (1/8CR y 1/8PR).

Las diferencias observadas entre cuerpo completo y huesos largos están ligadas a crecimiento tumoral residual en ovarios y grasa abdominal como consecuencia de la
5 diseminación tumoral extra-medular después de la inyección IV.

CODV-Fab Biespecífico CD123xCD3 CIP

CODV-Fab “hz20G6xhz7G3” completamente humano CIP, en presencia de células T humanas, inhibió el crecimiento tumoral en cuerpo completo a 3,9, 1,3 y 0,13
10 nmoles/Kg/día CIP4-14 y fue inactivo a 0,013 nmoles/kg/día con dT/dC respectivas de 2%, 3%, 21%, y 57% en cuerpo completo (Figuras 13 y 15). Estuvo asociado con regresión tumoral a 3,9, 1,3, y 0,13 nmoles/kg en huesos largos con 5/9CR 3/9PR, 6/10CR 1/10PR y 7/8CR respectivamente (Figuras 14 y 16).

DART a 3,9, 1,3, y 0,13 nmoles/kg/día CIP4-14, pero no 0,013 nmoles/kg/día
15 inhibió el crecimiento tumoral en cuerpo completo con dT/dC de 21%, 5%, 21% y 46% respectivamente (Figura 13) induciendo regresión tumoral en huesos largos a 3,9, 1,3, y 0,13 nmoles/kg con 3/9 CR 3/9PR; 8/9CR; y 4/8CR 2/8PR respectivamente (Figura 14).

CODV-Fab “hz20G6xhz7G3” completamente humano a 1,3 nmoles/kg IV Qd4-13
20 inhibió el crecimiento tumoral en cuerpo completo con dT/dC de 4% y 5% (1^{er} y 2^o estudio resp.) asociado con regresión tumoral en huesos largos (8/10CR 1/10PR frente a 8/10 CR en el 1^{er} y 2^o estudio resp).

Anticuerpos anti-CD3, anticuerpos anti-CD123 y anticuerpos biespecíficos que se unen específicamente a CD3 y/o CD123

La presente invención se refiere a una proteína de unión semejante a anticuerpo que se une específicamente a CD3 y que se une específicamente al menos a un antígeno adicional, por ejemplo CD123. La presente invención también se refiere a una proteína de unión semejante a anticuerpo que se une específicamente a CD123 y que se une específicamente al menos a un antígeno adicional. La invención se refiere además a anticuerpos anti-CD3 y anticuerpos anti-CD123. La invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden la proteína de unión semejante a anticuerpo, anticuerpos anti-CD3 o anticuerpos anti-CD123 de la invención, y a su uso para tratar cáncer. La invención se refiere además a ácidos nucleicos aislados, vectores y células huésped que comprenden una secuencia que codifica dicha proteína de unión semejante a anticuerpo, anticuerpo anti-CD3 o anti-CD123 y al uso de dicho anticuerpo anti-CD123 como herramienta de diagnóstico.