

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido de unión a CD3 que comprende un dominio de unión a CD3 que comprende una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina y una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina, donde la región variable de cadena ligera de inmunoglobulina es humanizada y comprende regiones marco basadas en la secuencia de aminoácidos de la línea germinal de IGKV3D-20*1 humana; donde la región variable de cadena ligera de inmunoglobulina comprende la SEQ ID NO:88 o la SEQ ID NO:89; y en donde la región variable de cadena pesada de inmunoglobulina comprende la SEQ ID NO:86; donde la región variable de cadena pesada de inmunoglobulina es humanizada y comprende regiones marco basadas en la secuencia de aminoácidos de la línea germinal de IGHV1-69*02 humana; y
- (a) donde la región variable de cadena ligera de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos LCDR1 de la SEQ ID NO:94, una secuencia de aminoácidos LCDR2 de la SEQ ID NO:95 y una secuencia de aminoácidos LCDR3 de la SEQ ID NO:96, y donde la región variable de cadena pesada de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos HCDR1 de la SEQ ID NO:91, una secuencia de aminoácidos HCDR2 de la SEQ ID NO:92 y una secuencia de aminoácidos HCDR3 de la SEQ ID NO:93; o
- (b) donde la región variable de cadena ligera de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos LCDR1 de la SEQ ID NO:202, una secuencia de aminoácidos LCDR2 de la SEQ ID NO:203 y una secuencia de aminoácidos LCDR3 de la SEQ ID NO:204, y donde la región variable de cadena pesada de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos HCDR1 de la SEQ ID NO:199, una secuencia de aminoácidos HCDR2 de la SEQ ID NO:200 y una secuencia de aminoácidos HCDR3 de la SEQ ID NO:201.
2. El polipéptido de unión a CD3 de la reivindicación 1, donde el dominio de unión a CD3 posee una o más de las siguientes propiedades:
- (i) el punto medio de transición térmica del dominio de unión a CD3 es de 54°C, 55°C, 56°C o 57°C y hasta de 72°C;
- (ii) el dominio de unión a CD3 es estable al almacenarse en PBS a alrededor de 25°C durante 6 días, 10 días o 13 días y hasta 90 días;
- (iii) el dominio de unión a CD3 se une al CD3 humano con una EC50 de 10

nM o menor; y

(iv) el dominio de unión a CD3 se une al CD3 de cynomolgus con una EC50 de 30 nM o menor.

5 3. El polipéptido de unión a CD3 de la reivindicación 1, donde el residuo de aminoácido de la posición 52 de acuerdo con el sistema de numeración IMGT de la región variable de cadena ligera de inmunoglobulina es arginina o el residuo de aminoácido de la posición 53 de acuerdo con el sistema de numeración IMGT de la región variable
10 de cadena ligera de inmunoglobulina es triptófano.

4. El polipéptido de unión a CD3 de la reivindicación 1, donde el residuo de aminoácido de la posición 52 de acuerdo con el sistema de numeración IMGT de la región variable de cadena ligera de
15 inmunoglobulina es arginina y el residuo de aminoácido de la posición 53 de acuerdo con el sistema de numeración IMGT de la región variable de cadena ligera de inmunoglobulina es triptófano.

5. El polipéptido de unión a CD3 de la reivindicación 1, donde el
20 residuo de aminoácido de la posición 27 de acuerdo con el sistema de numeración IMGT de la región variable de cadena pesada de inmunoglobulina es tirosina.

6. El polipéptido de unión a CD3 de la reivindicación 1, donde el
25 dominio de unión a CD3 comprende uno o más de los siguientes:

(a) el residuo de aminoácido de la posición 9 de acuerdo con el sistema de numeración IMGT de la región variable de cadena pesada de inmunoglobulina es prolina;

(b) el residuo de aminoácido de la posición 53 de acuerdo con el sistema
30 de numeración IMGT de la región variable de cadena pesada de inmunoglobulina es isoleucina; y

(b) el residuo de aminoácido de la posición 21 de acuerdo con el sistema de numeración IMGT de la región variable de cadena ligera de inmunoglobulina es metionina.

35

7. El polipéptido de unión a CD3 de la reivindicación 1, donde el residuo de aminoácido de la posición 87 de acuerdo con el sistema de numeración IMGT de la región variable de cadena pesada de

inmunoglobulina es tirosina.

8. El polipéptido de unión a CD3 de la reivindicación 1, donde el residuo de aminoácido de la posición 86 de acuerdo con el sistema de numeración IMGT de la región variable de cadena pesada de inmunoglobulina es ácido aspártico.

9. El polipéptido de unión a CD3 de la reivindicación 1, donde el residuo de aminoácido de la posición 86 de acuerdo con el sistema de numeración IMGT de la región variable de cadena pesada de inmunoglobulina es ácido aspártico y el residuo de aminoácido de la posición 87 de acuerdo con el sistema de numeración IMGT de la región variable de cadena pesada de inmunoglobulina es tirosina.

10. El polipéptido de unión a CD3 de cualquiera de las reivindicaciones que anteceden, donde el dominio de unión a CD3 comprende la SEQ ID NO:83 o la SEQ ID NO:84.

11. El polipéptido de unión a CD3 de cualquiera de las reivindicaciones que anteceden, donde el dominio de unión a CD3 es un fragmento variable de cadena simple (scFv).

12. El polipéptido de unión a CD3 de la reivindicación 11, donde dicho scFv comprende un enlazador entre la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera de dicho scFv y donde dicho enlazador comprende la secuencia de aminoácidos QRHNNSSLNTGTQMAGHSPNS (SEQ ID NO:148).

13. El polipéptido de unión a CD3 de la reivindicación 11, donde la región variable de cadena pesada de este scFv se encuentra en el extremo amino con respecto a la región variable de cadena ligera de este scFv.

14. El polipéptido de unión a CD3 de cualquiera de las reivindicaciones que antecede, donde este polipéptido de unión a CD3 comprende, en el orden de extremo amino a extremo carboxilo, (i) un segundo dominio de unión, (ii) una región bisagra, (iii) una región constante de inmunoglobulina, (iv) un enlazador de extremo carboxilo y (v) el dominio de unión a CD3;

donde el segundo dominio de unión es un fragmento variable de cadena simple (scFv) y se une a un antígeno asociado con un tumor.

15. El polipéptido de unión a CD3 de la reivindicación 14, que
5 comprende, en el orden de extremo amino a extremo carboxilo, (i) el segundo dominio de unión, (ii) una región bisagra, (iii) una región constante de inmunoglobulina, (iv) un enlazador de extremo carboxilo, y (v) el dominio de unión a CD3,

10 en donde dicha región constante de inmunoglobulina comprende además un dominio humano CH2 de IgG1 que comprende las sustituciones L234A, L235A, G237A y K322A, de acuerdo con el sistema de numeración EU.

16. El polipéptido de unión a CD3 de la reivindicación 14 o 15, donde
15 (i) el dominio de unión a CD3 comprende (a) una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina que comprende LCDR1, LCDR2 y LCDR3, y (b) una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina que comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3; y

(ii) el segundo dominio de unión comprende (a) una región variable de
cadena ligera de inmunoglobulina que comprende LCDR1, LCDR2 y LCDR3, y
20 (b) una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina que comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3.

17. El polipéptido de unión a CD3 de cualquiera de las reivindicaciones
14-16, donde la región bisagra se deriva de una región bisagra de
25 inmunoglobulina.

18. El polipéptido de unión a CD3 de cualquiera de las reivindicaciones
14-16, donde el enlazador de extremo carboxilo comprende o consiste en
la SEQ ID NO:196.

30 19. El polipéptido de unión a CD3 de cualquiera de las reivindicaciones 14-18, donde la región constante de inmunoglobulina comprende los dominios CH2 y CH3 de inmunoglobulina de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2 o IgD.

35 20. El polipéptido de unión a CD3 de la reivindicación 14, donde región constante de inmunoglobulina comprende un dominio CH2 de IgG1 que comprende las sustituciones L234A, L235A, G237A y K322A, de acuerdo con

el sistema de numeración EU.

21. El polipéptido de unión a CD3 de cualquiera de las reivindicaciones 14-20, donde el polipéptido de unión a CD3 induce la citotoxicidad de linfocitos T redirigida (RTCC).
22. El polipéptido de unión a CD3 de la reivindicación 21, donde el polipéptido de unión a CD3 induce la RTCC con una EC50 de 30 pM o menor.
23. El polipéptido de unión a CD3 de cualquiera de las reivindicaciones 14-22, donde dicho polipéptido de unión a CD3 induce la lisis dependiente de linfocitos T de las células que expresan el antígeno asociado con el tumor.
24. El polipéptido de unión a CD3 de cualquiera de las reivindicaciones 14-22, donde el antígeno asociado con el tumor se selecciona del grupo que consiste en PSMA, CD19, CD20, CD37, CD38, CD123, Her2, ROR1, RON, antígeno de glicoproteína A33 (gpA33) y CEA.
25. Una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido de unión a CD3 de cualquiera de las reivindicaciones 1-24, o una porción de este polipéptido de unión a CD3, en donde tal porción comprende:
(i) la región variable de cadena ligera de inmunoglobulina que comprende la SEQ ID NO:88 o la SEQ ID NO:89; y
(ii) la región variable de cadena pesada de inmunoglobulina que comprende la SEQ ID NO:86.
26. Un vector de expresión que comprende un segmento de ácido nucleico que codifica el polipéptido de unión a CD3 de cualquiera de las reivindicaciones 1-24, donde el segmento de ácido nucleico se une de manera operativa a secuencias reguladoras adecuadas para la expresión del segmento de ácido nucleico en una célula hospedadora.
27. Una línea celular que comprende el vector de expresión de la reivindicación 26, donde la célula hospedadora es seleccionada del grupo que comprende: células de riñón de mono verde africano, células de riñón de embriones humanos, células de riñón de cría de hámster, células de riñón canino, células de ovario de hámster chino, células pituitarias

de rata, células HeLa S3, células de hepatoma de rata, células de riñón de mono transformadas con SV40 y células embriónicas murinas.

28. Un método para producir un polipéptido de unión a CD3, donde dicho
5 método comprende

cultivar una célula hospedadora recombinante que comprende el vector de expresión de la reivindicación 26 en condiciones a través de las cuales se expresa el segmento de ácido nucleico, mediante lo cual se produce el polipéptido de unión a CD3.

29. El método de la reivindicación 28, que comprende además recuperar el polipéptido de unión a CD3.

30. Una composición farmacéutica que comprende el polipéptido de unión
15 a CD3 de cualquiera de las reivindicaciones 1-24 y un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

31. Un dominio de unión a CD3 que se une específicamente al CD3 humano y que comprende las SEQ ID NO: 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24,
20 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58 o 60.

32. Una proteína de unión a CD3 que es un dímero de dos polipéptidos idénticos, donde cada polipéptido es el polipéptido de unión a CD3 de
25 cualquiera de las reivindicaciones 1-24.

33. El polipéptido de unión a CD3 de cualquiera de las reivindicaciones 1-24, donde el polipéptido de unión a CD3 no presenta o presenta un nivel mínimo de actividad de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) o actividad de citotoxicidad dependiente del
30 complemento (CDC).

34. El polipéptido de unión a CD3 de cualquiera de las reivindicaciones 1-24, donde el polipéptido de unión a CD3 no presenta o presenta un
35 nivel mínimo de actividad de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y actividad de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).