

La unión simultánea de dicho anticuerpo a sus dos dianas forzará una interacción temporal entre la célula diana y la célula T, causando la activación de cualquier célula T citotóxica y la posterior lisis de la célula diana.

Persiste la necesidad de nuevos anticuerpos anti-CD3.

5

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

A lo largo de la presente descripción, los artículos “un”, “una” y “el/la” se utilizan en la presente para hacer referencia a uno o más de uno (es decir, a al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, “un anticuerpo” significa un anticuerpo o más de un anticuerpo.

10 En un aspecto, la presente descripción proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a CD3, que comprende:

una o dos o tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y/o HCDR3) contenidas dentro de cualquiera de las secuencias de región variable de cadena pesada (VH) seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 7, 15, 23, 31, 39, 47, 55, 63, 71, 79, 87, 95, 108, 116, 124, 132, 140, 148, 156, 163, 164, 165, 166, 15 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 213, 202, 203, 204, 205, 206, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244 y 245; y/o

una o dos o tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y/o LCDR3) contenidas dentro de cualquiera de las secuencias de región variable de cadena ligera (VL) seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 8, 16, 24, 20 32, 40, 48, 56, 64, 72, 80, 88, 96, 109, 117, 125, 133, 141, 149, 157, 168, 169, 170, 197, 198, 199, 200, 207, 208, 209, 230, 231 y 232.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente descripción comprende al menos una región determinante de complementariedad (CDR) de cadena pesada o ligera que comprende una secuencia de aminoácidos 25 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 142, 30 143, 144, 145, 146, 147, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 201, 162, 167, 210, 211, 212, 214, 215, 216, 217, 218, 219,

220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228 y 229.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente descripción comprende una región VH que comprende uno o dos o tres de HCDR1, HCDR2 y HCDR3 que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, 2, 3, 9, 10, 11, 17, 18, 19, 25, 26, 27, 33, 34, 35, 41, 42, 43, 49, 50, 51, 57, 58, 59, 65, 66, 67, 73, 74, 75, 81, 82, 83, 89, 90, 91, 102, 103, 104, 110, 111, 112, 118, 119, 120, 126, 127, 128, 134, 135, 136, 142, 143, 144, 150, 151, 152, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 201, 162, 210, 211, 212, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228 y 229.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente descripción comprende una región VL que comprende uno o dos o tres de LCDR1, LCDR2 y LCDR3 que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4, 5, 6, 12, 13, 14, 20, 21, 22, 28, 29, 30, 36, 37, 38, 44, 45, 46, 52, 53, 54, 60, 61, 62, 68, 69, 70, 76, 77, 78, 84, 85, 86, 92, 93, 94, 105, 106, 107, 113, 114, 115, 121, 122, 123, 129, 130, 131, 137, 138, 139, 145, 146, 147, 153, 154, 155, 182, 183, 184, 185, 167, 214, 215 y 216.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente descripción comprende:

(a) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1, 9, 17, 25, 33, 41, 49, 57, 65, 73, 81, 89, 102, 110, 118, 126, 134, 142, 150, 217, 218 y 219;

(b) una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2, 10, 18, 26, 34, 42, 50, 58, 66, 74, 82, 90, 103, 111, 119, 127, 135, 143, 151, 171, 172, 173, 201, 210, 211, 212, 220 y 222; y

(c) una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 3, 11, 19, 27, 35, 43, 51, 59, 67, 75, 83, 91, 104, 112, 120, 128, 136, 144, 152, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 221, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229 y 162.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente descripción comprende:

(a) una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 4, 12, 20, 28, 36, 44, 52, 60, 68, 76, 84, 92, 105, 113, 121, 129, 137, 145 y 153;

5 (b) una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 5, 13, 21, 29, 37, 45, 53, 61, 69, 77, 85, 93, 106, 114, 122, 130, 138, 146 y 154; y

(c) una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 6, 14, 22, 30, 38, 46, 54, 62, 70, 78, 86, 94, 107, 115, 123, 131, 139, 147, 155, 182, 183, 184, 185, 214, 215, 216 y 167.

10 En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente descripción comprende:

(a) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 1, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 2, y una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos
15 como se establece en la SEQ ID NO: 3;

(b) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 9, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 10, y una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 11;

20 (c) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 17, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 18, y una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 19;

(d) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en
25 la SEQ ID NO: 25, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 26, y una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 27;

(e) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 33, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se
30 establece en la SEQ ID NO: 34, y una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos

como se establece en la SEQ ID NO: 35;

(f) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 41, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 42, y una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 43;

(g) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 49, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 50, y una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 51;

(h) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 57, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 58, y una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 59;

(i) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 65, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 66, y una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 67;

(j) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 73, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 74, y una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 75;

(k) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 81, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 82, y una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 83;

(l) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 89, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 90, y una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 91;

(m) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en

la SEQ ID NO: 102, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 103, y una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 104;

5 (n) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 110, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 111, y una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 112;

10 (o) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 118, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 119, y una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 120;

15 (p) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 126, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 127, y una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 128;

(q) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 134, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 135, y una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 136;

20 (r) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 142, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 143, y una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 144;

25 (s) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 150, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 151, y una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 152;

30 (t) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 219, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 201, y una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 162;

(u) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 9, 217 o 218; una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 10, 171, 172, 173, 220 o 222; una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 11, 174, 175,
5 176, 177, 178, 179, 180, 181, 221, 223, 224, 225, 226, 227, 228 o 229;

(v) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 150, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 212, y una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 152;

10 (w) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 150, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 210, y una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 152; o

(x) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en
15 la SEQ ID NO: 150, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 211, y una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 152.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente descripción comprende:

20 (a) una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 4, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 5, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 6;

(b) una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en
25 la SEQ ID NO: 12, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 13, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 14;

(c) una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 20, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 21, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos
30 como se establece en la SEQ ID NO: 22;

(d) una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 28, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 29, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 30;

5 (e) una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 36, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 37, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 38;

10 (f) una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 44, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 45, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 46;

15 (g) una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 52, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 53, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 54;

20 (h) una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 60, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 61, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 62;

(i) una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 68, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 69, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 70;

25 (j) una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 76, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 77, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 78;

30 (k) una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 84, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 85, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos

como se establece en la SEQ ID NO: 86;

(l) una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 92, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 93, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 94;

(m) una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 105, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 106, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 107;

(n) una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 113, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 114, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 115;

(o) una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 121, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 122, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 123;

(p) una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 129, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 130, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 131;

(q) una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 137, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 138, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 139;

(r) una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 145, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 146, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 147;

(s) una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en

la SEQ ID NO: 153, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 154, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 155;

5 (t) una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 12, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 13, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 167; o

10 (u) una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 12, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 13, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 14, 182, 183, 184, 185, 214, 215 o 216.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente descripción comprende:

15 (a) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 1, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 2, una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 3, una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 4, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 5, y una LCDR3 que
20 comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 6;

(b) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 9, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 10, una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 11, una LCDR1 que comprende una secuencia de
25 aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 12, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 13, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 14;

(c) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 17, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 18, una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 19, una LCDR1 que comprende una secuencia de
30

aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 20, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 21, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 22;

5 (d) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 25, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 26, una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 27, una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 28, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 29, y una LCDR3 que
10 comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 30;

(e) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 33, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 34, una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 35, una LCDR1 que comprende una secuencia de
15 aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 36, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 37, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 38;

(f) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 41, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 42, una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 43, una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 44, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 45, y una LCDR3 que
20 comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 46;

25 (g) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 49, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 50, una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 51, una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 52, una LCDR2 que comprende una
30 secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 53, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 54;

(h) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en

la SEQ ID NO: 57, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 58, una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 59, una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 60, una LCDR2 que comprende una
5 secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 61, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 62;

(i) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 65, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 66, una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos
10 como se establece en la SEQ ID NO: 67, una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 68, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 69, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 70;

(j) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 73, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 74, una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 75, una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 76, una LCDR2 que comprende una
15 secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 77, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 78;

(k) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 81, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 82, una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 83, una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 84, una LCDR2 que comprende una
25 secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 85, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 86;

(l) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 89, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 90, una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 91, una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 92, una LCDR2 que comprende una
30 secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 93, y una LCDR3 que

comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 94;

5 (m) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 102, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 103, una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 104, una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 105, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 106, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 107;

10 (n) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 110, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 111, una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 112, una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 113, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 114, y una LCDR3 que
15 comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 115;

(o) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 118, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 119, una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 120, una LCDR1 que comprende una secuencia de
20 aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 121, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 122, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 123;

(p) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 126, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se
25 establece en la SEQ ID NO: 127, una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 128, una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 129, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 130, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 131;

30 (k) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 134, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 135, una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos

como se establece en la SEQ ID NO: 136, una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 137, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 138, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 139;

5 (r) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 142, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 143, una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 144, una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 145, una LCDR2 que comprende una
10 secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 146, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 147;

(s) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 150, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 151, una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos
15 como se establece en la SEQ ID NO: 152, una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 153, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 154, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 155;

(t) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 9, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se
20 establece en la SEQ ID NO: 171, una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 11, una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 12, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 13, y una LCDR3 que
25 comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 14;

(u) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 9, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se
establece en la SEQ ID NO: 172, una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 11, una LCDR1 que comprende una secuencia de
30 aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 12, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 13, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 14;

secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 13, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 214;

5 (oo) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 9, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 10, una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 11, una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 12, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 13, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 215;

10 (pp) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 9, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 10, una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 11, una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 12, una LCDR2 que comprende una
15 secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 13, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 216;

(qq) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 9, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 222, una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos
20 como se establece en la SEQ ID NO: 180, una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 12, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 13, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 214;

(rr) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en
25 la SEQ ID NO: 9, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 222, una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 180, una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 12, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 13, y una LCDR3 que
30 comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 215;

(ss) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 9, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se

secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 13, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 14;

5 (ccc) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 219, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 201, una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 162, una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 12, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 13, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 167;

10 (ddd) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 150, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 212, una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 152, una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 153, una LCDR2 que comprende una
15 secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 154, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 155;

(eee) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 150, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 210, una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos
20 como se establece en la SEQ ID NO: 152, una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 153, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 154, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 155; o

(fff) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en
25 la SEQ ID NO: 150, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 211, una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 152, una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 153, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 154, y una LCDR3 que
30 comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 155.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente descripción comprende una región VH que tiene una secuencia de aminoácidos

como se establece en las SEQ ID NO: 7, 15, 23, 31, 39, 47, 55, 63, 71, 79, 87, 95, 108, 116, 124, 132, 140, 148, 156, 163, 164, 165, 166, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 213, 202, 203, 204, 205, 206, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244 o 245, o una secuencia homóloga de esta que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 7, 15, 23, 31, 39, 47, 55, 63, 71, 79, 87, 95, 108, 116, 124, 132, 140, 148, 156, 163, 164, 165, 166, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 213, 202, 203, 204, 205, 206, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244 o 245.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente descripción comprende una región VL que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en las SEQ ID NO: 8, 16, 24, 32, 40, 48, 56, 64, 72, 80, 88, 96, 109, 117, 125, 133, 141, 149, 157, 168, 169, 170, 197, 198, 199, 200, 207, 208, 209, 230, 231 o 232, o una secuencia homóloga de esta que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 8, 16, 24, 32, 40, 48, 56, 64, 72, 80, 88, 96, 109, 117, 125, 133, 141, 149, 157, 168, 169, 170, 197, 198, 199, 200, 207, 208, 209, 230, 231 o 232.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente descripción comprende un par de secuencias de aminoácidos VH/VL seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 7/8, 15/16, 23/24, 31/32, 39/40, 47/48, 55/56, 63/64, 71/72, 79/80, 87/88, 95/96, 108/109, 116/117, 124/125, 132/133, 140/141, 148/149, 156/157, 163/168, 163/169, 163/170, 164/168, 164/169, 164/170, 165/168, 165/169, 165/170, 166/168, 166/169, 166/170, 186/169, 187/169, 188/169, 189/169, 190/169, 191/169, 192/169, 193/169, 194/169, 195/169, 196/169, 165/197, 165/198, 165/199, 165/200, 202/207, 202/208, 202/209, 203/207, 203/208, 203/209, 204/207, 205/207, 206/207, 206/208, 206/209, 233/169, 234/169, 235/169, 236/169, 237/169, 238/169, 239/169, 240/169, 241/169, 242/169, 243/169, 244/169, 245/169, 165/230, 165/231, 165/232, 235/230, 235/231, 236/230 y 236/231.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente divulgación comprende además una o más sustituciones o modificaciones de residuos de aminoácidos, pero conserva afinidad de unión específica a CD3. En algunas realizaciones, al menos una de las sustituciones o modificaciones se encuentra en una o más de las secuencias de CDR de la región VH o VL. En algunas realizaciones, al menos una de las sustituciones o modificaciones se encuentra en una o más de las secuencias no-CDR de la región VH o de la región VL. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente descripción comprende además una o más sustituciones de aminoácidos no naturales (NNAAs). En algunas realizaciones, el NNAAs es capaz de ser

conjugado.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente descripción tiene una o más propiedades de unión a CD3 seleccionadas del grupo que consiste en:

5 (a) ser capaz de unirse específicamente a CD3 humano según lo medido por el ensayo FACS;

(b) tener una capacidad de activación de células T según lo medido por el ensayo de activación de Jurkat NFAT-Luciferasa; y

(c) con una capacidad de activación de PBMC según lo medido por el ensayo ELISA.

10 En otro aspecto, la presente descripción proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, que compite por la unión a CD3 con el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo como se describió anteriormente.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente descripción es un anticuerpo quimérico, humanizado o humano o fragmento de
15 unión a antígeno de este.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente descripción es un anticuerpo marcado, un anticuerpo bivalente, un anticuerpo antiidiotípico o una proteína de fusión.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo
20 de la presente divulgación es un diacuerpo, un Fab, un Fab', un F(ab')₂, un Fd, un fragmento de Fv, un fragmento de Fv estabilizado con disulfuro (dsFv), un (dsFv)₂, un dsFv biespecífico (dsFv-dsFv'), un diacuerpo estabilizado con disulfuro (diacuerpo ds), una molécula de anticuerpo de cadena individual (scFv), un dímero de scFv (diacuerpo bivalente), un anticuerpo de dominio individual camelizado, un nanocuerpo, un anticuerpo de dominio, o un
25 anticuerpo de dominio bivalente.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente descripción comprende además una región Fc. En algunas realizaciones, la región Fc es una región Fc de inmunoglobulina (Ig) humana. En algunas realizaciones, la región Fc es una región Fc de IgG humana. En algunas realizaciones, la región Fc se deriva de IgG1,
30 IgG2, IgG3 o IgG4 humana. En algunas realizaciones, la región Fc deriva de IgG1 humana.

En las realizaciones, el región Fc comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 97-99.

En algunas realizaciones, la cadena ligera del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente descripción es una cadena ligera λ o una cadena ligera κ .

5 En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente descripción es un anticuerpo biespecífico o multiespecífico o fragmento de unión a antígeno de este. En algunas realizaciones, el anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente divulgación es capaz de unirse específicamente a uno o más antígenos adicionales distintos de CD3, o un segundo epítipo en CD3. En algunas
10 realizaciones, el uno o más antígenos adicionales distintos de CD3 se seleccionan del grupo que consiste en CD16a, CD33, CD38, CD45, CD123, CD146, CD228, CLL-1, FLT3, FLT3L, TAF1, TgPRF, HVCN1, IL-6R, IL-11R, IL17A, IL-23R, IL-33, ILDR2, VUELTA, TSLP, TREM-1, ANGPT2, APOE, IFNAR, CypA, DOG-1, NKp30, CSF-1R, CCR2, LRRC15, mesotelina, Dickkopf2, DLL3, HER-2, C10orf54, TrkA, MEKK1, KRAS, ERK, XPO1, mTORC1/2, PAK4,
15 NAMPT, ATR, EGFR, FGFR, VEGF, LILRB (*por ejemplo*, LILRB1, LILRB2, LILRB3, LILRB4, LILRB5), c-MET, Her2, Her3, CTLA4, GITA, CD112R, CD2, CD7, CD16, CD19, CD20, CD24, CD27, CD30, CD34, CD37, CD39, CD70, CD73, CD83, CD28, CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), CD40, CD40L (CD154), CD47, SIRP α , CD122, CD137, CD137L, OX40 (CD134), OX40L (CD252), BCMA (*por ejemplo*, BCMA02), PSMA, CLDN18 (*por ejemplo*, CLDN18.2), NKG2C,
20 4-1BB, LUZ, PVRIG, SLAMF7, HVEM, BAFFR, ICAM-1, 2B4, LFA-1, GITR, ICO (CD278), ICOSLG (CD275), LAG3 (CD223), A2AR, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), B7-H5, BTLA (CD272), CD160, CTLA-4 (CD152), GPRC5D, IDO (*por ejemplo*, IDO1, IDO2), TDO, KIR, LAIR-1, NOX2, PD-1, PD-L1, PD-L2, TIM-3, VISTA, SIGLEC-7 (CD328), SIGLEC-9 (CD329), SIGLEC-15, TIGIT, PVR (CD155), TLR3, CLEC9A, DEC-205, STING y TGF β .

25 En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente descripción está unido a una o más porciones conjugadas. En algunas realizaciones, el resto conjugado comprende un agente modificador de la depuración, un agente quimioterapéutico, una toxina, un isótopo radiactivo, un lantánido, una etiqueta detectable (por ejemplo, una etiqueta luminiscente, una etiqueta fluorescente) una etiqueta de
30 sustrato enzimático, un alquilador de ADN, un inhibidor de topoisomerasa, un aglutinante de tubulina, un resto de purificación u otros fármacos anticancerosos. En algunas realizaciones, la porción conjugada está unida covalentemente ya sea directamente o mediante un enlazador.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona una composición farmacéutica

que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente descripción, y uno o más portadores farmacéuticamente aceptables.

5 En otro aspecto, la presente descripción proporciona un receptor de antígeno quimérico que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente descripción, una región transmembrana y una región de señal intracelular. En algunas realizaciones, la región transmembrana comprende una región transmembrana de CD3, CD4, CD8 o CD28. En algunas realizaciones, la región de señal intracelular se selecciona del grupo que consiste en: una secuencia de regiones de señal intracelular de CD3, FcγRI, CD27, CD28, CD137, CD134, MyD88, CD40, CD278, TLR o una combinación de estos.
10 En algunas realizaciones, el fragmento de unión a antígeno del receptor de antígeno quimérico es un scFv.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un polinucleótido aislado que codifica para el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente descripción y/o el receptor de antígeno quimérico de la presente descripción.

15 En otro aspecto, la presente descripción proporciona un vector que comprende el polinucleótido aislado de la presente divulgación.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un sistema de expresión del huésped que comprende el vector de la presente descripción o que tiene el polinucleótido de la presente descripción integrado en su genoma. En algunas realizaciones, el sistema de expresión del huésped de la presente descripción es un microorganismo, una levadura o una
20 célula de mamífero. En algunas realizaciones, el microorganismo se selecciona del grupo que consiste en *E. coli* y *B. subtilis*. En algunas realizaciones, la levadura es *Saccharomyces*. En algunas realizaciones, la célula de mamífero se selecciona del grupo que consiste en células COS, CHO-S, CHO-K1, HEK-293 y 3T3.

25 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un virus que comprende el vector de la presente divulgación.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un kit que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente descripción y/o la composición farmacéutica de la presente descripción y/o el receptor de antígeno quimérico de
30 la presente descripción, y un segundo agente terapéutico.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método para expresar el

anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, o el receptor de antígeno quimérico de la presente descripción, que comprende cultivar el sistema de expresión del huésped de la presente descripción en la condición en la que se expresa el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente descripción o el receptor de antígeno quimérico de la presente descripción.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método para tratar, prevenir o aliviar una enfermedad, trastorno o condición en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, y/o la composición farmacéutica, y/o el receptor de antígeno quimérico de la presente descripción.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona el uso del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, y/o la composición farmacéutica, y/o el receptor de antígeno quimérico de la presente descripción en la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad, trastorno o condición relacionada con CD3 en un sujeto.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona el uso del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, y/o el receptor de antígeno quimérico y/o la composición farmacéutica de la presente descripción en la fabricación de un reactivo de diagnóstico para diagnosticar una enfermedad, trastorno o condición relacionada con CD3.

En algunas realizaciones, la enfermedad, trastorno o condición es una enfermedad inmunitaria, una enfermedad inflamatoria, un cáncer o una enfermedad neurológica. En algunas realizaciones, el cáncer es un tumor sólido o hematológico. En algunas realizaciones, la enfermedad, trastorno o condición se selecciona del grupo que consiste en cáncer de pulmón (*por ejemplo*, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC), adenocarcinoma de pulmón o carcinoma de células escamosas de pulmón), cáncer peritoneal, cáncer carcinoide, cáncer de huesos, cáncer de páncreas, tumor neuroectodérmico primitivo, cáncer de piel, cáncer de vesícula biliar, cáncer de cabeza o cuello, cáncer de células escamosas, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer rectal, cáncer de próstata, cáncer de vejiga (*por ejemplo*, cáncer urotelial), cáncer de la región anal (*por ejemplo*, carcinoma de células escamosas anal), cáncer gástrico o de estómago (*por ejemplo*, cáncer gastrointestinal), cáncer de esófago, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de útero, cáncer de hígado (*por ejemplo*, hepatoblastoma, carcinoma hepatocelular/hepatoma o carcinoma hepático), colangiocarcinoma, sarcoma, cáncer colorrectal, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma de las glándulas salivales,

carcinoma del cuello uterino, carcinoma endometrial o uterino, osteosarcoma, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, cáncer de esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de la glándula paratiroides, cáncer de la glándula suprarrenal, cáncer de la nasofaringe, sarcoma de tejido blando, policitemia vera, cáncer de la uretra, cáncer del pene, cáncer del riñón o del uréter (por ejemplo,, tumor rabdoide del riñón), linfoma cutáneo de células T, meduloblastoma, nefroblastoma, síndrome mielodisplásico, trastorno mieloproliferativo crónico y no crónico, papiloma del plexo coroideo, carcinoma de células renales, carcinoma de la pelvis renal, neoplasias del sistema nervioso central (SNC), sarcoma de tejidos blandos (por ejemplo,, rabdomiosarcoma, fibrosarcoma, sarcoma de Kaposi), tumores del eje espinal, glioma (por ejemplo,, ependimoma, astrocitoma, astrocitoma anaplásico, oligodendroglioma, cáncer ocular (por ejemplo,, retinoblastoma), glioma del tronco encefálico o glioma mixto como oligoastrocitoma), tumor cerebral (por ejemplo,, glioblastoma/glioblastoma multiforme (GBM), tumor cerebral no glioblastoma o meningioma), melanoma (por ejemplo,, melanoma cutáneo o intraocular), trombocitemia, mesotelioma, micosis fungoide, síndrome de Sézary, mielofibrosis idiopática, plasmocitoma solitario, schwannoma vestibular, sarcoma de Ewing, condrosarcoma, poliposis asociada a MYH, adenoma pituitario, cánceres pediátricos como sarcomas pediátricos (por ejemplo,, neuroblastoma, rabdomiosarcoma y osteosarcoma), cáncer hematológico, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, leucemia (por ejemplo,, leucemia linfocítica/linfoblástica), leucemia crónica o aguda, leucemia de mastocitos, linfomas linfocíticos, linfoma primario del sistema nervioso central, leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia mieloide crónica (LMC), leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia mielomonocítica crónica (LMMC), leucemia linfoblástica crónica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia de células pilosas (LCP), linfoma de Burkitt (LB), mieloma múltiple (por ejemplo,, mieloma múltiple recidivante o refractario), Linfoma de células T o B, linfoma de células del manto (LCM) (por ejemplo,, linfoma de células del manto recidivante o refractario), melanoma maligno, linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), DLBCL que resulta de un linfoma folicular, linfoma de células B de alto grado, linfoma mediastínico primario de células B grandes, linfoma folicular (FL) y linfoma mediastínico primario de células B.

En algunas realizaciones, el sujeto es un humano.

En algunas realizaciones, la administración es a través de una vía parenteral que comprende inyección subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular o intradérmica; o una vía no parenteral que comprende transdérmica, oral, intranasal, intraocular, sublingual, rectal o tópica.

En algunas realizaciones, el método para tratar, prevenir o aliviar una enfermedad, trastorno o condición en un sujeto incluye además administrar al sujeto que lo necesita un agente terapéutico adicional. En algunas realizaciones, el agente terapéutico adicional se selecciona del grupo que consiste en: un agente activo, un agente de formación de imágenes, un agente citotóxico e inhibidor de angiogénesis, un inhibidor de cinasa, un agonista de molécula de coestimulación, un bloqueador de molécula de coinhibición, un bloqueador de molécula de adhesión, un anticuerpo anticitocina o fragmento funcional de este, un marcador o indicador detectable, un antimicrobiano, un agente de edición génica, un agonista beta, un inhibidor de ARN viral, un inhibidor de polimerasa, un interferón y un microARN. En algunas realizaciones, el agente terapéutico adicional se administra al sujeto que lo necesita antes, después o simultáneamente con el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, y/o la composición farmacéutica, y/o el receptor de antígeno quimérico de la presente descripción.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método para activar una célula T que expresa CD3 *in vivo* o *in vitro*, que comprende poner en contacto la célula T que expresa CD3 con el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, y/o la composición farmacéutica, y/o el receptor de antígeno quimérico de la presente descripción.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para modular la actividad de CD3 en una célula que expresa CD3, que comprende exponer la célula que expresa CD3 al anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, y/o la composición farmacéutica, y/o el receptor de antígeno quimérico de la presente divulgación.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método para promover el procesamiento *in vivo* o *in vitro* de un segundo antígeno por parte de una célula T que expresa CD3, que comprende poner en contacto la célula T que expresa CD3 con el anticuerpo biespecífico o fragmento de unión a antígeno de este de la presente descripción, donde el anticuerpo biespecífico o fragmento de unión a antígeno de este es capaz de unirse específicamente tanto a la célula T que expresa CD3 como a un segundo antígeno, poniendo así a ambos en estrecha proximidad.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para detectar la presencia o cantidad de CD3 en una muestra, que comprende poner en contacto la muestra con el anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y/o la composición farmacéutica, y/o el receptor de antígeno quimérico de la presente divulgación, y determinar la presencia o la cantidad de CD3 en la muestra.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para diagnosticar una enfermedad o condición relacionada con CD3 en un sujeto, que comprende: a) poner en contacto una muestra obtenida del sujeto con el anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo de y/o el receptor de antígeno quimérico y/o la composición farmacéutica de la presente divulgación; b) determinar la presencia o cantidad de CD3 en la muestra; y c) correlacionar la presencia o la cantidad de CD3 con la existencia o el estado de la enfermedad o condición relacionada con CD3 en el sujeto.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un kit que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo y/o el receptor de antígeno quimérico y/o la composición farmacéutica de la presente descripción, útil para detectar CD3, opcionalmente CD3 recombinante, CD3 expresado en la superficie celular o células que expresan CD3.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 muestra la capacidad de activación de varios anticuerpos seleccionados en células Jurkat-NFAT-Luc.

La Figura 2 muestra los resultados del análisis FACS de la afinidad de unión de varios anticuerpos quiméricos seleccionados y el anticuerpo de referencia OKT3 a células Jurkat.

La Figura 3 muestra los resultados del análisis FACS de la afinidad de unión de varios anticuerpos quiméricos seleccionados y anticuerpos de referencia BMK-B219 y BMK-TCB a células Jurkat.

La Figura 4 muestra la afinidad de unión de varios anticuerpos quiméricos seleccionados a células 293T-cynoCD3mix.

La Figura 5 muestra la capacidad de activación de varios anticuerpos quiméricos seleccionados y el anticuerpo de referencia OKT3 en células Jurkat-NFAT-Luc.

La Figura 6 muestra la liberación de IL-2 inducida por varios anticuerpos quiméricos seleccionados y el anticuerpo de referencia OKT3 en el ensayo de activación de PBMC.

La Figura 7 muestra la liberación de IFN γ inducida por varios anticuerpos quiméricos seleccionados y el anticuerpo de referencia OKT3 en el ensayo de activación de PBMC.

La Figura 8 muestra la expresión de CD25 de células T humanas CD3 $^{+}$ inducida por

varios anticuerpos quiméricos seleccionados y anticuerpos de referencia BMK-B219 y BMK-TCB en el ensayo de activación de PBMC.

La Figura 9A y Figura 9B muestran la afinidad de unión de varios anticuerpos 40-C12-C10-E9 humanizados o madurados por afinidad producidos a células Jurkat.

5 Las Figuras 10A a 10 F muestran la capacidad de activación de varios anticuerpos 40-C12-C10-E9 humanizados o madurados por afinidad y el anticuerpo de referencia BMK-TCB en células Jurkat-NFAT-Luc.

10 La Figura 11 muestra el efecto de activación de varios anticuerpos 40-C12-C10-E9 humanizados o madurados por afinidad y el anticuerpo de referencia BMK-TCB en el ensayo de activación de PBMC.

La Figura 12 muestra la afinidad de unión de varios anticuerpos 147E11E2 humanizados producidos a células Jurkat.

La Figura 13 muestra la afinidad de unión de varios anticuerpos 147E11E2 humanizados producidos a células 293T-cynoCD3mix.

15 Las Figuras 14A a 14C muestran la capacidad de activación de varios anticuerpos 147E11E2 humanizados y el anticuerpo de referencia BMK-TCB en células Jurkat-NFAT-Luc.

La Figura 15 muestra el efecto de activación de varios anticuerpos 147E11E2 humanizados y el anticuerpo de referencia BMK-TCB en el ensayo de activación de PBMC.

20 La Figura 16A y Figura 16B muestran la afinidad de unión de varios anticuerpos 40-C12-C10-E9 humanizados o madurados por afinidad producidos a células Jurkat.

Las Figuras 17A a 17E muestran la capacidad de activación de varios anticuerpos 40-C12-C10-E9 humanizados o madurados por afinidad en células Jurkat-NFAT-Luc.

25 La Figura 18 muestra el efecto de activación de varios anticuerpos 40-C12-C10-E9 humanizados o madurados por afinidad y el anticuerpo de referencia BMK-TCB en el ensayo de activación de PBMC.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La siguiente descripción de la descripción pretende simplemente ilustrar diversas realizaciones de la descripción. Como tal, las modificaciones específicas discutidas no deben

interpretarse como limitaciones en el alcance de la descripción. Será evidente para un experto en la técnica que se pueden realizar diversos equivalentes, cambios y modificaciones sin apartarse del alcance de la descripción, y se entiende que dichas realizaciones equivalentes se incluirán en la presente. Todas las referencias citadas en la presente, incluidas las publicaciones, patentes y solicitudes de patente, se incorporan a la presente como referencia en sus totalidades.

Definiciones

El término "anticuerpo", tal como se usa en la presente, incluye cualquier inmunoglobulina, anticuerpo monoclonal, anticuerpo policlonal, anticuerpo multivalente, anticuerpo bivalente, anticuerpo monovalente, anticuerpo multiespecífico o anticuerpo biespecífico que se une a un antígeno específico. Un anticuerpo intacto natural comprende dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L). Las cadenas pesadas de mamíferos se clasifican como alfa, delta, épsilon, gamma y mu, cada cadena pesada comprende una región variable (VH) y una primera, segunda, tercera y opcionalmente cuarta región constante (CH1, C H2, CH3, CH4 respectivamente); las cadenas ligeras de mamíferos se clasifican como λ o κ , mientras que cada cadena ligera comprende una región variable (VL) y una región constante. El anticuerpo tiene una forma de "Y", con el tallo de la Y que comprende la segunda y tercera regiones constantes de dos cadenas pesadas unidas entre sí a través de enlaces disulfuro. Cada brazo de la Y incluye la región variable y la primera región constante de una sola cadena pesada unida a las regiones variable y constante de una sola cadena ligera. Las regiones variables de las cadenas ligera y pesada son responsables de la unión al antígeno. Las regiones variables en ambas cadenas generalmente contienen tres bucles altamente variables llamados regiones determinantes de complementariedad (CDR) (CDR de cadena ligera que incluyen LCDR1, LCDR2 y LCDR3, CDR de cadena pesada que incluyen HCDR1, HCDR2, HCDR3). Las tres CDR se interponen entre tramos flanqueantes conocidos como regiones marco (FR) (FR de cadena ligera que incluyen LFR1, LFR2, LFR3 y LFR4, FR de cadena pesada que incluyen HFR1, HFR2, HFR3 y HFR4), que se conservan más altamente que las CDR y forman un andamio para soportar los bucles altamente variables. Las regiones constantes de las cadenas pesada y ligera no están involucradas en la unión al antígeno, pero exhiben diversas funciones efectoras. Los anticuerpos se asignan a clases basadas en las secuencias de aminoácidos de las regiones constantes de sus cadenas pesadas. Las cinco clases o isotipos principales de anticuerpos son IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, que se caracterizan por la presencia de cadenas pesadas alfa, delta, épsilon, gamma y mu, respectivamente. Varias de las principales clases de anticuerpos se dividen en subclases tales como IgG1

(cadena pesada gamma1), IgG2 (cadena pesada gamma2), IgG3 (cadena pesada gamma3), IgG4 (cadena pesada gamma4), IgA1 (cadena pesada alfa1) o IgA2 (cadena pesada alfa2).

En ciertas realizaciones, el anticuerpo proporcionado en la presente abarca cualquier fragmento de unión a antígeno del mismo. El término "fragmento de unión a antígeno", tal como se usa en la presente, se refiere a un fragmento de anticuerpo formado a partir de una porción de un anticuerpo que comprende una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, o 6) CDR, o cualquier otro fragmento de anticuerpo que se une a un antígeno pero no comprende una estructura de anticuerpo nativa intacta. Los ejemplos de fragmentos de unión a antígeno incluyen, de modo no taxativo, un diacuerpo, un Fab, un Fab', un F(ab')₂, un Fd, un fragmento Fv, un fragmento Fv estabilizado con disulfuro (dsFv), un (dsFv)₂, un dsFv biespecífico (dsFv-dsFv'), un diacuerpo estabilizado con disulfuro (diacuerpo ds), una molécula de anticuerpo monocatenario (scFv), un dímero de scFv (diacuerpo bivalente), un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo de dominio único camelizado, un nanocuerpo, un anticuerpo de dominio y un anticuerpo de dominio bivalente. Un fragmento de unión a antígeno es capaz de unirse al mismo antígeno o epítipo al que se une el anticuerpo original.

"Fab" con respecto a un anticuerpo se refiere a la parte del anticuerpo que consiste en una única cadena ligera (regiones variables y constantes) unida a la región variable y la primera región constante de una única cadena pesada por un enlace disulfuro.

"Fab'" se refiere a un fragmento Fab que incluye una parte de la región bisagra.

"F(ab)₂" se refiere a un dímero de Fab'.

"Fc" con respecto a un anticuerpo (por ejemplo, de IgG, IgA, o isotipo IgD) se refiere a la porción del anticuerpo que consiste en el segundo tercer dominio constantes de una primera cadena pesada unida al segundo y tercer dominio constantes de una segunda cadena pesada a través de enlaces disulfuro. Fc con respecto al anticuerpo de isotipo IgM e IgE comprende además un cuarto dominio constante. La porción Fc del anticuerpo es responsable de varias funciones efectoras, como la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), y la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), pero no funciona en la unión a antígeno

"Fv" con respecto a un anticuerpo se refiere al fragmento más pequeño del anticuerpo que porta el sitio de unión a antígeno completo. Un fragmento Fv consiste en la región variable de una sola cadena ligera unida a la región variable de una sola cadena pesada.

"Anticuerpo Fv de cadena simple" o "scFv" se refiere a un anticuerpo modificado que

consiste en una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada conectadas entre sí directamente o mediante un enlazador (*por ejemplo*, una secuencia peptídica) (Huston JS *et al.*, *Proc Natl Acad Sci usa*, 85:5879(1988)).

5 “Anticuerpo de Fv-Fc de cadena individual” o “scFv-Fc” se refiere a un anticuerpo modificado que consta de un scFv conectado a la región Fc de un anticuerpo.

10 “Anticuerpo de dominio único camelizado,” “anticuerpo de cadena pesada,” o “HCAb” se refiere a un anticuerpo que contiene dos dominios VH y sin cadenas ligeras (Riechmann L. and Muyldermans S., *J Immunol Methods*. Dec 10; 231(1-2):25-38 (1999); Muyldermans S., *J Biotechnol*. Jun; 74(4):277-302 (2001); WO94/04678; WO94/25591; patente estadounidense
15 núm. 6,005,079). Los anticuerpos de cadena pesada se derivaron originalmente de *Camelidae* (camellos, dromedarios y llamas). Aunque carecen de cadenas ligeras, los anticuerpos camelizados tienen un auténtico repertorio de unión a antígeno (Hamers-Casterman C. *et al.*, *Nature*. Jun 3; 363(6428):446-8 (1993); Nguyen VK. *et al.*, *Immunogenetics*. Apr; 54(1):39-47 (2002); Nguyen VK. *et al.*, *Immunology*. May; 109(1):93-101 (2003)). El dominio variable de
un anticuerpo de cadena pesada (dominio VHH) representa la unidad de unión a antígeno
más pequeña conocida generada por respuestas inmunitarias adaptativas (Koch-Nolte F. *et al.*, *FASEB J*. Nov; 21(13):3490-8. Epub 2007 Jun 15 (2007)).

Un "nanocuerpo" se refiere a un fragmento de anticuerpo que consiste en un dominio VHH de un anticuerpo de cadena pesada y dos dominios constantes, CH2 y CH3.

20 Un “diacuerpo” o “dAb” incluye fragmentos de anticuerpo pequeños con dos sitios de unión a antígeno, donde los fragmentos comprenden un dominio VH conectado a un dominio VL en la misma cadena polipeptídica (VH-VL o VL-VH) (véase, por ejemplo, Holliger P. *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*. Jul 15; 90(14):6444-8 (1993); EP404097; WO93/11161). Al utilizar un enlazador que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la
25 misma cadena, los dominios se ven obligados a aparearse con los dominios complementarios de otra cadena y crear de ese modo dos sitios de unión a antígeno. Los sitios de unión a antígeno pueden dirigirse a los mismos o diferentes antígenos (o epítomos). En ciertas realizaciones, un “diacuerpo ds biespecífico” es un diacuerpo que se dirige a dos antígenos (o epítomos) diferentes.

30 Un "anticuerpo de dominio" se refiere a un fragmento de anticuerpo que contiene solo la región variable de una cadena pesada o la región variable de una cadena ligera. En determinados casos, dos o más dominios VH se unen covalentemente con un enlazador

peptídico para crear un anticuerpo de dominio bivalente o multivalente. Los dos dominios VH de un anticuerpo de dominio bivalente pueden dirigirse a antígenos iguales o diferentes.

El término "valente", tal como se usa en la presente, se refiere a la presencia de una cantidad específica de sitios de unión a antígeno en una molécula dada. El término "monovalente" se refiere a un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno que tiene solo un único sitio de unión a antígeno; y el término "multivalente" se refiere a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que tiene múltiples sitios de unión a antígeno. Como tales, los términos "bivalente", "tetraivalente" y "hexavalente" denotan la presencia de dos sitios de unión a antígeno, cuatro sitios de unión a antígeno y seis sitios de unión a antígeno, respectivamente, en una molécula de unión a antígeno. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es bivalente.

Como se utiliza en la presente, un anticuerpo "bienespecífico" se refiere a un anticuerpo artificial que tiene fragmentos derivados de dos anticuerpos monoclonales diferentes y es capaz de unirse a dos epítomos diferentes. Los dos epítomos se pueden presentar en el mismo antígeno, o se pueden presentar en dos antígenos diferentes.

Como se usa en la presente, un anticuerpo "multiespecífico" se refiere a un anticuerpo que se une específicamente a al menos dos antígenos distintos o al menos dos epítomos distintos dentro del mismo antígeno. El anticuerpo multiespecífico puede unirse, por ejemplo, a dos, tres, cuatro, cinco o más antígenos distintos o epítomos distintos dentro del mismo antígeno.

En ciertas realizaciones, un "dímero de scFv" es un diacuerpo bivalente o scFv bienespecífico (BsFv) que comprende VH-VL (unido por un enlazador de péptido) dimerizado con otro resto de VH-VL tal que los VH de un resto se coordinan con los VL de la otro resto y forman dos sitios de unión que se pueden dirigir a los mismos antígenos (o epítomos) o diferentes antígenos (o epítomos). En otras realizaciones, un "dímero de scFv" es un diacuerpo bienespecífico que comprende VH1-VL2 (vinculado por un enlazador de péptido) asociado con VL1-VH2 (también vinculado por un enlazador de péptido) tal que VH1 y VL1 se coordinen y VH2 y VL2 se coordinen, y cada par coordinado tiene una especificidad de antígeno diferente.

Un "dsFv" se refiere a un fragmento Fv estabilizado con disulfuro en el que el enlace entre la región variable de una cadena ligera simple y la región variable de una cadena pesada simple es un enlace disulfuro. En algunas realizaciones, un "(dsFv)₂" o "(dsFv-dsFv)" comprende tres cadenas peptídicas: dos restos VH unidos por un enlazador peptídico (por

ejemplo, un enlazador flexible largo) y unidos a dos restos VL, respectivamente, a través de puentes disulfuro. En algunas realizaciones, dsFv-dsFv' es biespecífico en el que cada cadena pesada y ligera emparejada con disulfuro tiene una especificidad de antígeno diferente.

5 El término "quimérico", tal como se usa en la presente, significa un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, que tiene una porción de cadena pesada y/o ligera derivada de una especie, y el resto de la cadena pesada y/o ligera derivada de una especie diferente. En un ejemplo ilustrativo, un anticuerpo quimérico puede comprender una región constante derivada de humano y una región variable de un animal no humano, tal como de ratón. En algunas realizaciones, el animal no humano es un mamífero, por ejemplo, un ratón, una rata,
10 un conejo, una cabra, una oveja, un conejillo de indias o un hámster.

El término "humanizado", tal como se usa en la presente, significa que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende CDR derivadas de animales no humanos, regiones FR derivadas de humanos y, cuando corresponda, las regiones constantes derivadas de humanos. Las CDR de anticuerpos humanizados proporcionados en la presente descripción
15 pueden contener mutaciones en comparación con las CDR de sus anticuerpos originales.

El término "afinidad", como se utiliza en la presente, se refiere a la fuerza de la interacción no covalente entre una molécula de inmunoglobulina (es decir, anticuerpo) o fragmento de unión a antígeno del mismo y un antígeno.

Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que "se une
20 específicamente" o "de unión específica" a una diana (*por ejemplo*, un epítipo) es un término bien entendido en la técnica, y los métodos para determinar dicha unión específica también son bien conocidos en la técnica. Se dice que una molécula exhibe "unión específica" si reacciona o se asocia con mayor frecuencia, más rápidamente, con mayor duración y/o con mayor afinidad con una célula o sustancia en particular que con células o sustancias
25 alternativas. Un anticuerpo "se une específicamente" a una diana si se une con mayor afinidad, avidez, más fácilmente y/o con mayor duración de lo que se une a otras sustancias. Por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo CD3 es un anticuerpo que se une a este epítipo CD3 con mayor afinidad, avidez, más fácilmente y/o con mayor duración que cuando se une a otros epítipos CD3 o epítipos no CD3. También se entiende al leer esta
30 definición que, por ejemplo, un anticuerpo (o porción o epítipo) que se une específicamente a una primera diana puede o no unirse específicamente a una segunda diana. Como tal, "de unión específica" o "se une específicamente" no requiere necesariamente (aunque puede incluir) una unión exclusiva. En general, pero no necesariamente, la referencia a la unión

significa una unión específica.

La capacidad de "competir por la unión a CD3", como se utiliza en la presente, se refiere a la capacidad de un primer anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para inhibir la interacción de unión entre CD3 y un segundo anticuerpo anti-CD3 en cualquier grado detectable. En ciertas realizaciones, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que compite por la unión a CD3 inhibe la interacción de unión entre CD3 y un segundo anticuerpo anti-CD3 en al menos 85%, o al menos 90%. En ciertas realizaciones, esta inhibición puede ser mayor que 95%, o mayor que 99%.

El término "epítopo", tal como se usa en la presente, se refiere al grupo específico de átomos o aminoácidos en un antígeno al que se une un anticuerpo. Dos anticuerpos pueden unirse al mismo epítopo o a un epítopo estrechamente relacionado dentro de un antígeno si exhiben una unión competitiva para el antígeno. Un epítopo puede ser lineal o conformacional (es decir, que incluye residuos de aminoácidos separados). Por ejemplo, si un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno bloquea la unión de un anticuerpo de referencia al antígeno en al menos 85 %, o al menos 90 %, o al menos 95 %, entonces se puede considerar que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se une al epítopo mismo/estrechamente relacionado que el anticuerpo de referencia.

El término "aminoácido", tal como se usa en la presente, se refiere a un compuesto orgánico que contiene grupos funcionales amina (-NH₂) y carboxilo (-COOH), junto con una cadena lateral específica para cada aminoácido. Los nombres de los aminoácidos también se representan como códigos estándar de una sola letra o de tres letras en la presente descripción, que se resumen a continuación.

Nombres	Código de tres letras	Código de una sola letra
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Ácido glutámico	Glu	E
Glutamina	Gln	Q
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H

Nombres	Código de tres letras	Código de una sola letra
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptófano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

Una "sustitución conservadora" con referencia a una secuencia de aminoácidos se refiere a reemplazar un residuo de aminoácido con un residuo de aminoácido diferente que tiene una cadena lateral con propiedades fisicoquímicas similares. Por ejemplo, se pueden realizar sustituciones conservadoras entre residuos de aminoácidos con cadenas laterales hidrófobas (por ejemplo, Met, Ala, Val, Leu e Ile), entre residuos de aminoácidos con cadenas laterales hidrófilas neutras (por ejemplo, Cys, Ser, Thr, Asn y Gln), entre residuos de aminoácidos con cadenas laterales ácidas (por ejemplo, Asp, Glu), entre residuos de aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, His, Lys y Arg), o entre residuos de aminoácidos con cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, Trp, Tyr y Phe). Como se conoce en la técnica, la sustitución conservadora generalmente no causa un cambio significativo en la estructura conformacional de la proteína y, por lo tanto, podría retener la actividad biológica de una proteína.

El término "homólogo" tal como se utilizan en la presente, se refiere a una secuencia de ácido nucleico (o su cadena complementaria) o una secuencia de aminoácido que tienen una identidad de secuencia de al menos 60 % (por ejemplo, al menos 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 88 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 %) con otra secuencia cuando se alinean de manera óptima.

"Porcentaje (%) de identidad de secuencia" con respecto a la secuencia de aminoácidos (o secuencia de ácido nucleico) se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos (o ácido nucleico) en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos

de aminoácidos (o ácido nucleico) en una secuencia de referencia, después de alinear las secuencias y, si es necesario, introducir huecos, para lograr la cantidad máxima de aminoácidos (o ácidos nucleicos) idénticos. En otras palabras, el porcentaje (%) de identidad de secuencia de una secuencia de aminoácidos (o secuencia de ácidos nucleicos) se puede

5 calcular al dividir la cantidad de residuos de aminoácidos (o bases) que son idénticos con relación a la secuencia de referencia con la que se compara por la cantidad total de los residuos de aminoácidos (o bases) en la secuencia candidata o en la secuencia de referencia, lo que sea más corto. La sustitución conservadora de los residuos de aminoácidos puede o no considerarse como residuos idénticos. La alineación con el fin de determinar el porcentaje

10 de identidad de secuencia de aminoácidos (o ácido nucleico) se puede lograr, por ejemplo, utilizando herramientas disponibles públicamente tales como BLASTN, BLASTp (disponible en el sitio web del Centro Nacional de Información Biotecnológica de EE. UU. (NCBI), véase también, Altschul S.F. *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 215:403–410 (1990); Stephen F. *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 25:3389–3402 (1997)), ClustalW2 (disponible en el sitio web del Instituto Europeo de

15 Bioinformática, véase también, Higgins D.G. *et al.*, *Methods in Enzymology*, 266:383-402 (1996); Larkin M.A. *et al.*, *Bioinformatics* (Oxford, England), 23(21): 2947-8 (2007)), y software ALIGN o Megalign (DNASTAR). Un experto en la técnica puede usar los parámetros predeterminados proporcionados por la herramienta, o pueden personalizar los parámetros según sea apropiado para la alineación, tal como, por ejemplo, seleccionando un algoritmo

20 adecuado.

Las “funciones efectoras”, como se usan en la presente, se refieren a actividades biológicas atribuibles a la unión de la región Fc de un anticuerpo a sus efectores, tal como el complejo C1 y el receptor de Fc. Las funciones efectoras de ejemplo incluyen citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) mediada por la interacción de anticuerpos y C1q en el

25 complejo C1; citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC) mediada por la unión de la región Fc de un anticuerpo al receptor de Fc en una célula efectora; y fagocitosis. Las funciones efectoras se pueden evaluar usando diversos ensayos tal como ensayo de unión a receptor de Fc, ensayo de unión a C1q, y ensayo de lisis celular.

"Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos" o "ADCC", como se

30 usa en la presente, se refiere a una reacción mediada por células en la que las células efectoras que expresan receptores Fc (FcR) reconocen el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno unido en una célula diana y posteriormente causan la lisis de la célula diana. "Actividad de ADCC" o "efecto de ADCC" se refiere a la capacidad del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se une a la célula diana para provocar una reacción de ADCC como

se describió anteriormente.

"Citotoxicidad dependiente del complemento" o "CDC", como se usa en la presente, se refiere a un mecanismo mediante el cual los anticuerpos pueden mediar en la lisis de células diana específicas a través de la activación del sistema del complemento de un organismo. En CDC, el C1q se une al anticuerpo y esta unión acciona la cascada del complemento que conduce a la formación del complejo de ataque a la membrana (MAC) (C5b a C9) en la superficie de la célula diana, como resultado de la activación clásica de la vía del complemento. "Actividad de CDC" o "efecto de CDC" se refiere a la capacidad del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se une a la célula diana para provocar una reacción de CDC como se describió anteriormente.

"Células diana", como se usa en la presente, se refiere a células a las que se unen específicamente anticuerpos que comprenden una región Fc, en general a través de la parte de proteína que es C-terminal a la región Fc. "Células efectoras" son leucocitos que expresan uno o más receptores Fc y realizan funciones efectoras. Los ejemplos de leucocitos humanos que median en la ADCC incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC), células aniquiladoras naturales (NK), monocitos, células T citotóxicas y neutrófilos; prefiriéndose PBMC y células NK. Las células efectoras pueden aislarse de una fuente natural de las mismas, *por ejemplo*, de sangre o PBMC como se conoce en la técnica.

Una sustancia "aislada" ha sido alterada por la mano del hombre desde el estado natural. Si una composición o sustancia "aislada" se presenta en la naturaleza, se ha cambiado o removido de su entorno original, o ambos. Por ejemplo, un polinucleótido o un polipéptido presente naturalmente en un animal vivo no se "aisla", pero el mismo polinucleótido o polipéptido se "aisla" si se ha separado lo suficiente de los materiales coexistentes de su estado natural a fin de existir en un estado sustancialmente puro. Una "secuencia de ácido nucleico aislada" se refiere a la secuencia de una molécula de ácido nucleico aislada. En ciertas realizaciones, un "anticuerpo aislado o un fragmento de unión a antígeno del mismo" se refiere al anticuerpo o fragmentos de unión a antígeno del mismo que tiene una pureza de al menos 60%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% como se determina por métodos electroforéticos (tal como SDS-PAGE, enfoque isoeléctrico, electroforesis capilar), o métodos cromatográficos (tal como cromatografía de intercambio iónico o HPLC de fase inversa).

El término "vector", tal como se usa en la presente, se refiere a un vehículo en el que

se puede insertar operativamente un polinucleótido que codifica una proteína para provocar la expresión de esa proteína. Se puede utilizar un vector para transformar, transducir o transfectar una célula hospedadora para provocar la expresión del elemento genético que porta dentro de la célula hospedadora. Los ejemplos de vectores incluyen plásmidos, fagémidos, cósmidos, cromosomas artificiales tales como cromosoma artificial de levadura (YAC), cromosoma artificial bacteriano (BAC) o cromosoma artificial derivado de P1 (PAC), bacteriófagos tales como fago lambda o fago M13 y virus animales. Las categorías de virus animales utilizados como vectores incluyen retrovirus (incluyendo lentivirus), adenovirus, virus adenoasociados, herpesvirus (*por ejemplo*, virus del herpes simple), poxvirus, baculovirus, papilomavirus y papovavirus (*por ejemplo*, SV40). Un vector puede contener una variedad de elementos para controlar la expresión, que incluyen secuencias promotoras, secuencias de inicio de la transcripción, secuencias potenciadoras, elementos seleccionables y genes indicadores. Además, el vector puede contener un origen de replicación. Un vector también puede incluir materiales para ayudar en su entrada en la célula, que incluyen, de modo no taxativo, una partícula viral, un liposoma o un recubrimiento de proteína. Un vector puede ser un vector de expresión o un vector de clonación. La presente descripción proporciona vectores (por ejemplo, vectores de expresión) que contienen la secuencia de ácido nucleico proporcionada en la presente que codifica el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, al menos un promotor (por ejemplo, SV40, CMV, EF-1 α) unido operativamente a la secuencia de ácido nucleico y al menos un marcador de selección. Los ejemplos de vectores incluyen, pero no se limitan a, retrovirus (incluyendo lentivirus), adenovirus, virus adenoasociados, herpesvirus (por ejemplo, virus del herpes simple), poxvirus, baculovirus, virus del papiloma, papovavirus (por ejemplo, SV40), fago lambda, y el fago M13, plásmido pcDNA3.3, pMD18-T, pOptivec, pCMV, pEGFP, pIRES, pQD-Hyg-GSeu, pALTER, pBAD, pcDNA, pCal, pL, pET, pGEMEX, pGEX, pCI, pEGFT, pSV2, pFUSE, pVITRO, pVIVO, pMAL, pMONO, pSELECT, pUNO, pDUO, Psg5L, pBABE, pWPXL, pBI, p15TV-L, pPro18, pTD, pRS10, pLexA, pACT2.2, pCMV-SCRIPT.RTM., pCDM8, pCDNA1.1/amp, pcDNA3.1, pRc/RSV, PCR 2.1, pEF-1, pFB, pSG5, pXT1, pCDEF3, pSVSPORT, pEF-Bos etc.

La frase "célula hospedadora", tal como se usa en la presente, se refiere a una célula en la que se puede introducir o se ha introducido un polinucleótido exógeno y/o un vector.

El término "sujeto" incluye animales humanos y no humanos. Los animales no humanos incluyen todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tal como primates no humanos, ratones, ratas, gatos, conejos, ovejas, perros, vacas, pollos, anfibios, y reptiles. Excepto cuando se indique, los términos "paciente", "sujeto" o "individuo" se utilizan

indistintamente en la presente.

El término "actividad antitumoral" significa una reducción en la proliferación, viabilidad o actividad metastásica de las células tumorales. Por ejemplo, la actividad antitumoral puede mostrarse por una disminución en la tasa de crecimiento de células anormales que surge durante la terapia o la estabilidad o reducción del tamaño del tumor, o una supervivencia más larga debido a la terapia en comparación con el control sin terapia. Dicha actividad se puede evaluar utilizando modelos tumorales *in vitro* o *in vivo* aceptados, que incluyen, entre otros, modelos de xenoinjerto, modelos de aloinjerto, modelos de virus de tumor mamario de ratón (MMTV) y otros modelos conocidos en la técnica para investigar la actividad antitumoral.

"Tratar" o "tratamiento" de una enfermedad, trastorno o condición como se usa en la presente incluye prevenir o aliviar una enfermedad, trastorno o afección, ralentizar el inicio o la tasa de desarrollo de una enfermedad, trastorno o condición, reducir el riesgo de desarrollar una enfermedad, trastorno o condición, prevenir o retrasar el desarrollo de síntomas asociados con una enfermedad, trastorno o condición, reducir o terminar los síntomas asociados con una enfermedad, trastorno o condición, generar una regresión completa o parcial de una enfermedad, trastorno o afección, curar una enfermedad, trastorno o condición o alguna combinación de estos.

El término "diagnóstico", "diagnostica" o "diagnosticar" se refiere a la identificación de un estado patológico, enfermedad o condición, tal como la identificación de una enfermedad relacionada con CD3, o se refiere a la identificación de un sujeto con una enfermedad relacionada con CD3 que se puede beneficiar de un régimen de tratamiento particular. En algunas realizaciones, el diagnóstico contiene la identificación de una cantidad o actividad anormal de CD3. En algunas realizaciones, el diagnóstico se refiere a la identificación de un cáncer en un sujeto.

Como se utiliza en la presente, el término "muestra biológica" o "muestra" se refiere a una composición biológica que se obtiene o se deriva de un sujeto de interés que contiene una entidad celular y/u otra entidad molecular que se va a caracterizar e/o identificar, por ejemplo, con base en características físicas, bioquímicas, químicas y/o fisiológicas. Una muestra biológica incluye, pero no se limita a, células, tejidos, órganos y/o fluidos biológicos de un sujeto, obtenidos por cualquier método conocido por aquellos expertos en la técnica. En algunas realizaciones, la muestra biológica es una muestra de fluido. En algunas realizaciones, la muestra de fluido es sangre entera, plasma, suero sanguíneo, moco (incluyendo drenaje nasal y flema), fluido peritoneal, fluido pleural, fluido torácico, saliva, orina,

fluido sinovial, fluido cefalorraquídeo (CSF), fluido de toracocentesis, fluido abdominal, ascitis o fluido pericárdico. En algunas realizaciones, la muestra biológica es un tejido o célula obtenida del estómago, corazón, hígado, bazo, pulmón, riñón, piel o vasos sanguíneos del sujeto.

5 "CD3", tal como se usa en la presente, se refiere a la proteína del Grupo de Diferenciación 3 e incluye todas las variantes, conformaciones, isoformas y especies homólogas de CD3 expresadas naturalmente por las células o por células transfectadas con el gen CD3. Por ejemplo, CD3 descrito en la presente puede referirse a la proteína del Grupo de Diferenciación 3 derivada de cualquier fuente de vertebrados, incluidos mamíferos tal como
10 primates (*por ejemplo*, humanos, monos) y roedores (*por ejemplo*, ratones y ratas). En mamíferos, la molécula CD3 es un complejo multiproteico de seis cadenas, que incluye: una cadena CD3gamma, una cadena CD3delta, dos cadenas CD3epsilon y un homodímero de cadenas CD3zeta, en donde la cadena CD3zeta es la extremidad intracelular de la molécula CD3, y las cadenas CD3gamma, CD3delta y CD3epsilon contienen dominio extracelular (ECD)
15 expresado en la superficie de las células T. La secuencia de ejemplo de CD3 humano incluye la proteína CD3epsilon humana (NCBI Ref Seq No. NP_000724), proteína CD3 delta humana (NCBI Ref Seq No. NP_000723) y proteína CD3gamma humana (NCBI Ref Seq No. NP_000064). La secuencia de ejemplo de CD3 no humano incluye la proteína CD3epsilon de *Macaca fascicularis* (mono) (NCBI Ref Seq No. NP_001270544), proteína CD 3delta de
20 *Macaca fascicularis* (mono) (NCBI Ref Seq No. NP_001274617), proteína CD3gamma de *Macaca fascicularis* (mono) (NCBI Ref Seq No. NP_001270839); Proteína CD3epsilon de *Mus musculus* (ratón) (NCBI Ref Seq No. NP_031674), proteína CD3delta de *Mus musculus* (ratón) (NCBI Ref Seq No. NP_038515), proteína CD3gamma de *Mus musculus domesticus* (ratón) (NCBI Ref Seq No. AAA37400); proteína CD3epsilon de *Rattus norvegicus* (rata) (NCBI Ref
25 Seq No. NP_001101610), proteína CD3delta de *Rattus norvegicus* (rata) (NCBI Ref Seq No. NP_037301), proteína CD3gamma de *Rattus norvegicus* (rata) (NCBI Ref Seq No. NP_001071114). En ciertas realizaciones, CD3 utilizado en la presente también puede ser CD3 recombinante, por ejemplo, que incluye proteína CD3epsilon recombinante, proteína CD3delta recombinante y proteína CD3gamma recombinante, que puede expresarse
30 opcionalmente como un complejo CD3 recombinante. El complejo CD3 recombinante puede expresarse en una superficie celular o, alternativamente, puede expresarse como una forma soluble que no está asociada en una superficie celular. En ciertas realizaciones, la CD3 es CD3 humana. Los términos "CD3", "CD-3", "CD 3", "grupo de diferenciación 3" pueden utilizarse indistintamente en la presente divulgación.

El término "anticuerpo anti-CD3" se refiere a un anticuerpo que se une específicamente a CD3 (por ejemplo, CD3 humano). El término "anticuerpo anti-CD3 humano" se refiere a un anticuerpo que se une específicamente a CD3 humano. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD3 proporcionado en la presente descripción se une específicamente a una proteína CD3gamma. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD3 proporcionado en la presente descripción se une específicamente a una proteína CD3delta. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD3 proporcionado en la presente descripción se une específicamente a una proteína CD3epsilon.

El término "CD3gamma", como se usa en la presente, pretende abarcar cualquier forma de CD3gamma, por ejemplo, 1) molécula de CD3gamma no procesada nativa, cadena de CD3gamma "de longitud completa" o variantes de CD3gamma de origen natural, que incluyen, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas; 2) cualquier forma de CD3gamma que resulte del procesamiento en la célula; o 3) longitud completa, un fragmento (*por ejemplo*, una forma truncada, un dominio extracelular/transmembrana) o una forma modificada (*por ejemplo*, una forma mutada, una forma glicosilada/PEGilada, una forma fusionada con etiqueta His/inmunofluorescencia) de la subunidad CD3gamma generada a través del método recombinante.

El término "CD3delta", como se usa en la presente, pretende abarcar cualquier forma de CD3delta, por ejemplo, 1) molécula de CD3delta no procesada nativa, cadena de CD3delta "de longitud completa" o variantes de CD3delta de origen natural, que incluyen, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas; 2) cualquier forma de CD3delta que resulte del procesamiento en la célula; o 3) longitud completa, un fragmento (*por ejemplo*, una forma truncada, un dominio extracelular/transmembrana) o una forma modificada (*por ejemplo*, una forma mutada, una forma glicosilada/PEGilada, una forma fusionada con etiqueta His/inmunofluorescencia) de la subunidad CD3delta generada a través del método recombinante.

El término "CD3epsilon", como se usa en la presente, pretende abarcar cualquier forma de CD3epsilon, por ejemplo, 1) molécula de CD3epsilon no procesada nativa, cadena de CD3epsilon "de longitud completa" o variantes de CD3epsilon de origen natural, que incluyen, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas; 2) cualquier forma de CD3epsilon que resulte del procesamiento en la célula; o 3) longitud completa, un fragmento (*por ejemplo*, una forma truncada, un dominio extracelular/transmembrana) o una forma modificada (*por ejemplo*, una forma mutada, una forma glicosilada/PEGilada, una forma fusionada con etiqueta

His/inmunofluorescencia) de la subunidad CD3epsilon generada a través del método recombinante.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD3 proporcionado en la presente descripción se une específicamente a CD3epsilon, pero no se une a CD3gamma (o CD3delta) o se une menos bien a CD3gamma (o CD3delta), *por ejemplo*, la afinidad de unión a CD3epsilon es al menos 10 veces menor que la de CD3gamma (o CD3delta), o al menos 50 veces menor, o al menos 100 veces menor, o al menos 200 veces menor que la de CD3gamma (o CD3delta). En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD3 proporcionado en la presente no tiene afinidad de unión detectable a CD3gamma (o CD3delta). En algunas realizaciones, la afinidad de unión se determina mediante un ensayo FACS. En algunas realizaciones, la afinidad de unión se determina mediante la Intensidad de Fluorescencia Media (MFI) detectada por el ensayo FACS.

Una enfermedad, trastorno o condición "relacionado con CD3" o "relacionado con CD3", tal como se utiliza en la presente, se refiere a cualquier enfermedad, trastorno o condición causada por, exacerbada por, o vinculada de otro modo a una mayor o menor expresión o actividades de CD3. En algunas realizaciones, la enfermedad, trastorno o condición relacionada con CD3 es un trastorno con relación a la proliferación celular excesiva, tal como, por ejemplo, cáncer. En ciertas realizaciones, la enfermedad o condición relacionada con CD3 se caracteriza por expresar o sobreexpresión de CD3 y/o genes relacionados con CD3.

El término "farmacéuticamente aceptable" indica que el portador, vehículo, diluyente, excipiente(s) y/o sal designados son generalmente química y/o físicamente compatibles con los otros ingredientes que comprenden la formulación, y fisiológicamente compatibles con el receptor de los mismos.

El término "célula que expresa CD3", como se usa en la presente, se refiere a una célula que expresa CD3 en la superficie de la célula.

Anticuerpos anti-CD3

La presente divulgación proporciona anticuerpos anti-CD3 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos. Los anticuerpos anti-CD3 y fragmentos de unión a antígeno proporcionados en la presente son capaces de unirse (*por ejemplo*, unirse específicamente) a CD3 (*por ejemplo*, CD3 humano).

La afinidad de unión del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo

proporcionados en la presente se puede representar por el valor K_D , que representa la relación de la velocidad de disociación a la velocidad de asociación (k_{off}/k_{on}) cuando la unión entre el antígeno y la molécula de unión a antígeno alcanza el equilibrio. La afinidad de unión a antígeno (por ejemplo, K_D) se puede determinar adecuadamente usando métodos adecuados conocidos en la técnica, que incluyen, por ejemplo, ensayo de citometría de flujo. En algunas realizaciones, la unión del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo al antígeno a diferentes concentraciones puede determinarse por citometría de flujo, la intensidad de fluorescencia media determinada (MFI) puede trazarse en primer lugar frente a la concentración de anticuerpo, el valor K_D puede calcularse a continuación ajustando la dependencia de la intensidad de fluorescencia de unión específica (Y) y la concentración de anticuerpos (X) en la ecuación de saturación de un sitio: $Y=B_{máx.} * X / (K_D + X)$ usando Prism versión 5 (GraphPad Software, San Diego, CA), donde $B_{máx.}$ se refiere a la máxima unión específica del anticuerpo probado al antígeno.

La unión de los anticuerpos o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos proporcionados en la presente a CD3 también se puede representar por el valor de "la mitad de la concentración efectiva máxima" (EC_{50}), que se refiere a la concentración de un anticuerpo donde se observa el 50 % de su unión máxima. El valor de EC_{50} se puede medir por ensayos de unión conocidos en la técnica, por ejemplo, ensayo de unión directa o indirecta tal como ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA), Ensayo FACS, y otros ensayos de unión. En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente son capaces de unirse específicamente a CD3 humano (*por ejemplo*, como se mide mediante ensayo FACS). En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente son capaces de unirse a CD3 tanto humano como de cynomolgus (*por ejemplo*, como se mide mediante ensayo FACS).

En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente son con una capacidad de activación de células T. En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente tienen una mayor capacidad de activación de células T que OKT3. OKT3 es el primer fármaco de anticuerpo monoclonal con especificidad para el antígeno CD3 humano aprobado por la FDA de EUA en 1986. OKT3 se ha descrito en la técnica anterior como un potente mitógeno de células T (Van Wauve, *J. Immunol.* 124 (1980), 2708-18), así como un potente asesino de células T (Wong *et al.*, *Transplantation* 50 (1990), 683-9). En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en

la presente tienen una capacidad de activación de células T mayor o al menos comparable en comparación con BMK-B219 o BMK-TCB. BMK-B219 es un anticuerpo anti-CD3 desarrollado por Johnson & Johnson, y su información se puede encontrar, por ejemplo, en WO2019224717A2. BMK-TCB es un anticuerpo anti-CD3 desarrollado por Roche, y su información se puede encontrar, por ejemplo, en WO2019154890A1.

La capacidad de activación de células T de los anticuerpos anti-CD3 se puede medir mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, se puede medir mediante el ensayo de activación de Jurkat NFAT-Luciferasa. En ciertas realizaciones, la capacidad de activación de células T se mide mediante el método descrito en el Ejemplo 2.3, Ejemplo 3.2 y Ejemplo 4.4 de la presente descripción.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente son con una capacidad de activación de PBMC. En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente tienen una mayor capacidad de activación de PBMC que OKT3, BMK-B219 y/o BMK-TCB. La capacidad de activación de PBMC de anticuerpos anti-CD3 se puede determinar mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, se puede determinar mediante ensayo ELISA, por *ejemplo*, midiendo el nivel de liberación de IL-2 y/o IFN γ , midiendo la expresión de CD25 en células T CD3⁺. En ciertas realizaciones, la capacidad de activación de PBMC se mide por el método como se describe en el ejemplo 3.6 de la presente divulgación.

Anticuerpos anti-CD3 ilustrativos

En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos que se unen específicamente a CD3, que comprende:

una o dos o tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y/o HCDR3) contenidas dentro de cualquiera de las secuencias de región variable de cadena pesada (VH) seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 7, 15, 23, 31, 39, 47, 55, 63, 71, 79, 87, 95, 108, 116, 124, 132, 140, 148, 156, 163, 164, 165, 166, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 213, 202, 203, 204, 205, 206, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244 y 245; y/o

una o dos o tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y/o LCDR3) contenidas dentro de cualquiera de las secuencias de región

variable de cadena ligera (VL) seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 8, 16, 24, 32, 40, 48, 56, 64, 72, 80, 88, 96, 109, 117, 125, 133, 141, 149, 157, 168, 169, 170, 197, 198, 199, 200, 207, 208, 209, 230, 231 y 232.

Un experto en la técnica puede definir o identificar límites de CDR de una región VH o VL mediante métodos bien conocidos en la técnica, siempre que se conozca la secuencia de aminoácidos de la región VH o VL. Por ejemplo, los límites CDR de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo pueden definirse o identificarse mediante las convenciones de Kabat, IMGT, Chothia o Al-Lazikani (Al-Lazikani, B., Chothia, C., Lesk, A. M., J. Mol. Biol., 273(4), 927 (1997); Chothia, C. et al., J Mol Biol. 5 de diciembre;186(3): 651-63 (1985); Chothia, C. y Lesk, A.M., J.Mol.Biol., 196,901 (1987); Chothia, C. et al., Nature. 21-28 de diciembre;342(6252):877-83 (1989); Kabat E.A. et al., Sequences of Proteins of immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Marie-Paule Lefranc et al., Developmental and Comparative Immunology, 27: 55-77 (2003); Marie-Paule Lefranc et al, Immunome Research, 1(3), (2005); Marie-Paule Lefranc, Molecular Biology of B cells (segunda edición), capítulo 26, 481-514, (2015)). En algunas realizaciones, los límites de CDR de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente se identifican mediante la convención de Kabat. En algunas realizaciones, los límites de CDR de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente se identifican mediante la convención de IMGT. En algunas realizaciones, los límites de CDR de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente se identifican mediante la convención de Chothia. En algunas realizaciones, los límites de CDR de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente se identifican mediante la convención de Al-Lazikani.

En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos que se unen específicamente a CD3 que comprende una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o 6) secuencias de CDR de un anticuerpo anti-CD3 25-G12-G6-C12, 40-C12-C10-E9, 8-B12-F9-B11, 31-F8-F5-C5, 16-F2-C11-D9, 20-E11-E11-C2, 7-D9-G10-H2, 7-D8-G12-E4, 2-F12-A6-G2, 3-C6-C11-F12, 4-F12-F1-A4, 3-F3-G12-E2, 124E3D6, 126A11A4, 127E2D3, 133B4C7, 140D2B10, 147C6F3 o 147E11E2.

El anticuerpo “25-G12-G6-C12”, como se usa en la presente, se refiere a un anticuerpo monoclonal de ratón que comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 7 y una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 8.

El anticuerpo “40-C12-C10-E9”, como se usa en la presente, se refiere a un anticuerpo monoclonal de ratón que comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 15 y una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 16.

5 El anticuerpo “8-B12-F9-B11”, como se usa en la presente, se refiere a un anticuerpo monoclonal de ratón que comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 23 y una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 24.

10 El anticuerpo “31-F8-F5-C5”, como se usa en la presente, se refiere a un anticuerpo monoclonal de ratón que comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 31 y una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 32.

15 El anticuerpo “16-F2-C11-D9”, como se usa en la presente, se refiere a un anticuerpo monoclonal de ratón que comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 39 y una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 40.

20 El anticuerpo “20-E11-E11-C2”, como se usa en la presente, se refiere a un anticuerpo monoclonal de ratón que comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 47 y una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 48.

El anticuerpo “7-D9-G10-H2”, como se usa en la presente, se refiere a un anticuerpo monoclonal de ratón que comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 55 y una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 56.

25 El anticuerpo “7-D8-G12-E4”, como se usa en la presente, se refiere a un anticuerpo monoclonal de ratón que comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 63 y una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 64.

30 El anticuerpo “2-F12-A6-G2”, como se usa en la presente, se refiere a un anticuerpo monoclonal de ratón que comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 71 y una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia

de la SEQ ID NO: 72.

El anticuerpo “3-C6-C11-F12”, como se usa en la presente, se refiere a un anticuerpo monoclonal de ratón que comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 79 y una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 80.

El anticuerpo “4-F12-F1-A4”, como se usa en la presente, se refiere a un anticuerpo monoclonal de ratón que comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 87 y una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 88.

El anticuerpo “3-F3-G12-E2”, como se usa en la presente, se refiere a un anticuerpo monoclonal de ratón que comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 95 y una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 96.

El anticuerpo “124E3D6”, como se usa en la presente, se refiere a un anticuerpo monoclonal de ratón que comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 108 y una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 109.

El anticuerpo “126A11A4”, como se usa en la presente, se refiere a un anticuerpo monoclonal de ratón que comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 116 y una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 117.

El anticuerpo “127E2D3”, como se usa en la presente, se refiere a un anticuerpo monoclonal de ratón que comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 124 y una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 125.

El anticuerpo “133B4C7”, como se usa en la presente, se refiere a un anticuerpo monoclonal de ratón que comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 132 y una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 133.

El anticuerpo “140D2B10”, como se usa en la presente, se refiere a un anticuerpo

monoclonal de ratón que comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 140 y una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 141.

5 El anticuerpo “147C6F3”, como se usa en la presente, se refiere a un anticuerpo monoclonal de ratón que comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 148 y una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 149.

10 El anticuerpo “147E11E2”, como se usa en la presente, se refiere a un anticuerpo monoclonal de ratón que comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 156 y una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 157.

Las secuencias de aminoácidos específicas de la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera de cada anticuerpo de ejemplo como se describió anteriormente se muestran en la Tabla 3 a continuación.

15 En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VH como se establece en la SEQ ID NO: 7, y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VL como se establece en la SEQ ID NO: 8.

20 En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VH como se establece en la SEQ ID NO: 15, y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VL como se establece en la SEQ ID NO: 16.

25 En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VH como se establece en la SEQ ID NO: 23, y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VL como se establece en la SEQ ID NO: 24.

30 En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y

HCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VH como se establece en la SEQ ID NO: 31, y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VL como se establece en la SEQ ID NO: 32.

5 En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VH como se establece en la SEQ ID NO: 39, y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VL como se establece en la SEQ ID NO: 40.

10 En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VH como se establece en la SEQ ID NO: 47, y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VL como se establece en la SEQ ID NO: 48.

15 En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VH como se establece en la SEQ ID NO: 55, y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VL como se establece en la SEQ ID NO: 56.

20 En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VH como se establece en la SEQ ID NO: 63, y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VL como se establece en la SEQ ID NO: 64.

25 En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VH como se establece en la SEQ ID NO: 71, y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VL como se establece en la SEQ ID NO: 72.

30 En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VH como se establece en la SEQ ID

NO: 79, y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VL como se establece en la SEQ ID NO: 80.

5 En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VH como se establece en la SEQ ID NO: 87, y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VL como se establece en la SEQ ID NO: 88.

10 En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VH como se establece en la SEQ ID NO: 95, y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VL como se establece en la SEQ ID NO: 96.

15 En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VH como se establece en la SEQ ID NO: 108, y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VL como se establece en la SEQ ID NO: 109.

20 En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VH como se establece en la SEQ ID NO: 116, y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VL como se establece en la SEQ ID NO: 117.

25 En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VH como se establece en la SEQ ID NO: 124, y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VL como se establece en la SEQ ID NO: 125.

30 En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VH como se establece en la SEQ ID NO: 132, y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de la

secuencia de la región VL como se establece en la SEQ ID NO: 133.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VH como se establece en la SEQ ID NO: 140, y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VL como se establece en la SEQ ID NO: 141.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VH como se establece en la SEQ ID NO: 148, y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VL como se establece en la SEQ ID NO: 149.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VH como se establece en la SEQ ID NO: 156, y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VL como se establece en la SEQ ID NO: 157.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VH como se establece en la SEQ ID NO: 163, y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VL como se establece en la SEQ ID NO: 168.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VH como se establece en la SEQ ID NO: 163, y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VL como se establece en la SEQ ID NO: 169.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VH como se establece en la SEQ ID NO: 163, y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VL como se establece en la SEQ ID NO: 170.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VH como se establece en la SEQ ID NO: 164, y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de la
5 secuencia de la región VL como se establece en la SEQ ID NO: 168.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VH como se establece en la SEQ ID NO: 164, y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de la
10 secuencia de la región VL como se establece en la SEQ ID NO: 169.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VH como se establece en la SEQ ID NO: 164, y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de la
15 secuencia de la región VL como se establece en la SEQ ID NO: 170.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VH como se establece en la SEQ ID NO: 165, y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de la
20 secuencia de la región VL como se establece en la SEQ ID NO: 168.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VH como se establece en la SEQ ID NO: 165, y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de la
25 secuencia de la región VL como se establece en la SEQ ID NO: 169.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VH como se establece en la SEQ ID NO: 165, y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de la
30 secuencia de la región VL como se establece en la SEQ ID NO: 170.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos

proporcionados en la presente comprenden tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VH como se establece en la SEQ ID NO: 166, y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VL como se establece en la SEQ ID NO: 168.

- 5 En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VH como se establece en la SEQ ID NO: 166, y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VL como se establece en la SEQ ID NO: 169.
- 10 En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VH como se establece en la SEQ ID NO: 166, y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VL como se establece en la SEQ ID NO: 170.
- 15 En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VH como se establece en la SEQ ID NO: 186, y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VL como se establece en la SEQ ID NO: 169.
- 20 En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VH como se establece en la SEQ ID NO: 187, y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VL como se establece en la SEQ ID NO: 169.
- 25 En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VH como se establece en la SEQ ID NO: 188, y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VL como se establece en la SEQ ID NO: 169.
- 30 En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y

HCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VH como se establece en la SEQ ID NO: 189, y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VL como se establece en la SEQ ID NO: 169.

5 En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VH como se establece en la SEQ ID NO: 190, y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VL como se establece en la SEQ ID NO: 169.

10 En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VH como se establece en la SEQ ID NO: 191, y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VL como se establece en la SEQ ID NO: 169.

15 En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VH como se establece en la SEQ ID NO: 192, y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VL como se establece en la SEQ ID NO: 169.

20 En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VH como se establece en la SEQ ID NO: 193, y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VL como se establece en la SEQ ID NO: 169.

25 En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VH como se establece en la SEQ ID NO: 194, y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VL como se establece en la SEQ ID NO: 169.

30 En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VH como se establece en la SEQ ID

NO: 195, y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VL como se establece en la SEQ ID NO: 169.

5 En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VH como se establece en la SEQ ID NO: 196, y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VL como se establece en la SEQ ID NO: 169.

10 En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VH como se establece en la SEQ ID NO: 165, y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VL como se establece en la SEQ ID NO: 197.

15 En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VH como se establece en la SEQ ID NO: 165, y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VL como se establece en la SEQ ID NO: 198.

20 En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VH como se establece en la SEQ ID NO: 165, y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VL como se establece en la SEQ ID NO: 199.

25 En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VH como se establece en la SEQ ID NO: 165, y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VL como se establece en la SEQ ID NO: 200.

30 En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VH como se establece en la SEQ ID NO: 202, y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de la

secuencia de la región VL como se establece en la SEQ ID NO: 207.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VH como se establece en la SEQ ID
5 NO: 202, y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VL como se establece en la SEQ ID NO: 208.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VH como se establece en la SEQ ID
10 NO: 202, y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VL como se establece en la SEQ ID NO: 209.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VH como se establece en la SEQ ID
15 NO: 203, y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VL como se establece en la SEQ ID NO: 207.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VH como se establece en la SEQ ID
20 NO: 203, y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VL como se establece en la SEQ ID NO: 208.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VH como se establece en la SEQ ID
25 NO: 203, y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VL como se establece en la SEQ ID NO: 209.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VH como se establece en la SEQ ID
30 NO: 204, y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VL como se establece en la SEQ ID NO: 207.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VH como se establece en la SEQ ID NO: 205, y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de la
5 secuencia de la región VL como se establece en la SEQ ID NO: 207.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VH como se establece en la SEQ ID NO: 206, y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de la
10 secuencia de la región VL como se establece en la SEQ ID NO: 207.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VH como se establece en la SEQ ID NO: 206, y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de la
15 secuencia de la región VL como se establece en la SEQ ID NO: 208.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VH como se establece en la SEQ ID NO: 206, y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de la
20 secuencia de la región VL como se establece en la SEQ ID NO: 209.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VH como se establece en la SEQ ID NO: 233, y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de la
25 secuencia de la región VL como se establece en la SEQ ID NO: 169.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VH como se establece en la SEQ ID NO: 234, y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de la
30 secuencia de la región VL como se establece en la SEQ ID NO: 169.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos

proporcionados en la presente comprenden tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VH como se establece en la SEQ ID NO: 235, y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VL como se establece en la SEQ ID NO: 169.

- 5 En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VH como se establece en la SEQ ID NO: 236, y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VL como se establece en la SEQ ID NO: 169.
- 10 En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VH como se establece en la SEQ ID NO: 237, y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VL como se establece en la SEQ ID NO: 169.
- 15 En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VH como se establece en la SEQ ID NO: 238, y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VL como se establece en la SEQ ID NO: 169.
- 20 En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VH como se establece en la SEQ ID NO: 239, y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VL como se establece en la SEQ ID NO: 169.
- 25 En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VH como se establece en la SEQ ID NO: 240, y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VL como se establece en la SEQ ID NO: 169.
- 30 En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y

HCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VH como se establece en la SEQ ID NO: 241, y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VL como se establece en la SEQ ID NO: 169.

5 En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VH como se establece en la SEQ ID NO: 242, y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VL como se establece en la SEQ ID NO: 169.

10 En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VH como se establece en la SEQ ID NO: 243, y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VL como se establece en la SEQ ID NO: 169.

15 En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VH como se establece en la SEQ ID NO: 244, y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VL como se establece en la SEQ ID NO: 169.

20 En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VH como se establece en la SEQ ID NO: 245, y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VL como se establece en la SEQ ID NO: 169.

25 En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VH como se establece en la SEQ ID NO: 165, y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VL como se establece en la SEQ ID NO: 230.

30 En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VH como se establece en la SEQ ID

NO: 165, y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VL como se establece en la SEQ ID NO: 231.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VH como se establece en la SEQ ID NO: 165, y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VL como se establece en la SEQ ID NO: 232.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VH como se establece en la SEQ ID NO: 235, y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VL como se establece en la SEQ ID NO: 230.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VH como se establece en la SEQ ID NO: 235, y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VL como se establece en la SEQ ID NO: 231.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VH como se establece en la SEQ ID NO: 236, y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VL como se establece en la SEQ ID NO: 230.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VH como se establece en la SEQ ID NO: 236, y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de la secuencia de la región VL como se establece en la SEQ ID NO: 231.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden al menos una CDR de cadena pesada o ligera (*por ejemplo*, 1, 2 o 3) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 25,

26, 27, 28, 29, 30, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 201, 162, 167, 210, 211, 212, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228 y 229.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden una región VH que comprende uno o dos o tres de HCDR1, HCDR2 y HCDR3 que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, 2, 3, 9, 10, 11, 17, 18, 19, 25, 26, 27, 33, 34, 35, 41, 42, 43, 49, 50, 51, 57, 58, 59, 65, 66, 67, 73, 74, 75, 81, 82, 83, 89, 90, 91, 102, 103, 104, 110, 111, 112, 118, 119, 120, 126, 127, 128, 134, 135, 136, 142, 143, 144, 150, 151, 152, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 201, 162, 210, 211, 212, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228 y 229.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden una región VL que comprende uno o dos o tres de LCDR1, LCDR2 y LCDR3 que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4, 5, 6, 12, 13, 14, 20, 21, 22, 28, 29, 30, 36, 37, 38, 44, 45, 46, 52, 53, 54, 60, 61, 62, 68, 69, 70, 76, 77, 78, 84, 85, 86, 92, 93, 94, 105, 106, 107, 113, 114, 115, 121, 122, 123, 129, 130, 131, 137, 138, 139, 145, 146, 147, 153, 154, 155, 182, 183, 184, 185, 167, 214, 215 y 216.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, 9, 17, 25, 33, 41, 49, 57, 65, 73, 81, 89, 102, 110, 118, 126, 134, 142, 150, 217, 218 y 219; una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2, 10, 18, 26, 34, 42, 50, 58, 66, 74, 82, 90, 103, 111, 119, 127, 135, 143, 151, 171, 172, 173, 201, 210, 211, 212, 220 y 222; y una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 3, 11, 19, 27, 35, 43, 51, 59, 67, 75, 83, 91, 104, 112, 120, 128, 136, 144, 152, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 221, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229 y 162.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos

proporcionados en la presente comprenden una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4, 12, 20, 28, 36, 44, 52, 60, 68, 76, 84, 92, 105, 113, 121, 129, 137, 145 y 153; una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 5, 13, 21, 29, 37, 45, 53, 61, 69, 77, 85, 93, 106, 114, 122, 130, 138, 146 y 154; y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 6, 14, 22, 30, 38, 46, 54, 62, 70, 78, 86, 94, 107, 115, 123, 131, 139, 147, 155, 182, 183, 184, 185, 214, 215, 216 y 167.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos proporcionados en la presente comprenden:

(a) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 1, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 2, y una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 3;

(b) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 9, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 10, y una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 11;

(c) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 17, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 18, y una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 19;

(d) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 25, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 26, y una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 27;

(e) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 33, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 34, y una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 35;

(f) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en

la SEQ ID NO: 41, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 42, y una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 43;

5 (g) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 49, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 50, y una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 51;

10 (h) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 57, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 58, y una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 59;

15 (i) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 65, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 66, y una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 67;

(j) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 73, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 74, y una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 75;

20 (k) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 81, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 82, y una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 83;

25 (l) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 89, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 90, y una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 91;

30 (m) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 102, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 103, y una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 104;

(n) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 110, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 111, y una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 112;

5 (o) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 118, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 119, y una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 120;

10 (p) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 126, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 127, y una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 128;

15 (q) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 134, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 135, y una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 136;

20 (r) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 142, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 143, y una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 144;

(s) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 150, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 151, y una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 152;

25 (t) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 219, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 201, y una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 162;

30 (u) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 9, 217 o 218; una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 10, 171, 172, 173, 220 o 222; una HCDR3 que

comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 11, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 221, 223, 224, 225, 226, 227, 228 o 229;

5 (v) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 150, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 212, y una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 152;

10 (w) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 150, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 210, y una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 152; o

(x) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 150, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 211, y una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 152.

15 En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos proporcionados en la presente comprenden:

20 (a) una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 4, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 5, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 6;

(b) una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 12, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 13, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 14;

25 (c) una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 20, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 21, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 22;

30 (d) una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 28, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se

establece en la SEQ ID NO: 29, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 30;

5 (e) una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 36, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 37, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 38;

10 (f) una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 44, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 45, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 46;

(g) una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 52, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 53, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 54;

15 (h) una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 60, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 61, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 62;

20 (i) una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 68, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 69, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 70;

25 (j) una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 76, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 77, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 78;

30 (k) una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 84, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 85, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 86;

(l) una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 92, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 93, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 94;

5 (m) una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 105, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 106, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 107;

10 (n) una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 113, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 114, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 115;

15 (o) una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 121, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 122, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 123;

20 (p) una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 129, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 130, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 131;

(q) una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 137, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 138, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 139;

25 (r) una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 145, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 146, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 147;

30 (s) una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 153, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 154, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos

como se establece en la SEQ ID NO: 155;

(t) una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 12, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 13, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 167; o

(u) una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 12, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 13, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 14, 182, 183, 184, 185, 214, 215 o 216.

10 En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos proporcionados en la presente comprenden:

(a) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 1, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 2, una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 3, una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 4, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 5, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 6;

(b) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 9, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 10, una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 11, una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 12, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 13, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 14;

(c) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 17, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 18, una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 19, una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 20, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 21, y una LCDR3 que

comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 22;

5 (d) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 25, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 26, una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 27, una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 28, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 29, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 30;

10 (e) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 33, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 34, una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 35, una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 36, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 37, y una LCDR3 que
15 comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 38;

(f) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 41, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 42, una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 43, una LCDR1 que comprende una secuencia de
20 aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 44, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 45, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 46;

(g) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 49, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 50, una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 51, una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 52, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 53, y una LCDR3 que
25 comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 54;

30 (h) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 57, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 58, una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos

como se establece en la SEQ ID NO: 59, una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 60, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 61, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 62;

5 (i) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 65, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 66, una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 67, una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 68, una LCDR2 que comprende una
10 secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 69, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 70;

(j) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 73, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 74, una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos
15 como se establece en la SEQ ID NO: 75, una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 76, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 77, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 78;

(k) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 81, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 82, una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 83, una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 84, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 85, y una LCDR3 que
20 comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 86;

(l) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 89, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 90, una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 91, una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 92, una LCDR2 que comprende una
30 secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 93, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 94;

secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 138, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 139;

(r) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 142, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 143, una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 144, una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 145, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 146, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 147;

(s) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 150, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 151, una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 152, una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 153, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 154, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 155;

(t) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 9, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 171, una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 11, una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 12, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 13, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 14;

(u) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 9, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 172, una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 11, una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 12, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 13, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 14;

(v) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 9, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se

secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 13, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 182;

5 (ff) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 9, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 10, una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 11, una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 12, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 13, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 183;

10 (gg) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 9, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 10, una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 11, una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 12, una LCDR2 que comprende una
15 secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 13, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 184;

(hh) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 9, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 10, una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos
20 como se establece en la SEQ ID NO: 11, una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 12, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 13, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 185;

(ii) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en
25 la SEQ ID NO: 9, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 220, una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 11, una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 12, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 13, y una LCDR3 que
30 comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 14;

(jj) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 9, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se

secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 13, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 214;

5 (tt) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 9, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 172, una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 223, una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 12, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 13, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 215;

10 (uu) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 9, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 10, una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 225, una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 12, una LCDR2 que comprende una
15 secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 13, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 14;

(vv) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 9, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 10, una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos
20 como se establece en la SEQ ID NO: 226, una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 12, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 13, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 14;

(ww) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 9, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 10, una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 227, una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 12, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 13, y una LCDR3 que
25
30 comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 14;

(xx) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 9, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se

(ccc) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 219, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 201, una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 162, una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 12, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 13, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 167;

(ddd) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 150, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 212, una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 152, una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 153, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 154, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 155;

(eee) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 150, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 210, una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 152, una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 153, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 154, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 155; o

(fff) una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 150, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 211, una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 152, una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 153, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 154, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 155.

Las SEQ ID NO de la región variable de cadena pesada (indicada como "H"), región variable de cadena ligera (indicada como "L"), HCDR y LCDR de cada uno de los 19 anticuerpos monoclonales descritos anteriormente se muestran en la Tabla 1 a continuación. A menos que se indique lo contrario, los límites de CDR como se describen en la presente fueron definidos o identificados por la convención de Kabat. Las secuencias de aminoácidos

de cada CDR de los 19 anticuerpos monoclonales de ejemplo se muestran en la Tabla 2 a continuación. Las secuencias de aminoácidos de cada VH y VL de los 19 anticuerpos monoclonales de ejemplo se muestran en la Tabla 3 a continuación.

Tabla 1. SEQ ID NO de VH, VL, HCDR y LCDR de 19 anticuerpos monoclonales de ejemplo.

Anticuerpo	Cadena	Región variable (SEQ ID NO)	CDR1 (SEQ ID NO)	CDR2 (SEQ ID NO)	CDR3 (SEQ ID NO)
25-G12-G6-C12	H	7	1	2	3
	L	8	4	5	6
40-C12-C10-E9	H	15	9	10	11
	L	16	12	13	14
8-B12-F9-B11	H	23	17	18	19
	L	24	20	21	22
31-F8-F5-C5	H	31	25	26	27
	L	32	28	29	30
16-F2-C11-D9	H	39	33	34	35
	L	40	36	37	38
20-E11-E11-C2	H	47	41	42	43
	L	48	44	45	46
7-D9-G10-H2	H	55	49	50	51
	L	56	52	53	54
7-D8-G12-E4	H	63	57	58	59
	L	64	60	61	62
2-F12-A6-G2	H	71	65	66	67
	L	72	68	69	70
3-C6-C11-F12	H	79	73	74	75
	L	80	76	77	78
4-F12-F1-A4	H	87	81	82	83
	L	88	84	85	86
3-F3-G12-E2	H	95	89	90	91
	L	96	92	93	94

Anticuerpo	Cadena	Región variable (SEQ ID NO)	CDR1 (SEQ ID NO)	CDR2 (SEQ ID NO)	CDR3 (SEQ ID NO)
124E3D6	H	108	102	103	104
	L	109	105	106	107
126A11A4	H	116	110	111	112
	L	117	113	114	115
127E2D3	H	124	118	119	120
	L	125	121	122	123
133B4C7	H	132	126	127	128
	L	133	129	130	131
140D2B10	H	140	134	135	136
	L	141	137	138	139
147C6F3	H	148	142	143	144
	L	149	145	146	147
147E11E2	H	156	150	151	152
	L	157	153	154	155

Tabla 2. Secuencias de aminoácidos de cada CDR de 19 anticuerpos monoclonales de ejemplo.

Descripción	SEQ ID NO	Secuencia de aminoácidos
HCDR1	1	SYVIY
	9	SYVIH
	17	DYGMH
	25	RYPIH
	33	DFNIH
	41	DYYMN
	49	GYFMN
	57	SYPMS
	65	SYGVS
	73	TYGMH
	81	SYTMS
	89	DYYMN

Descripción	SEQ ID NO	Secuencia de aminoácidos
	102	SYWMH
	110	SYWMH
	118	SYWMH
	126	SYWMH
	134	SYWMH
	142	SYWMH
	150	SYWMH
HCDR2	2	YINPYKDVTKYSEKFND
	10	YINPYNDVIKYNEKFKG
	18	YISSASGKIYYADTVKG
	26	YINPRNDYTKYTQRFKD
	34	YINPNDGGSTYNQKFKG
	42	DINPIHGGISSNQKFSD
	50	RFNPYNGDTFYNQNFKG
	58	TISSGGGNTYYPDSVKG
	66	VIWGDGNTNYNSDLKT
	74	YISNGGSTIYYADSVKG
	82	TISSGGGNTFYADSVKG
	90	EINPNNGGTTYRQTFFKG
	103	NINPSNGDTNYNEKFKS
	111	NINPSNGDTNYNEKFKS
	119	NIYPGSSSINYNEKFKS
	127	NINPSNGDTNFNEKFKS
	135	NINPSNGESNYNEKFKS
	143	NLNPSNGEINYNEKFKH
	151	NINPSNGATNYNEKFKS
HCDR3	3	AIYHDYDGFGY
	11	DSYYSYDGFAY
	19	VLRWSVNYVMDY
	27	SINDYDGFAY
	35	PFLDS
	43	RIYYGYDWYFDV
	51	GDY

Descripción	SEQ ID NO	Secuencia de aminoácidos
	59	GLYWYFDV
	67	VSYWYFDV
	75	PTWGGFAY
	83	SLYYYDGTYYVRKDYAMDY
	91	SGY
	104	DRSSQYYFDY
	112	DRSSQYYFDY
	120	DRSSQYYFDY
	128	DRSSQYYFDY
	136	DRSSQYYFDY
	144	DRSSQYYFDY
	152	DRSSQYYFDY
LCDR1	4	SASSSVTYIN
	12	SASSSVSYM
	20	ESSQSVLYSSNQKNYLA
	28	SASSSVSYM
	36	KASQDINSYLR
	44	SASSSVTSRYFF
	52	KSSQSLLDSDGKTYLN
	60	RSSQSIAHSNGDTYLE
	68	RASENIYSYLA
	76	RSSQSIAHSNGDTYLE
	84	RASENIFSNLA
	92	RSSQSIVHSNGNTYLE
	105	KSSQSLLNSRTRKNYLA
	113	KSSQSLLNSRTRKNYLA
	121	KSSQSLLNSRTRKNYLA
	129	KSSQSLLNSRTRKNYLA
	137	KSSQSLLNSRTRKNYLA
	145	KSSQSLLNSRTRKNYLA
	153	KSSQSLLNSRSRKNYLA
LCDR2	5	DTSKLAS
	13	DTSKLAS

Descripción	SEQ ID NO	Secuencia de aminoácidos
	21	WASTRES
	29	DTSKLAS
	37	GASSLVD
	45	STSNLAS
	53	LVSKLDS
	61	KVSNRIS
	69	NAKTLPE
	77	KVSNRIS
	85	AATNLAE
	93	KVSNRFS
	106	WASTRES
	114	WASTRES
	122	WASTRES
	130	WASTRES
	138	WASTRES
	146	WASTRES
	154	WASTRES
LCDR3	6	QQWSRNPLT
	14	QQWSSNPPT
	22	HQYLSSWT
	30	QQWSSNPLT
	38	LQYDEVPLT
	46	QQYSTSPST
	54	WQGTHFPFT
	62	FQGSHVPYT
	70	QHHYGTPPT
	78	FQGSHVPYT
	86	QQFWGTPWT
	94	FQGSHVPRT
	107	KQSYNLRT
	115	KQSFILRT
	123	TQSYNLRT
	131	KQSYTLRT

Descripción	SEQ ID NO	Secuencia de aminoácidos
	139	KQSYTLRT
	147	KQSYILRT
	155	TQSYTLRT

Tabla 3. Secuencias de aminoácidos de cada VH y VL de 19 anticuerpos monoclonales de ejemplo.

Anticuerpo	VH (SEQ ID NO)	VL (SEQ ID NO)
25-G12-G6-C12	EVQLQQSGPELVKPGASVK MSCKASGYKFTSYVIYWVK QKPGQGLEWIGYINPYKDV TKYSEKFNDKATLTSDKSSS TAYMEISLTSSEDSAVYYCA RAIYHDYDGFYWGQGLTV IVSA (SEQ ID NO: 7)	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTC SASSSVTYINWYQQMSGTSPKR WIYDTSKLASGVPARFSGSGS TSYSLTISSLEAEDAATYYCQWS RNPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO: 8)
40-C12-C10-E9	EVQLQLSGPELVKPGASVK MSCKASGYTFSSYVIHWVK QKPGQGLEWIGYINPYNDVI KYNEKFKGKATLTSDKSSST AYMELSSLTSSEDSAVYYCAR DSYYSYDGFAYWGQGLTV VSA (SEQ ID NO: 15)	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTC SASSSVSYMHWYQQKSGTSPK RWIYDTSKLASGVPARFSGSGS GTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQ WSSNPPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 16)
8-B12-F9-B11	EVQLVESGGGIVKPGGSRK LSCAASGFTFSDYGMHWV RQAPEKGLEWIAYISSASGK IYYADTVKGRFTISRDNAKNI LFLQM TSLRSED TAMY YCA RVL RWSVNYVM DYWGQGT SVTVSS (SEQ ID NO: 23)	DIVMTQSPSSLAVSAGEKVTMN CESSQSVLYSSNQKNYLAWYQQ KPGQSPKLLIYWASTRESGVPD RFTGTGSGTDFTLTISVQAEDL AVYYCHQYLSSWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 24)

Anticuerpo	VH (SEQ ID NO)	VL (SEQ ID NO)
31-F8-F5-C5	EVQLQQSGAELARPGASVR MSCKASGYTFTRYPIHWVK QRPGQGLEWIGYINPRNDY TKYTQRFKDKATLTADKSSS TAYMQLSSLTSEDSAVYYCA KSINDYDGFAYWGQGTTLV VSA (SEQ ID NO: 31)	DIVLSQSPTILSASPGEKVTMTC SASSSVSYMNWYQQRSGTSPK RWIYDTSKLASGVPARFSGSGS GTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQ WSSNPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO: 32)
16-F2-C11-D9	EVQLQQSGPELVKPGASVK MSCKASGYTFTDFNIHWVK QSLGKSLEWIGYINPNDGG STYNQKFKGKATLTINKSSS SAYMELRSLTSEDSAVYYCA IPFLDSWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO: 39)	TLMMTQSPSSMYASLGERVTITC KASQDINSYLRWYQQKPGKSPK TLIYGASSLVDGVPSRFSGRGSG QDYSLTISSLEYEDMGIYYCLQY DEVPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO: 40)
20-E11-E11-C2	EVQLQQSGPEVVKPGASVK ISCKASGYTFTDYIMNWVK QSHGKNLEWIGDINPIHGGI SSNQKFSDKATLTVDKSSNT AYLELRSLTSEDSAIYYCAR RIYYGYDWYFDVWGTGTTV TVSS (SEQ ID NO: 47)	DIVLSQSPAIMSASPGERVMTTC SASSSVTSRYFFWYQQKPGSSP KLWIYSTSNLASGVVPVRFSGSGS GTSYSLTINMAAEDAATYYCQQ YSTSPSTFGAGTKLELK (SEQ ID NO: 48)
7-D9-G10-H2	EVQLQQSGPELVKPGASVK ISCKASGYSFTGYFMNWVK QSHGKSLEWIGRFNPYNGD TFYNQNFKGKATLTVDKSSS TAHMELRSLTSEDSAVYYCA RGDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 55)	DIQMTQSPLTSLVLTIGQPASISCK SSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPG QSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTG SGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYY CWQGTHFPFTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 56)
7-D8-G12-E4	EVKLVESGGGLVKPGGSLK LSCAASGFTFSSYPMSWVR QTPAKRLEWVATISSGGGN TYYPDSVKGRFTISRDNAR	DIVLTQSPLSLPVSLGDQASISCR SSQSIASNGDYLEWYLQNP QSPKLLIYKVSNRISGVPDRFSG SGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYY

Anticuerpo	VH (SEQ ID NO)	VL (SEQ ID NO)
	NTLYLQMSSLRSEDAMYY CARGLYWYFDVWGAGTTV TVSS (SEQ ID NO: 63)	CFQGSHVPYTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 64)
2-F12-A6-G2	EVQLVESRPGLVAPSQSLSI TCTVSGFSLTSYGVSWVRQ PPGKGLEWLGVWGDGNT NYNSDLKTSLSISKDNSKSQ VFLKLDLQTDATYYCAK VSYWYFDVWGTGTTVTVS S (SEQ ID NO: 71)	DIQLTQPPASLSASVGETVTITCR ASENIYSYLAWYQQKQGKSPQL LVYNAKTLPEGVPSRFSGSGSG TQFSLKINSLQPEDFGTYYCQHH YGTPTFGTGKLELK (SEQ ID NO: 72)
3-C6-C11-F12	EVHLVESGGGLVQPGGSRK LSCAGSGFTFSTYGMHWV RQAPEKGLEWVAYISNGGS TIYYADSVKGRFTISRDNPN DTLFLHMTSLGSEDAMYY CARPTWGGFAYWGQGTLV TVSA (SEQ ID NO: 79)	DIVLTQSPLSLPVSLGDQASISCR SSQSIAHSNGDTYLEWYLQNP QSPKLLIYKVSNRISGVPDRFSG SGSGTDFTLKISRVEAEDLGVY CFQGSHVPYTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 80)
4-F12-F1-A4	EVKLVESGGGLVKPGGSLK LSCAASGFTFSSYTMSWIR QTPAKRLEWVATISSGGGN TFYADSVKGRFTISRDNARN TLNLQMSSLRSEDAMYYC ARSLYYYDGTYYVRKDYYAM DYWGQGSSVTSS (SEQ ID NO: 87)	DIQMTQSPASLSVSVGETVTISC RASENIFSNLAWYQQKQGKSPQ LLVYAATNLAEGVPSRFSGSRSG TQFSLKINSLQSEDFGSYYCQQF WGTPWTFGGGKLEVK (SEQ ID NO: 88)
3-F3-G12-E2	EVQLQQSGPELVKPGASVK ISCKASGNTFTDYMNWVK QSHGKSLEWIGEINPNNGG TTYRQTFK GKATLTVDKSST TAYMELRSLTSEDSAVYYCV LSGYWGQGTGLTVSS	DIVMTQSPLSLPVSLGDQVAISC RSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKP GQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVY YCFQGSHVPRTFGGGKLELK (SEQ ID NO: 96)

Anticuerpo	VH (SEQ ID NO)	VL (SEQ ID NO)
	(SEQ ID NO: 95)	
124E3D6	QVQLQQPGTELVKPGASVK LCKASGYTFTSYWMHWV KQRPQGGLWIGNINPSNG DTNYNEKFKSKATLTVDKSS STAYMQLSSLTSEDSAVYYC ARDRSSQYYFDYWGGTT LTVSS (SEQ ID NO: 108)	DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMS CKSSQSLLSRTRKKNYLAWYQQ KPGQSPKLLIWASTRESGVPD RFTGSGSGTDFTLTISVQAEDL AVYYCKQSYNLRFTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 109)
126A11A4	QVQLQQPGTELVKPGASVK LCKASGYTFTSYWMHWV KQRPEQGLEWIGNINPSNG DTNYNEKFKSKATLTVDKAS NTAYMQLSSLTSEDSAVYYC GRDRSSQYYFDYWGGTT LTVSS (SEQ ID NO: 116)	DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMS CKSSQSLLSRTRKKNYLAWYQQ KPGQSPKLLIWASTRESGVPD RFTGSGSGTDFTLTISVQAEDL AVYFCKQSFILRTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 117)
127E2D3	QVQLQQPGTELVKPGASVK LCKASGYTFTSYWMHWV KQRPGEGLWIGNIYPGSS SINYNEKFKSKATLTVDKSS STAYMQLSSLTSEDSAVYYC ARDRSSQYYFDYWGGTT LTVSS (SEQ ID NO: 124)	DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMS CKSSQSLLSRTRKKNYLAWYQQ KPGQSPKLLIWASTRESGVPD RFTGSGSGTDFTLTISVQAEDL AVYYCTQSYNLRFTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 125)
133B4C7	QVQLQQPGTELVKPGASVK LCKASGYTFTSYWMHWV KQRPQGGLWIGNINPSNG DTNFNEKFKSKATLTVDKSS STAYMQLSSLTSEDSAVYYC ARDRSSQYYFDYWGGTT	DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMS CNSSQSLLSRTRKKNYLAWYQQ KPGQSPKLLIWASTRESGVPD RFTGSGSGTDFTLTISVQAEDL AVYYCKQSYTLRFTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 133)

Anticuerpo	VH (SEQ ID NO)	VL (SEQ ID NO)
	LTVSS (SEQ ID NO: 132)	
140D2B10	QVQLQQPGTELVKPGASVK LSCKASGYTFTSYWMHWV KQRPGQGLEWIGNINPSNG ESNYNEKFKSKATLTVDKSS STAYMQLSSLTSEDYAVYYC ARDRSSQYYFDYWGGTT LTVSS (SEQ ID NO: 140)	DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMS CKSSQSLLNSRTRKNYLAWYQQ KPGQSPKLLIWASTRESGVPD RFTGSGSGTDFTLTISVQAEDL AVYYCKQSYTLRTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 141)
147C6F3	QVQLQQPGTELVKPGASVK LSCKASGYTFDSYWMHWV KQRPGQGLEWIGNLNPSN GEINYNEKFKHKATLTVDKS SSTAYMQLSSLTSEDSAVYY CSRDRSSQYYFDYWGGTT TLTVSS (SEQ ID NO: 148)	DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTLS KSSQSLLNSRTRKNYLAWYQQK SGQSPKLLMYWASTRESGVPDR FTGSGSGTDFTLTITNVQAEDLA VYYCKQSYILRTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 149)
147E11E2	QVQLQQPGTELVKPGTSVK LSCKASGYTFTSYWMHWV KQRPGQGLEWIGNINPSNG ATNYNEKFKSKATLTVDKSS STAYMQLSSLTSEDSAVYYC ARDRSSQYYFDYWGGTT LTVSS (SEQ ID NO: 156)	DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMS CKSSQSLLNSRSRKNYLAWYQQ KPGQSPKLLIWASTRESGVPD RFTGSGSGTDFTLTISVQAEDL AVYYCTQSYTLRTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 157)

Dado que cada uno de los 19 anticuerpos monoclonales de ejemplo puede unirse a CD3 y que la especificidad de unión a antígeno es proporcionada principalmente por las regiones CDR1, CDR2 y CDR3, las secuencias HCDR1, HCDR2 y HCDR3 y las secuencias LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de cada uno de los 19 anticuerpos monoclonales de ejemplo pueden "mezclarse y emparejarse" (es decir, las CDR de diferentes anticuerpos pueden

mezclarse y emparejarse, pero cada anticuerpo debe contener una HCDR1, HCDR2 y HCDR3 y una LCDR1, LCDR2 y LCDR3) para crear anticuerpos anti-CD3 o fragmentos de unión a antígeno de estos de la presente descripción. La unión a CD3 de estos anticuerpos "mixtos y emparejados" se puede probar utilizando los ensayos de unión descritos anteriormente y en los ejemplos. Preferentemente, cuando las secuencias de CDR de VH se mezclan y se emparejan, la secuencia de HCDR1, HCDR2 y/o HCDR3 de una secuencia de VH particular se reemplaza con una o más secuencias de CDR estructuralmente similares. De manera similar, cuando las secuencias de CDR de VL se mezclan y emparejan, la secuencia de LCDR1, LCDR2 y/o LCDR3 de una secuencia de VL particular se reemplaza preferentemente con una o más secuencias de CDR estructuralmente similares. Por ejemplo, las HCDR1 de los anticuerpos 25-G12-G6-C12 y 40-C12-C10-E9 comparten alguna similitud estructural y, por lo tanto, son susceptibles de mezcla y emparejamiento. Será fácilmente evidente para un experto en la técnica que pueden crearse secuencias de VH y VL novedosas sustituyendo una o más secuencias CDR de VH y/o VL con secuencias estructuralmente similares de las secuencias CDR divulgadas en la presente para los 19 anticuerpos monoclonales ejemplares.

Se conoce que las CDR son responsables de la unión a antígeno. Sin embargo, se ha encontrado que no todas las 6 CDR son indispensables o inmutables. En otras palabras, es posible sustituir o cambiar o modificar una o más CDR en cada uno de los 19 anticuerpos monoclonales ejemplares, y aun así conservar sustancialmente la afinidad de unión específica a CD3.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-CD3 y los fragmentos de unión a antígeno proporcionados en la presente comprenden una secuencia CDR3 de cadena pesada de uno de los anticuerpos anti-CD3 25-G12-G6-C12, 40-C12-C10-E9, 8-B12-F9-B11, 31-F8-F5-C5, 16-F2-C11-D9, 20-E11-E11-C2, 7-D9-G10-H2, 7-D8-G12-E4, 2-F12-A6-G2, 3-C6-C11-F12, 4-F12-F1-A4, 3-F3-G12-E2, 124E3D6, 126A11A4, 127E2D3, 133B4C7, 140D2B10, 147C6F3 y 147E11E2. En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-CD3 y los fragmentos de unión a antígeno proporcionados en la presente comprenden una secuencia CDR3 de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 3, 11, 19, 27, 35, 43, 51, 59, 67, 75, 83, 91, 104, 112, 120, 128, 136, 144 y 152. Las regiones CDR3 de cadena pesada se encuentran en el centro del sitio de unión a antígeno y, por lo tanto, se cree que hacen el mayor contacto con el antígeno y proporcionan la mayor energía libre a la afinidad del anticuerpo por el antígeno. También se cree que la CDR3 de cadena pesada es, por mucho, la CDR más diversa del sitio de unión a antígeno en términos de longitud, composición de aminoácidos y conformación por múltiples mecanismos de diversificación (Tonegawa S.

Nature. 302:575-81). La diversidad en la CDR3 de cadena pesada es suficiente para producir la mayoría de las especificidades de anticuerpos (Xu JL, Davis MM. *Immunity*. 13:37-45), así como la afinidad de unión a antígeno deseable (Schier R, *et al.*, *J Mol Biol*. 263:551-67).

En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden una región VH que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en las SEQ ID NO: 7, 15, 23, 31, 39, 47, 55, 63, 71, 79, 87, 95, 108, 116, 124, 132, 140, 148, 156, 163, 164, 165, 166, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 213, 202, 203, 204, 205, 206, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244 o 245, o una secuencia homóloga de esta que tiene al menos 80% (*por ejemplo*, al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99%) de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 7, 15, 23, 31, 39, 47, 55, 63, 71, 79, 87, 95, 108, 116, 124, 132, 140, 148, 156, 163, 164, 165, 166, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 213, 202, 203, 204, 205, 206, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244 o 245.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden una región VL que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en las SEQ ID NO: 8, 16, 24, 32, 40, 48, 56, 64, 72, 80, 88, 96, 109, 117, 125, 133, 141, 149, 157, 168, 169, 170, 197, 198, 199, 200, 207, 208, 209, 230, 231 o 232, o una secuencia homóloga de esta que tiene al menos 80% (*por ejemplo*, al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99%) identidad de secuencia con SEQ ID NO: 8, 16, 24, 32, 40, 48, 56, 64, 72, 80, 88, 96, 109, 117, 125, 133, 141, 149, 157, 168, 169, 170, 197, 198, 199, 200, 207, 208, 209, 230, 231 o 232.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden un par de secuencias de aminoácidos VH/VL seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 7/8, 15/16, 23/24, 31/32, 39/40, 47/48, 55/56, 63/64, 71/72, 79/80, 87/88, 95/96, 108/109, 116/117, 124/125, 132/133, 140/141, 148/149, 156/157, 163/168, 163/169, 163/170, 164/168, 164/169, 164/170, 165/168, 165/169, 165/170, 166/168, 166/169, 166/170, 186/169, 187/169, 188/169, 189/169, 190/169, 191/169, 192/169, 193/169, 194/169, 195/169, 196/169, 165/197, 165/198, 165/199, 165/200, 202/207, 202/208, 202/209, 203/207, 203/208, 203/209, 204/207, 205/207, 206/207, 206/208, 206/209, 233/169, 234/169, 235/169, 236/169, 237/169, 238/169, 239/169, 240/169, 241/169, 242/169, 243/169, 244/169, 245/169, 165/230, 165/231, 165/232, 235/230, 235/231, 236/230 y 236/231.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos proporcionados en la presente comprenden secuencias de región marco (FR) adecuadas, siempre que los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos se puedan unir específicamente a CD3. Las secuencias de CDR proporcionadas en la Tabla 2 anterior se obtienen a partir de anticuerpos de ratón C25, pero se pueden injertar a cualquier secuencia de FR adecuada de cualquier especie adecuada tal como ratón, ser humano, rata, conejo, entre otros, usando métodos adecuados conocidos en la técnica tales como técnicas recombinantes.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos proporcionados en la presente se humanizan. Un anticuerpo humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo es deseable por su inmunogenicidad reducida en humanos. Un anticuerpo humanizado es quimérico en sus regiones variables, ya que las secuencias CDR no humanas se injertan en secuencias FR humanas o sustancialmente humanas. La humanización de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se puede realizar esencialmente sustituyendo los genes CDR no humanos (tal murinos) por los genes CDR humanos correspondientes en un gen de inmunoglobulina humana (ver, por ejemplo, Jones *et al.*, (1986) *Nature* 321:522-525; Riechmann *et al.*, (1988) *Nature* 332:323-327; Verhoeven *et al.*, (1988) *Science* 239:1534-1536).

Se pueden seleccionar dominios variables de cadena pesada y cadena ligera humanos adecuados para lograr este propósito usando métodos conocidos en la técnica. En un ejemplo ilustrativo, se puede utilizar el enfoque de "mejor ajuste", donde una secuencia de dominio variable de anticuerpo no humano (por ejemplo, de roedor) se analiza o se somete a BLAST contra una base de datos de secuencias de dominio variable humano conocidas, y la secuencia humana más cercana a la secuencia de consulta no humana se identifica y se utiliza como el andamiaje humano para injertar las secuencias de CDR no humanas (véase, por ejemplo, Sims *et al.*, (1993) *J. Immunol.* 151:2296; Chothia *et al.*, (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901). Alternativamente, se puede utilizar un marco derivado de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos para el injerto de las CDR no humanas (véase, por ejemplo, Carter *et al.*, (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA*, 89:4285; Presta *et al.*, (1993) *J. Immunol.*, 151:2623).

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-CD3 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos proporcionados en la presente se humanizan. En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno humanizados de los mismos proporcionados

en la presente se componen de sustancialmente todas las secuencias humanas excepto por las secuencias CDR que no son humanas. En algunas realizaciones, las FR de región variable y las regiones constantes, si están presentes, son total o sustancialmente de secuencias de inmunoglobulina humana. Las secuencias FR humanas y las secuencias de la región constante humana pueden derivarse de diferentes genes de inmunoglobulina humana, por ejemplo, secuencias FR derivadas de un anticuerpo humano y la región constante de otro anticuerpo humano. En algunas realizaciones, el anticuerpo humanizado o fragmento de unión a antígeno de este comprende cadena pesada humana HFR1, HFR2, HFR3 y HFR4, y/o cadena ligera LFR1, LFR2, LFR3 y LFR4.

En algunas realizaciones, las regiones FR derivadas de humano pueden comprender la misma secuencia de aminoácidos que la inmunoglobulina humana de la que se deriva. En algunas realizaciones, uno o más residuos de aminoácidos de la FR humana se sustituyen con los residuos correspondientes del anticuerpo no humano original. Esto puede ser deseable en ciertas realizaciones para hacer que el anticuerpo humanizado o su fragmento se aproxime estrechamente a la estructura de anticuerpo original no humano, a fin de optimizar las características de unión (por ejemplo, incrementar la afinidad de unión). En ciertas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno humanizado del mismo proporcionado en la presente comprende no más de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 sustituciones de residuos de aminoácidos en cada una de las secuencias FR humanas, o no más de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 sustituciones de residuos de aminoácidos en todas las FR de un dominio variable de cadena pesada o ligera. En algunas realizaciones, dicho cambio en el residuo de aminoácido podría estar presente solo en las regiones FR de la cadena pesada, solo en las regiones FR de la cadena ligera o en ambas cadenas. En ciertas realizaciones, uno o más aminoácidos de las secuencias de FR humanas se mutan aleatoriamente para incrementar la afinidad de unión. En ciertas realizaciones, uno o más aminoácidos de las secuencias de FR humanas se vuelven a mutar a los aminoácidos correspondientes del anticuerpo no humano original a fin de incrementar la afinidad de unión.

En algunas realizaciones, uno, dos, tres o cuatro aminoácidos en la una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en las posiciones 45, 46, 48 y 70 con respecto a SEQ ID NO: 168 (correspondiente a las posiciones 46, 47, 49 y 71 respectivamente de acuerdo con la numeración de Kabat, o correspondiente a las posiciones 52, 53, 55 y 87 respectivamente de acuerdo con la numeración de IMGT) de las secuencias FR de cadena ligera humana de los anticuerpos anti-CD3 humanizados o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente se retromutan al o los aminoácidos correspondientes

del anticuerpo de ratón original.

Por ejemplo, un aminoácido en la posición 45 con respecto a SEQ ID NO: 168 (correspondiente a la posición 46 de acuerdo con la numeración de Kabat, o la posición 52 de acuerdo con la numeración de IMGT) de las secuencias FR de cadena ligera humana de los anticuerpos anti-CD3 humanizados o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente se retromuta al aminoácido correspondiente del anticuerpo de ratón original. En una realización, leucina en la posición 45 con respecto a SEQ ID NO: 168 (correspondiente a la posición 46 de acuerdo con la numeración de Kabat, o la posición 52 de acuerdo con la numeración de IMGT) de las secuencias FR de cadena ligera humana de los anticuerpos anti-CD3 humanizados o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente se retromuta al aminoácido correspondiente del anticuerpo de ratón original. En otra realización, leucina en la posición 45 con respecto a SEQ ID NO: 168 (correspondiente a la posición 46 de acuerdo con la numeración de Kabat, o la posición 52 de acuerdo con la numeración de IMGT) de las secuencias FR de cadena ligera humana de los anticuerpos anti-CD3 humanizados o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente se muta a arginina (*es decir*, L45R).

Para otro ejemplo, un aminoácido en la posición 46 con respecto a SEQ ID NO: 168 (correspondiente a la posición 47 de acuerdo con la numeración de Kabat, o la posición 53 de acuerdo con la numeración de IMGT) de las secuencias FR de cadena ligera humana de los anticuerpos anti-CD3 humanizados o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente se retromuta al aminoácido correspondiente del anticuerpo de ratón original. En una realización, leucina en la posición 46 con respecto a SEQ ID NO: 168 (correspondiente a la posición 47 de acuerdo con la numeración de Kabat, o la posición 53 de acuerdo con la numeración de IMGT) de las secuencias FR de cadena ligera humana de los anticuerpos anti-CD3 humanizados o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente se retromuta al aminoácido correspondiente del anticuerpo de ratón original. En otra realización, leucina en la posición 46 con respecto a SEQ ID NO: 168 (correspondiente a la posición 47 de acuerdo con la numeración de Kabat, o la posición 53 de acuerdo con la numeración de IMGT) de las secuencias FR de cadena ligera humana de los anticuerpos anti-CD3 humanizados o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente se muta a triptófano (*es decir*, L46W).

Para otro ejemplo más, un aminoácido en la posición 48 con respecto a SEQ ID NO: 168 (correspondiente a la posición 49 de acuerdo con la numeración de Kabat, o la posición

55 de acuerdo con la numeración de IMGT) de las secuencias FR de cadena ligera humana de los anticuerpos anti-CD3 humanizados o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente se retromuta al aminoácido correspondiente del anticuerpo de ratón original. En una realización, lisina en la posición 48 con respecto a SEQ ID NO: 168 (correspondiente a la posición 49 de acuerdo con la numeración de Kabat, o la posición 55 de acuerdo con la numeración de IMGT) de las secuencias FR de cadena ligera humana de los anticuerpos anti-CD3 humanizados o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente se retromuta al aminoácido correspondiente del anticuerpo de ratón original. En otra realización, lisina en la posición 48 con respecto a SEQ ID NO: 168 (correspondiente a la posición 49 de acuerdo con la numeración de Kabat, o la posición 55 de acuerdo con la numeración de IMGT) de las secuencias FR de cadena ligera humana de los anticuerpos anti-CD3 humanizados o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente se muta a tirosina (*es decir*, K48Y).

Para otro ejemplo más, un aminoácido en la posición 70 con respecto a SEQ ID NO: 168 (correspondiente a la posición 71 de acuerdo con la numeración de Kabat, o la posición 87 de acuerdo con la numeración de IMGT) de las secuencias FR de cadena ligera humana de los anticuerpos anti-CD3 humanizados o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente se retromuta al aminoácido correspondiente del anticuerpo de ratón original. En una realización, fenilalanina en la posición 70 con respecto a SEQ ID NO: 168 (correspondiente a la posición 71 de acuerdo con la numeración de Kabat, o la posición 87 de acuerdo con la numeración de IMGT) de las secuencias FR de cadena ligera humana de los anticuerpos anti-CD3 humanizados o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente se retromuta al aminoácido correspondiente del anticuerpo de ratón original. En otra realización, fenilalanina en la posición 70 con respecto a SEQ ID NO: 168 (correspondiente a la posición 71 de acuerdo con la numeración de Kabat, o la posición 87 de acuerdo con la numeración de IMGT) de las secuencias FR de cadena ligera humana de los anticuerpos anti-CD3 humanizados o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente se muta a tirosina (*es decir*, F70Y).

Para otro ejemplo más, un aminoácido en la posición 45 con respecto a SEQ ID NO: 168 (correspondiente a la posición 46 de acuerdo con la numeración de Kabat, o la posición 52 de acuerdo con la numeración IMGT) y un aminoácido en la posición 48 con respecto a SEQ ID NO: 168 (correspondiente a la posición 49 de acuerdo con la numeración de Kabat, o la posición 55 de acuerdo con la numeración de IMGT) de las secuencias FR de cadena ligera humana de los anticuerpos anti-CD3 humanizados o fragmentos de unión a antígeno de estos

proporcionados en la presente se retromutan a los aminoácidos correspondientes del anticuerpo de ratón original. En una realización, leucina en la posición 45 con respecto a SEQ ID NO: 168 (correspondiente a la posición 46 de acuerdo con la numeración de Kabat, o la posición 52 de acuerdo con la numeración de IMGT) y lisina en la posición 48 con respecto a
5 SEQ ID NO: 168 (correspondiente a la posición 49 de acuerdo con la numeración de Kabat, o la posición 55 de acuerdo con la numeración de IMGT) de las secuencias FR de cadena ligera humana de los anticuerpos anti-CD3 humanizados o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente se retromutan a los aminoácidos correspondientes del anticuerpo de ratón original. En otra realización, leucina en la posición 45 con respecto a SEQ
10 ID NO: 168 (correspondiente a la posición 46 de acuerdo con la numeración de Kabat, o la posición 52 de acuerdo con la numeración de IMGT) y lisina en la posición 48 con respecto a SEQ ID NO: 168 (correspondiente a la posición 49 de acuerdo con la numeración de Kabat, o la posición 55 de acuerdo con la numeración de IMGT) de las secuencias FR de cadena ligera humana de los anticuerpos anti-CD3 humanizados o fragmentos de unión a antígeno de estos
15 proporcionados en la presente se vuelven a mutar a arginina y tirosina, respectivamente (*es decir*, L45R+K48Y).

Para otro ejemplo más, cada aminoácido en las posiciones 45, 46, 48 y 70 con respecto a SEQ ID NO: 168 (correspondiente a las posiciones 46, 47, 49 y 71 respectivamente de acuerdo con la numeración de Kabat, o correspondiente a las posiciones 52, 53, 55 y 87
20 respectivamente de acuerdo con la numeración de IMGT las secuencias FR de cadena ligera humana de los anticuerpos anti-CD3 humanizados o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente se retromutan al aminoácido correspondiente del anticuerpo de ratón original. En una realización, leucina, leucina, lisina y fenilalanina en las posiciones 45, 46, 48 y 70 respectivamente con respecto a SEQ ID NO: 168 (correspondiente a las
25 posiciones 46, 47, 49 y 71 respectivamente de acuerdo con la numeración de Kabat, o correspondiente a las posiciones 52, 53, 55 y 87 respectivamente de acuerdo con la numeración de IMGT las secuencias FR de cadena ligera humana de los anticuerpos anti-CD3 humanizados o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente se retromutan al aminoácido correspondiente del anticuerpo de ratón original. En otras
30 realizaciones, leucina, leucina, lisina y fenilalanina en las posiciones 45, 46, 48 y 70 respectivamente con respecto a SEQ ID NO: 168 (correspondiente a las posiciones 46, 47, 49 y 71 respectivamente de acuerdo con la numeración de Kabat, o correspondiente a las posiciones 52, 53, 55 y 87 respectivamente de acuerdo con la numeración de IMGT) de las secuencias FR de cadena ligera humana de los anticuerpos anti-CD3 humanizados o
35 fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente se muta a arginina,

triptófano, tirosina y tirosina, respectivamente (*es decir*, L45R+ L46W + K48Y +F70Y).

En algunas realizaciones, uno, dos, tres, cuatro o cinco aminoácidos en la o las posiciones seleccionadas del grupo que consiste en las posiciones 27, 48, 68, 70 y 72 con respecto a SEQ ID NO: 163 (correspondiente a las posiciones 27, 48, 67, 69 y 71 respectivamente de acuerdo con la numeración de Kabat, o correspondiente a las posiciones 28, 53, 76, 78 y 80 respectivamente de acuerdo con la numeración de IMGT) de las secuencias FR de cadena pesada humana de los anticuerpos anti-CD3 humanizados o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente se retromutan a los aminoácidos correspondientes del anticuerpo de ratón original.

Por ejemplo, un aminoácido en la posición 27 con respecto a SEQ ID NO: 163 (correspondiente a la posición 27 de acuerdo con la numeración de Kabat, o correspondiente a la posición 28 de acuerdo con la numeración de IMGT) de las secuencias FR de cadena pesada humana de los anticuerpos anti-CD3 humanizados o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente se retromuta al aminoácido correspondiente del anticuerpo de ratón original. En una realización, glicina en la posición 27 con respecto a SEQ ID NO: 163 (correspondiente a la posición 27 de acuerdo con la numeración de Kabat, o correspondiente a la posición 28 de acuerdo con la numeración de IMGT) de las secuencias FR de cadena pesada humana de los anticuerpos anti-CD3 humanizados o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente se retromuta al aminoácido correspondiente del anticuerpo de ratón original. En otra realización, glicina en la posición 27 con respecto a SEQ ID NO: 163 (correspondiente a la posición 27 de acuerdo con la numeración de Kabat, o correspondiente a la posición 28 de acuerdo con la numeración de IMGT) de las secuencias FR de cadena pesada humana de los anticuerpos anti-CD3 humanizados o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente se retromuta a tirosina (*es decir*, G27Y).

Para otro ejemplo, un aminoácido en la posición 48 con respecto a SEQ ID NO: 163 (correspondiente a la posición 48 de acuerdo con la numeración de Kabat, o correspondiente a la posición 53 de acuerdo con la numeración de IMGT) de las secuencias FR de cadena pesada humana de los anticuerpos anti-CD3 humanizados o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente se retromuta al aminoácido correspondiente del anticuerpo de ratón original. En una realización, metionina en la posición 48 con respecto a SEQ ID NO: 163 (correspondiente a la posición 48 de acuerdo con la numeración de Kabat, o correspondiente a la posición 53 de acuerdo con la numeración de IMGT) de las secuencias

FR de cadena pesada humana de los anticuerpos anti-CD3 humanizados o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente se retromuta al aminoácido correspondiente del anticuerpo de ratón original. En otra realización, metionina en la posición 48 con respecto a SEQ ID NO: 163 (correspondiente a la posición 48 de acuerdo con la numeración de Kabat, o correspondiente a la posición 53 de acuerdo con la numeración de IMGT) de las secuencias FR de cadena pesada humana de los anticuerpos anti-CD3 humanizados o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente se retromuta a isoleucina (*es decir*, M48I).

Para otro ejemplo, un aminoácido en la posición 68 con respecto a SEQ ID NO: 163 (correspondiente a la posición 67 de acuerdo con la numeración de Kabat, o correspondiente a la posición 76 de acuerdo con la numeración de IMGT) de las secuencias FR de cadena pesada humana de los anticuerpos anti-CD3 humanizados o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente se retromuta al aminoácido correspondiente del anticuerpo de ratón original. En una realización, valina en la posición 68 con respecto a SEQ ID NO: 163 (correspondiente a la posición 67 de acuerdo con la numeración de Kabat, o correspondiente a la posición 76 de acuerdo con la numeración de IMGT) de las secuencias FR de cadena pesada humana de los anticuerpos anti-CD3 humanizados o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente se retromuta al aminoácido correspondiente del anticuerpo de ratón original. En otra realización, valina en la posición 68 con respecto a SEQ ID NO: 163 (correspondiente a la posición 67 de acuerdo con la numeración de Kabat, o correspondiente a la posición 76 de acuerdo con la numeración de IMGT) de las secuencias FR de cadena pesada humana de los anticuerpos anti-CD3 humanizados o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente se retromuta a alanina (*es decir*, V68A).

Para otro ejemplo, un aminoácido en la posición 70 con respecto a SEQ ID NO: 163 (correspondiente a la posición 69 de acuerdo con la numeración de Kabat, o correspondiente a la posición 78 de acuerdo con la numeración de IMGT) de las secuencias FR de cadena pesada humana de los anticuerpos anti-CD3 humanizados o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente se retromuta al aminoácido correspondiente del anticuerpo de ratón original. En una realización, isoleucina en la posición 70 con respecto a SEQ ID NO: 163 (correspondiente a la posición 69 de acuerdo con la numeración de Kabat, o correspondiente a la posición 78 de acuerdo con la numeración de IMGT) de las secuencias FR de cadena pesada humana de los anticuerpos anti-CD3 humanizados o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente se retromuta al aminoácido

correspondiente del anticuerpo de ratón original. En otra realización, isoleucina en la posición 70 con respecto a SEQ ID NO: 163 (correspondiente a la posición 69 de acuerdo con la numeración de Kabat, o correspondiente a la posición 78 de acuerdo con la numeración de IMGT) de las secuencias FR de cadena pesada humana de los anticuerpos anti-CD3 humanizados o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente se retromuta a leucina (*es decir*, I70L).

Para otro ejemplo, un aminoácido en la posición 72 con respecto a SEQ ID NO: 163 (correspondiente a la posición 71 de acuerdo con la numeración de Kabat, o correspondiente a la posición 80 de acuerdo con la numeración de IMGT) de las secuencias FR de cadena pesada humana de los anticuerpos anti-CD3 humanizados o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente se retromuta al aminoácido correspondiente del anticuerpo de ratón original. En una realización, alanina en la posición 72 con respecto a SEQ ID NO: 163 (correspondiente a la posición 71 de acuerdo con la numeración de Kabat, o correspondiente a la posición 80 de acuerdo con la numeración de IMGT) de las secuencias FR de cadena pesada humana de los anticuerpos anti-CD3 humanizados o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente se retromuta al aminoácido correspondiente del anticuerpo de ratón original. En otra realización, alanina en la posición 72 con respecto a SEQ ID NO: 163 (correspondiente a la posición 71 de acuerdo con la numeración de Kabat, o correspondiente a la posición 80 de acuerdo con la numeración de IMGT) de las secuencias FR de cadena pesada humana de los anticuerpos anti-CD3 humanizados o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente se retromuta a serina (*es decir*, A72S).

Para otro ejemplo más, cada aminoácido en las posiciones 27, 70 y 72 con respecto a SEQ ID NO: 163 (correspondiente a las posiciones 27, 69 y 71 respectivamente de acuerdo con la numeración de Kabat, o correspondiente a las posiciones 28, 78 y 80 respectivamente de acuerdo con la numeración de IMGT) de las secuencias FR de cadena ligera humana de los anticuerpos anti-CD3 humanizados o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente se retromutan al aminoácido correspondiente del anticuerpo de ratón original. En una realización, glicina, isoleucina y alanina en las posiciones 27, 70 y 72 respectivamente con respecto a SEQ ID NO: 163 (correspondiente a la posición 27, 69 y 71 respectivamente de acuerdo con la numeración de Kabat, o correspondiente a la posición 28, 78 y 80 respectivamente de acuerdo con la numeración de IMGT) de las secuencias FR de cadena pesada humana de los anticuerpos anti-CD3 humanizados o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente se muta a tirosina, leucina y serina,

respectivamente (*es decir*, G27Y+I70L +A72S).

Para otro ejemplo más, cada aminoácido en las posiciones 27, 48, 68, 70 y 72 con respecto a SEQ ID NO: 163 (correspondiente a las posiciones 27, 48, 67, 69 y 71 respectivamente de acuerdo con la numeración de Kabat, o correspondiente a las posiciones 28, 53, 76, 78 y 80 respectivamente de acuerdo con la numeración de IMGT) de las secuencias FR de cadena pesada humana de los anticuerpos anti-CD3 humanizados o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente se retromutan a los aminoácidos correspondientes del anticuerpo de ratón original. En una realización, glicina, metionina, valina, isoleucina y alanina en las posiciones 27, 48, 68, 70 y 72 respectivamente con respecto a la SEQ ID NO: 163 (correspondiente a la posición 27, 48, 67, 69 y 71 respectivamente de acuerdo con la numeración de Kabat, o correspondiente a la posición 28, 53, 76, 78 y 80 respectivamente de acuerdo con la numeración IMGT) de las secuencias FR de cadena pesada humana de los anticuerpos anti-CD3 humanizados o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente se muta a tirosina, isoleucina, alanina, leucina y serina, respectivamente (*es decir*, G27Y+M48I+V68A+I70L+A72S).

En algunas realizaciones, uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis aminoácidos en la una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en la posición 27, 30, 48, 68, 70 y 72 con respecto a SEQ ID NO: 213 (correspondiente a la posición 27, 30, 48, 67, 69 y 71 respectivamente de acuerdo con la numeración de Kabat, o correspondiente a la posición 28, 35, 53, 76, 78 y 80 respectivamente de acuerdo con la numeración de IMGT) de las secuencias FR de cadena pesada humana de los anticuerpos anti-CD3 humanizados o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente se retromutan al uno o más aminoácidos correspondientes del anticuerpo de ratón original.

Por ejemplo, un aminoácido en la posición 27 con respecto a SEQ ID NO: 213 (correspondiente a la posición 27 de acuerdo con la numeración de Kabat, o correspondiente a la posición 28 de acuerdo con la numeración de IMGT) de las secuencias FR de cadena pesada humana de los anticuerpos anti-CD3 humanizados o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente se retromuta al aminoácido correspondiente del anticuerpo de ratón original. En una realización, glicina en la posición 27 con respecto a SEQ ID NO: 213 (correspondiente a la posición 27 de acuerdo con la numeración de Kabat, o correspondiente a la posición 28 de acuerdo con la numeración de IMGT) de las secuencias FR de cadena pesada humana de los anticuerpos anti-CD3 humanizados o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente se retromuta al aminoácido

correspondiente del anticuerpo de ratón original. En otra realización, glicina en la posición 27 con respecto a SEQ ID NO: 213 (correspondiente a la posición 27 de acuerdo con la numeración de Kabat, o correspondiente a la posición 28 de acuerdo con la numeración de IMGT) de las secuencias FR de cadena pesada humana de los anticuerpos anti-CD3 humanizados o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente se retromuta a tirosina (*es decir*, G27Y).

Para otro ejemplo, un aminoácido en la posición 30 con respecto a SEQ ID NO: 213 (correspondiente a la posición 30 de acuerdo con la numeración de Kabat, o correspondiente a la posición 35 de acuerdo con la numeración de IMGT) de las secuencias FR de cadena pesada humana de los anticuerpos anti-CD3 humanizados o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente se retromuta al aminoácido correspondiente del anticuerpo de ratón original. En una realización, serina en la posición 30 con respecto a SEQ ID NO: 213 (correspondiente a la posición 30 de acuerdo con la numeración de Kabat, o correspondiente a la posición 35 de acuerdo con la numeración de IMGT) de las secuencias FR de cadena pesada humana de los anticuerpos anti-CD3 humanizados o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente se retromuta al aminoácido correspondiente del anticuerpo de ratón original. En otra realización, serina en la posición 30 con respecto a SEQ ID NO: 213 (correspondiente a la posición 30 de acuerdo con la numeración de Kabat, o correspondiente a la posición 35 de acuerdo con la numeración de IMGT) de las secuencias FR de cadena pesada humana de los anticuerpos anti-CD3 humanizados o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente se retromuta a treonina (*es decir*, S30T).

Para otro ejemplo, un aminoácido en la posición 48 con respecto a SEQ ID NO: 213 (correspondiente a la posición 48 de acuerdo con la numeración de Kabat, o correspondiente a la posición 53 de acuerdo con la numeración de IMGT) de las secuencias FR de cadena pesada humana de los anticuerpos anti-CD3 humanizados o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente se retromuta al aminoácido correspondiente del anticuerpo de ratón original. En una realización, metionina en la posición 48 con respecto a SEQ ID NO: 213 (correspondiente a la posición 48 de acuerdo con la numeración de Kabat, o correspondiente a la posición 53 de acuerdo con la numeración de IMGT) de las secuencias FR de cadena pesada humana de los anticuerpos anti-CD3 humanizados o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente se retromuta al aminoácido correspondiente del anticuerpo de ratón original. En otra realización, metionina en la posición 48 con respecto a SEQ ID NO: 213 (correspondiente a la posición 48 de acuerdo con la

numeración de Kabat, o correspondiente a la posición 53 de acuerdo con la numeración de IMGT) de las secuencias FR de cadena pesada humana de los anticuerpos anti-CD3 humanizados o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente se retromuta a isoleucina (*es decir*, M48I).

5 Para otro ejemplo, un aminoácido en la posición 68 con respecto a SEQ ID NO: 213 (correspondiente a la posición 67 de acuerdo con la numeración de Kabat, o correspondiente a la posición 76 de acuerdo con la numeración de IMGT) de las secuencias FR de cadena pesada humana de los anticuerpos anti-CD3 humanizados o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente se retromuta al aminoácido correspondiente del anticuerpo de ratón original. En una realización, valina en la posición 68 con respecto a SEQ ID NO: 213 (correspondiente a la posición 67 de acuerdo con la numeración de Kabat, o correspondiente a la posición 76 de acuerdo con la numeración de IMGT) de las secuencias FR de cadena pesada humana de los anticuerpos anti-CD3 humanizados o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente se retromuta al aminoácido correspondiente del anticuerpo de ratón original. En otra realización, valina en la posición 68 con respecto a SEQ ID NO: 213 (correspondiente a la posición 67 de acuerdo con la numeración de Kabat, o correspondiente a la posición 76 de acuerdo con la numeración de IMGT) de las secuencias FR de cadena pesada humana de los anticuerpos anti-CD3 humanizados o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente se retromuta a alanina (*es decir*, V68A).

 Para otro ejemplo, un aminoácido en la posición 70 con respecto a SEQ ID NO: 213 (correspondiente a la posición 69 de acuerdo con la numeración de Kabat, o correspondiente a la posición 78 de acuerdo con la numeración de IMGT) de las secuencias FR de cadena pesada humana de los anticuerpos anti-CD3 humanizados o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente se retromuta al aminoácido correspondiente del anticuerpo de ratón original. En una realización, isoleucina en la posición 70 con respecto a SEQ ID NO: 213 (correspondiente a la posición 69 de acuerdo con la numeración de Kabat, o correspondiente a la posición 78 de acuerdo con la numeración de IMGT) de las secuencias FR de cadena pesada humana de los anticuerpos anti-CD3 humanizados o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente se retromuta al aminoácido correspondiente del anticuerpo de ratón original. En otra realización, isoleucina en la posición 70 con respecto a SEQ ID NO: 213 (correspondiente a la posición 69 de acuerdo con la numeración de Kabat, o correspondiente a la posición 78 de acuerdo con la numeración de IMGT) de las secuencias FR de cadena pesada humana de los anticuerpos anti-CD3

humanizados o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente se retromuta a leucina (*es decir*, I70L).

Para otro ejemplo, un aminoácido en la posición 72 con respecto a SEQ ID NO: 213 (correspondiente a la posición 71 de acuerdo con la numeración de Kabat, o correspondiente a la posición 80 de acuerdo con la numeración de IMGT) de las secuencias FR de cadena pesada humana de los anticuerpos anti-CD3 humanizados o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente se retromuta al aminoácido correspondiente del anticuerpo de ratón original. En una realización, alanina en la posición 72 con respecto a SEQ ID NO: 213 (correspondiente a la posición 71 de acuerdo con la numeración de Kabat, o correspondiente a la posición 80 de acuerdo con la numeración de IMGT) de las secuencias FR de cadena pesada humana de los anticuerpos anti-CD3 humanizados o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente se retromuta al aminoácido correspondiente del anticuerpo de ratón original. En otra realización, alanina en la posición 72 con respecto a SEQ ID NO: 213 (correspondiente a la posición 71 de acuerdo con la numeración de Kabat, o correspondiente a la posición 80 de acuerdo con la numeración de IMGT) de las secuencias FR de cadena pesada humana de los anticuerpos anti-CD3 humanizados o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente se retromuta a valina (*es decir*, A72V).

Para otro ejemplo más, cada aminoácido en las posiciones 27 y 30 con respecto a SEQ ID NO: 213 (correspondiente a la posición 27 y 30 respectivamente de acuerdo con la numeración de Kabat, o correspondiente a la posición 28 y 35 respectivamente de acuerdo con la numeración de IMGT) de las secuencias FR de cadena pesada humana de los anticuerpos anti-CD3 humanizados o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente se retromuta al aminoácido correspondiente del anticuerpo de ratón original. En una realización, glicina y serina en las posiciones 27 y 30 respectivamente con respecto a SEQ ID NO: 213 (correspondiente a la posición 27 y 30 respectivamente de acuerdo con la numeración de Kabat, o correspondiente a la posición 28 y 35 respectivamente de acuerdo con la numeración de IMGT) de las secuencias FR de cadena pesada humana de los anticuerpos anti-CD3 humanizados o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente se retromutan a los aminoácidos correspondientes del anticuerpo de ratón original. En otra realización, glicina y serina en las posiciones 27 y 30 respectivamente con respecto a SEQ ID NO: 213 (correspondiente a la posición 27 y 30 respectivamente de acuerdo con la numeración de Kabat, o correspondiente a la posición 28 y 35 respectivamente de acuerdo con la numeración de IMGT) de las secuencias FR de

cadena pesada humana de los anticuerpos anti-CD3 humanizados o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente se mutan a tirosina y treonina, respectivamente (*es decir*, G27Y+S30T).

5 Para otro ejemplo más, cada aminoácido en las posiciones 27, 30, 70 y 72 con respecto a SEQ ID NO: 213 (correspondiente a las posiciones 27, 30, 69 y 71 respectivamente de acuerdo con la numeración de Kabat, o correspondiente a las posiciones 28, 35, 78 y 80 respectivamente de acuerdo con la numeración de IMGT las secuencias FR de cadena ligera humana de los anticuerpos anti-CD3 humanizados o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente se retromutan al aminoácido correspondiente del anticuerpo de ratón original. En una realización, glicina, serina, isoleucina y alanina en las posiciones 27, 10 30, 70 y 72 respectivamente con respecto a SEQ ID NO: 213 (correspondiente a la posición 27, 30, 69 y 71 respectivamente de acuerdo con la numeración de Kabat, o correspondiente a la posición 28, 35, 78 y 80 respectivamente de acuerdo con la numeración de IMGT) de las secuencias FR de cadena pesada humana de los anticuerpos anti-CD3 humanizados o 15 fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente se retromutan a los aminoácidos correspondientes del anticuerpo de ratón original. En otra realización, glicina, serina, isoleucina y alanina en las posiciones 27, 30, 70 y 72 respectivamente con respecto a SEQ ID NO: 213 (correspondiente a la posición 27, 30, 69 y 71 respectivamente de acuerdo con la numeración de Kabat, o correspondiente a la posición 28, 35, 78 y 80 respectivamente de acuerdo con la numeración de IMGT) de las secuencias FR de cadena pesada humana de los anticuerpos anti-CD3 humanizados o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente se mutan a tirosina, treonina, leucina y valina, respectivamente (*es decir*, G27Y+S30T+ I70L +A72V).

25 Para otro ejemplo más, cada aminoácido en las posiciones 27, 30, 48, 68, 70 y 72 con respecto a SEQ ID NO: 213 (correspondiente a la posición 27, 30, 48, 67, 69 y 71 respectivamente de acuerdo con la numeración de Kabat, o correspondiente a la posición 28, 35, 53, 76, 78 y 80 respectivamente de acuerdo con la numeración IMGT) de las secuencias FR de cadena pesada humana de los anticuerpos anti-CD3 humanizados o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente se retromuta al aminoácido correspondiente del anticuerpo de ratón original. En una realización, glicina, serina, metionina, 30 valina, isoleucina y alanina en las posiciones 27, 30, 48, 68, 70 y 72 respectivamente con respecto a SEQ ID NO: 213 (correspondiente a la posición 27, 30, 48, 67, 69 y 71 respectivamente de acuerdo con la numeración de Kabat, o correspondiente a la posición 28, 35, 53, 76, 78 y 80 respectivamente de acuerdo con la numeración de IMGT) de las

secuencias FR de cadena pesada humana de los anticuerpos anti-CD3 humanizados o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente se retromutan a los aminoácidos correspondientes del anticuerpo de ratón original. En otra realización, glicina, serina, metionina, valina, isoleucina y alanina en las posiciones 27, 30, 48, 68, 70 y 72 respectivamente con respecto a SEQ ID NO: 213 (correspondiente a la posición 27, 30, 48, 67, 69 y 71 respectivamente de acuerdo con la numeración de Kabat, o correspondiente a la posición 28, 35, 53, 76, 78 y 80 respectivamente de acuerdo con la numeración IMGT) de las secuencias FR de cadena pesada humana de los anticuerpos anti-CD3 humanizados o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente se mutan a tirosina, treonina, isoleucina, alanina, leucina y valina, respectivamente (*es decir*, G27Y+S30T + M48I+V68A+ I70L +A72V).

En algunas realizaciones, un aminoácido en la posición 49 con respecto a SEQ ID NO: 207 (correspondiente a la posición 43 de acuerdo con la numeración de Kabat, o correspondiente a la posición 49 de acuerdo con la numeración de IMGT) de las secuencias FR de cadena ligera humana de los anticuerpos anti-CD3 humanizados o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente se retromuta al aminoácido correspondiente del anticuerpo de ratón original. En una realización, prolina en la posición 49 con respecto a SEQ ID NO: 207 (correspondiente a la posición 43 de acuerdo con la numeración de Kabat, o correspondiente a la posición 49 de acuerdo con la numeración de IMGT) de las secuencias FR de cadena ligera humana de los anticuerpos anti-CD3 humanizados o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente se retromuta al aminoácido correspondiente del anticuerpo de ratón original. En otra realización, prolina en la posición 49 con respecto a SEQ ID NO: 207 (correspondiente a la posición 43 de acuerdo con la numeración de Kabat, o correspondiente a la posición 49 de acuerdo con la numeración de IMGT) de las secuencias FR de cadena ligera humana de los anticuerpos anti-CD3 humanizados o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente se retromuta a serina (*es decir*, P49S).

En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona un anticuerpo humanizado o fragmento de unión a antígeno de este del clon 40-C12-C10-E9 (también denominado "40-C12-C10-E9 humanizado" en la presente descripción). En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona 12 40-C12-C10-E9 humanizado, que se designan como hu40E9-L1H1, hu40E9-L1H2, hu40E9-L1H3, hu40E9-L1H4, hu40E9-L2H1, hu40E9-L2H2, hu40E9-L2H3, hu40E9-L2H4, hu40E9-L3H1, hu40E9-L3H2, hu40E9-L3H3 y hu40E9-L3H4, respectivamente. Las SEQ ID NO de las regiones variables de cadena pesada

y ligera de cada 40-C12-C10-E9 humanizado se muestran en la Tabla 20 a continuación (las secuencias de CDR identificadas por la convención de Kabat están subrayadas). Cada uno de los 12 clones 40-C12-C10-E9 humanizados comprende una HCDR1, una HCDR2, una HCDR3, una LCDR1, una LCDR2 y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en las SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12, 13 y 14, respectivamente;

En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona un anticuerpo humanizado o fragmento de unión a antígeno de este del clon 147E11E2 (también denominado "147E11E2 humanizado" en la presente descripción). En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona 11 147E11E2 humanizado, que se designan como hu147E2-L1H2, hu147E2-L1H3, hu147E2-L1H3a, hu147E2-L1H3b, hu147E2-L1H4, hu147E2-L2H2, hu147E2-L2H3, hu147E2-L2H4, hu147E2-L3H2, hu147E2-L3H3 y hu147E2-L3H4, respectivamente. Las SEQ ID NO de las regiones variables de cadena pesada y ligera de cada 147E11E2 humanizado se muestran en la Tabla 20 a continuación (las secuencias de CDR identificadas por la convención de Kabat están subrayadas). Cada uno de los 11 clones 147E11E2 humanizados comprende una HCDR1, una HCDR2, una HCDR3, una LCDR1, una LCDR2 y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO:150, 212, 152, 153, 154 y 155, respectivamente.

En algunas realizaciones, algunos motivos (*por ejemplo*, motivo N55G56) que son propensos a la desaminación pueden identificarse dentro de una o más CDR (*por ejemplo*, HCDR2) de anticuerpos humanizados o fragmentos de unión a antígeno de estos. Para retirar dichos sitios de desaminación, se pueden introducir diferentes mutaciones en los motivos, pero aún así retener la unión específica a CD3. En algunas realizaciones, se identifica un sitio de desaminación en la secuencia de aminoácidos (*es decir*, SEQ ID NO: 203) de hu147E2-H3, que tienen las mismas CDR que la cadena pesada del clon 147E11E2. En algunas realizaciones, uno o más aminoácidos dentro de una o más CDR de un anticuerpo candidato se muta para retirar el sitio de desaminación. En algunas realizaciones, la mutación ocurre dentro de HCDR2 (*por ejemplo*, posición 55 con respecto a SEQ ID NO: 213) del anticuerpo candidato. Por consiguiente, la presente descripción proporciona anticuerpos anti-CD3 o fragmentos de unión a antígeno de estos que tienen las mismas CDR que el clon 147E11E2, excepto que la secuencia de aminoácidos de HCDR2 es diferente. Por ejemplo, los anticuerpos anti-CD3 o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 212. En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona un anticuerpo humanizado hu147E2-L1H3a, que comprende una HCDR2 que

comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 210, que lleva una mutación individual (*es decir*, N55Q) en comparación con la HCDR2 original (*es decir*, SEQ ID NO: 151), para retirar el motivo NG del sitio de desaminación. En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona un anticuerpo humanizado hu147E2-L1H3b, que comprende una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 211, que lleva una mutación individual (*es decir*, N55S) en comparación con la HCDR2 original (*es decir*, SEQ ID NO: 151), para retirar el motivo NG del sitio de desaminación.

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-CD3 o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 150, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 212, y una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 152. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-CD3 o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente descripción comprenden una HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 150, 212, 152, 153, 154 y 155, respectivamente; En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-CD3 o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente descripción comprenden una HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 150, 210, 152, 153, 154 y 155, respectivamente; En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-CD3 o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente descripción comprenden una HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 150, 211, 152, 153, 154 y 155, respectivamente; Las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 210, 211 y 212 se muestran en la Tabla 22 a continuación.

En algunas realizaciones, el anticuerpo humanizado o fragmento de unión a antígeno de este proporcionado en la presente comprende una región VH que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en las SEQ ID NO: 163, 164, 165, 166, 213, 202, 203, 204, 205, 206 o una secuencia homóloga de estas que tenga al menos 80% (*por ejemplo*, al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99%) de identidad con las SEQ ID NO: 163, 164, 165, 166, 213, 202, 203, 204, 205 o 206. En algunas realizaciones, el anticuerpo humanizado o fragmento de unión a antígeno de este proporcionado en la presente

comprende una región VL que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en las SEQ ID NO: 168, 169, 170, 207, 208, 209 o una secuencia homóloga de estas que tiene al menos 80% (*por ejemplo*, al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99%) de identidad con las SEQ ID NO: 168, 169, 170, 207, 208 o 209.

La presente divulgación también proporciona ejemplos de anticuerpos humanizados del clon 40-C12-C10-E9, que incluyen:

1) “hu40E9-L1H1” que comprende la región variable de cadena pesada de hu40E9-H1 (SEQ ID NO: 163) y la región variable de cadena ligera de hu40E9-L1 (SEQ ID NO: 168);

2) “hu40E9-L1H2” que comprende la región variable de cadena pesada de hu40E9-H2 (SEQ ID NO: 164) y la región variable de cadena ligera de hu40E9-L1 (SEQ ID NO: 168);

3) “hu40E9-L1H3” que comprende la región variable de cadena pesada de hu40E9-H3 (SEQ ID NO: 165) y la región variable de cadena ligera de hu40E9-L1 (SEQ ID NO: 168);

4) “hu40E9-L1H4” que comprende la región variable de cadena pesada de hu40E9-H4 (SEQ ID NO: 166) y la región variable de cadena ligera de hu40E9-L1 (SEQ ID NO: 168);

5) “hu40E9-L2H1” que comprende la región variable de cadena pesada de hu40E9-H1 (SEQ ID NO: 163) y la región variable de cadena ligera de hu40E9-L2 (SEQ ID NO: 169);

6) “hu40E9-L2H2” que comprende la región variable de cadena pesada de hu40E9-H2 (SEQ ID NO: 164) y la región variable de cadena ligera de hu40E9-L2 (SEQ ID NO: 169);

7) “hu40E9-L2H3” que comprende la región variable de cadena pesada de hu40E9-H3 (SEQ ID NO: 165) y la región variable de cadena ligera de hu40E9-L2 (SEQ ID NO: 169);

8) “hu40E9-L2H4” que comprende la región variable de cadena pesada de hu40E9-H4 (SEQ ID NO: 166) y la región variable de cadena ligera de hu40E9-L2 (SEQ ID NO: 169);

9) “hu40E9-L3H1” que comprende la región variable de cadena pesada de hu40E9-H1 (SEQ ID NO: 163) y la región variable de cadena ligera de hu40E9-L3 (SEQ ID NO: 170);

10) “hu40E9-L3H2” que comprende la región variable de cadena pesada de hu40E9-H2 (SEQ ID NO: 164) y la región variable de cadena ligera de hu40E9-L3 (SEQ ID NO: 170);

11) “hu40E9-L3H3” que comprende la región variable de cadena pesada de hu40E9-

H3 (SEQ ID NO: 165) y la región variable de cadena ligera de hu40E9-L3 (SEQ ID NO: 170);
o

12) “hu40E9-L3H4” que comprende la región variable de cadena pesada de hu40E9-H4 (SEQ ID NO: 166) y la región variable de cadena ligera de hu40E9-L3 (SEQ ID NO: 170).

5 La presente divulgación también proporciona ejemplos de anticuerpos humanizados del clon 147E211E2, que incluyen:

1) “hu14E2-L1H2” que comprende la región variable de cadena pesada de hu14E2-H2 (SEQ ID NO: 202) y la región variable de cadena ligera de hu14E2-L1 (SEQ ID NO: 207);

10 2) “hu14E2-L1H3” que comprende la región variable de cadena pesada de hu14E2-H3 (SEQ ID NO: 203) y la región variable de cadena ligera de hu14E2-L1 (SEQ ID NO: 207);

3) “hu14E2-L1H3a” que comprende la región variable de cadena pesada de hu14E2-H3a (SEQ ID NO: 204) y la región variable de cadena ligera de hu14E2-L1 (SEQ ID NO: 207);

4) “hu14E2-L1H3b” que comprende la región variable de cadena pesada de hu14E2-H3b (SEQ ID NO: 205) y la región variable de cadena ligera de hu14E2-L1 (SEQ ID NO: 207);

15 5) “hu14E2-L1H4” que comprende la región variable de cadena pesada de hu14E2-H4 (SEQ ID NO: 206) y la región variable de cadena ligera de hu14E2-L1 (SEQ ID NO: 207);

6) “hu14E2-L2H2” que comprende la región variable de cadena pesada de hu14E2-H2 (SEQ ID NO: 202) y la región variable de cadena ligera de hu14E2-L2 (SEQ ID NO: 208);

20 7) “hu14E2-L2H3” que comprende la región variable de cadena pesada de hu14E2-H3 (SEQ ID NO: 203) y la región variable de cadena ligera de hu14E2-L2 (SEQ ID NO: 208);

8) “hu14E2-L2H4” que comprende la región variable de cadena pesada de hu14E2-H4 (SEQ ID NO: 206) y la región variable de cadena ligera de hu14E2-L2 (SEQ ID NO: 208);

9) “hu14E2-L3H2” que comprende la región variable de cadena pesada de hu14E2-H2 (SEQ ID NO: 202) y la región variable de cadena ligera de hu14E2-L3 (SEQ ID NO: 209);

25 10) “hu14E2-L3H3” que comprende la región variable de cadena pesada de hu14E2-H3 (SEQ ID NO: 203) y la región variable de cadena ligera de hu14E2-L3 (SEQ ID NO: 209);

o

11) “hu14E2-L3H4” que comprende la región variable de cadena pesada de hu14E2-H4 (SEQ ID NO: 206) y la región variable de cadena ligera de hu14E2-L3 (SEQ ID NO: 209).

Tabla 20. Secuencias de aminoácidos de cada VH y VL de 40-C12-C10-E9 y 147E11E2 humanizados

Descripción	SEQ ID NO	Secuencia de aminoácidos
hu40E9-H1	163	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSS <u>SYVIH</u> WVRQAPGQGLEWMGY <u>INPYNDVIKYNEKFKGRVTIT</u> ADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARD <u>SYYSYDGF</u> <u>AYWGQGTLVTVSS</u>
hu40E9-H2	164	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSS <u>SYVIHW</u> VRQAPGQGLEWMGY <u>INPYNDVIKYNEKFKGRVTITA</u> DKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARD <u>SYYSYDGFA</u> <u>YWGQGTLVTVSS</u>
hu40E9-H3	165	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSS <u>SYVIHW</u> VRQAPGQGLEWMGY <u>INPYNDVIKYNEKFKGRVTLTS</u> DKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARD <u>SYYSYDGFA</u> <u>YWGQGTLVTVSS</u>
hu40E9-H4	166	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSS <u>SYVIHW</u> VRQAPGQGLEWIGY <u>INPYNDVIKYNEKFKGRATLTS</u> DKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARD <u>SYYSYDGFA</u> <u>YWGQGTLVTVSS</u>
hu40E9-L1	168	EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITC <u>SASSSVSYMH</u> WYQ QKPDQSPKLLIKDTSK <u>LASGVPSRFS</u> SGSGSGTDFTL TINSLEAEDAATYYC <u>QQWSSNPPT</u> FGGGTKVEIK
hu40E9-L2	169	EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITC <u>SASSSVSYMH</u> WYQ QKPDQSPKRLIYDTSK <u>LASGVPSRFS</u> SGSGSGTDFTL TINSLEAEDAATYYC <u>QQWSSNPPT</u> FGGGTKVEIK
hu40E9-L3	170	EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITC <u>SASSSVSYMH</u> WYQ QKPDQSPKRWIYDTSK <u>LASGVPSRFS</u> SGSGSGTDYT LTINSLEAEDAATYYC <u>QQWSSNPPT</u> FGGGTKVEIK
hu147E2-H1	213	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSS <u>SYWMH</u> WVRQAPGQGLEWMGN <u>INPSNGATNYNEKFKSRVTI</u> TADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARD <u>RSSQYYF</u>

		<u>DYWGQGTTVTVSS</u>
hu147E2-H2	202	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT <u>SYWMH</u> WVRQAPGQGLEWMGN <u>NINPSNGATNYNEKFKSRVTI</u> TADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARD <u>DRSSQYYF</u> <u>DYWGQGTTVTVSS</u>
hu147E2-H3	203	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT <u>SYWMH</u> WVRQAPGQGLEWMGN <u>NINPSNGATNYNEKFKSRVTL</u> TVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARD <u>DRSSQYYF</u> <u>DYWGQGTTVTVSS</u>
hu147E2-H3a	204	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT <u>SYWMH</u> WVRQAPGQGLEWMGN <u>NINPSQGATNYNEKFKSRVT</u> LTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARD <u>DRSSQYY</u> <u>FDYWGQGTTVTVSS</u>
hu147E2-H3b	205	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT <u>SYWMH</u> WVRQAPGQGLEWMGN <u>NINPSSGATNYNEKFKSRVTL</u> TVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARD <u>DRSSQYYF</u> <u>DYWGQGTTVTVSS</u>
hu147E2-H4	206	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT <u>SYWMH</u> WVRQAPGQGLEWIGN <u>NINPSNGATNYNEKFKSRATL</u> TVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARD <u>DRSSQYYF</u> <u>DYWGQGTTVTVSS</u>
hu147E2-L1	207	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCK <u>SSQSLLNSRSRKN</u> <u>YLA</u> WYQQKPGQP KLLIY <u>WASTRES</u> GV PDRF SGSG SGTDFTLTISLQAEDVAVYYCT <u>QSYTLRT</u> FGGGTKV EIK
hu147E2-L2	208	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCK <u>SSQSLLNSRSRKN</u> <u>YLA</u> WYQQKPGQSP KLLIY <u>WASTRES</u> GV PDRF SGSG SGTDFTLTISLQAEDVAVYYCT <u>QSYTLRT</u> FGGGTKV EIK
hu147E2-L3	209	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCK <u>SSQSLLNSRSRK</u> <u>NYLA</u> WYQQKPGKAP KLLIY <u>WASTRES</u> GV PSRF SGS GSGTDFTLTISLQPEDFATYYCT <u>QSYTLRT</u> FGGGTK VEIK

La presente descripción también proporciona anticuerpos humanizados y de afinidad mejorada o fragmentos de unión a antígeno de estos que se unen específicamente a CD3. En algunas realizaciones, la maduración de afinidad se realiza con base en las secuencias de hu40E9-H3 y hu40E9-L2, que tienen las mismas CDR que el clon 40-C12-C10-E9. En algunas realizaciones, uno o más aminoácidos dentro de una o más CDR de un anticuerpo candidato se muta para mejorar la afinidad, por ejemplo, la mutación ocurre dentro de HCDR1 (*por ejemplo*, las posiciones 31~33 con respecto a la SEQ ID NO: 165), HCDR2 (*por ejemplo*, posiciones 54~56 con respecto a la SEQ ID NO: 165), HCDR3 (*por ejemplo*, posiciones 99~106 con respecto a la SEQ ID NO: 165) o LCDR3 (*por ejemplo*, posiciones 91~93 con respecto a la SEQ ID NO: 169) del anticuerpo candidato. Por consiguiente, la presente descripción proporciona anticuerpos anti-CD3 o fragmentos de unión a antígeno de estos que tienen las mismas CDR que el clon 40-C12-C10-E9, excepto que las secuencias de aminoácidos de HCDR1, HCDR2, HCDR3 y/o LCDR3 son diferentes.

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-CD3 o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 219. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-CD3 o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 9, 217 o 218.

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-CD3 o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 201. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-CD3 o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 10, 171, 172, 173, 220 o 222.

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-CD3 o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 162. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-CD3 o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 11, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 221, 223, 224, 225, 226, 227, 228 o 229.

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-CD3 o fragmentos de unión a antígeno

de estos proporcionados en la presente comprenden una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 167. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-CD3 o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 14, 182, 183, 184, 185, 214, 215 o 216.

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-CD3 o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 219, una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 201, y una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 162. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-CD3 o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 12, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 13, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 167. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-CD3 o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente descripción comprenden una HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 219, 201, 162, 12, 13 y 167, respectivamente;

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-CD3 o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 9, 217 o 218; una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 10, 171, 172, 173, 220 o 222; una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 11, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 221, 223, 224, 225, 226, 227, 228 o 229. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-CD3 o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 12, una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 13, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 14, 182, 183, 184, 185, 214, 215 o 216. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-CD3 o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 9, 217 o 218; una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos

como se establece en la SEQ ID NO: 10, 171, 172, 173, 220 o 222; una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 11, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 221, 223, 224, 225, 226, 227, 228 o 229; una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 12, una LCDR2
5 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 13, y una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 14, 182, 183, 184, 185, 214, 215 o 216.

Las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 171~185, 201, 162, 167 y 214~229 se muestran en la Tabla 22 a continuación. Como se muestra en la Tabla 22 a continuación,
10 cada una de las HCDR de hu40E9 contiene una o más mutaciones en comparación con sus HCDR correspondientes contenidas dentro de hu40E9-H3 (*es decir*, SEQ ID NO: 165), y los aminoácidos después de la mutación están subrayados; de manera similar, cada una de las LCDR3 de hu40E9 contiene una o más mutaciones en comparación con la LCDR3 contenida dentro de hu40E9-L2 (*es decir*, SEQ ID NO: 169), y el o los aminoácidos después de la
15 mutación también están subrayados; de manera similar, cada una de las HCDR2 de hu147E2 contiene una mutación en comparación con la HCDR2 contenida dentro de hu40E9-H3 (*es decir*, SEQ ID NO: 165), y el aminoácido después de la mutación también está subrayado.

En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos que se unen específicamente a CD3, que
20 comprenden una o dos o tres HCDR contenidas dentro de cualquiera de las secuencias de la región VH seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244 y 245; y/o una o dos o tres LCDR contenidas dentro de cualquiera de las secuencias de la región VL seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 197, 198, 199, 200, 230, 231 y
25 232. En algunas realizaciones, la presente descripción también proporciona anticuerpos anti-CD3 o fragmentos de unión a antígeno de estos que comprenden HCDR1, HCDR2 y HCDR3 contenidos dentro de cualquiera de las secuencias de la región VH seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244 y 245; y LCDR1, LCDR2 y LCDR3
30 contenidas dentro de cualquiera de las secuencias de la región VL seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 197, 198, 199, 200, 230, 231 y 232.

En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos que se unen específicamente a CD3, que

comprenden una o dos o tres HCDR contenidas dentro de cualquiera de las secuencias de la región VH seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 213, 202, 203, 204, 205 y 206; y/o una o dos o tres LCDR contenidas dentro de cualquiera de las secuencias de región VL seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 207, 208 y 209. En algunas realizaciones, la presente descripción también proporciona anticuerpos anti-CD3 o fragmentos de unión a antígeno de estos que comprenden HCDR1, HCDR2 y HCDR3 contenidos dentro de cualquiera de las secuencias de la región VH seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 213, 202, 203, 204, 205 y 206; y LCDR1, LCDR2 y LCDR3 contenidas dentro de cualquiera de las secuencias de región VL seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 207, 208 y 209.

Las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 186~200 y 230~245 se muestran en la Tabla 21 a continuación. Como se muestra en la Tabla 21 a continuación, cada una de las regiones VH contiene una, dos o tres mutaciones en comparación con la secuencia de aminoácidos de hu40E9-H3 (*es decir*, SEQ ID NO: 165), y los aminoácidos después de la mutación están subrayados; de manera similar, cada una de las regiones VL contiene una o dos mutaciones en comparación con la secuencia de aminoácidos de hu40E9-L2 (*es decir*, SEQ ID NO: 169), y el o los aminoácidos después de la mutación también están subrayados.

Tabla 21. Secuencias de aminoácidos de regiones VH y VL de ejemplo

Descripción	SEQ ID NO	Secuencia de aminoácidos
hu40E9-H3-N55S.H	186	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSYVIHWVR QAPGQGLEWMGYINPYSDVIKYNEKFKGRVTLTSDKSTS TAYMELSSLRSED ¹ AVYYCARD ² SYYSYDGFAYWGQGTL VTVSS
hu40E9-H3-D99E.H	187	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSYVIHWVR QAPGQGLEWMGYINPYNDVIKYNEKFKGRVTLTSDKSTS TAYMELSSLRSED ¹ AVYYCAR ² ESYYSYDGFAYWGQGTL VTVSS
hu40E9-H3-Y101F.H	188	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSYVIHWVR QAPGQGLEWMGYINPYNDVIKYNEKFKGRVTLTSDKSTS TAYMELSSLRSED ¹ AVYYCARD ² SEYSYDGFAYWGQGTL VTVSS
hu40E9-H3-	189	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSYVIHWVR

D105E.H		QAPGQGLEWMGYINPYNDVIKYNEKFKGRVTLTSDKSTS TAYMELSSLRSED ^T AVYYCARD ^S YYSY <u>E</u> GFAYWGQGT LTVSS
hu40E9-H3- G106A.H	190	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSYVIHWVR QAPGQGLEWMGYINPYNDVIKYNEKFKGRVTLTSDKSTS TAYMELSSLRSED ^T AVYYCARD ^S YYSYD <u>A</u> GFAYWGQGT LTVSS
hu40E9-H3- Y54G.H	191	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSYVIHWVR QAPGQGLEWMGYINP <u>G</u> NDVIKYNEKFKGRVTLTSDKST STAYMELSSLRSED ^T AVYYCARD ^S YYSYDGFAYWGQGT LTVSS
hu40E9-H3- D56G.H	192	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSYVIHWVR QAPGQGLEWMGYINPYN <u>G</u> VIKYNEKFKGRVTLTSDKSTS TAYMELSSLRSED ^T AVYYCARD ^S YYSYDGFAYWGQGT LTVSS
hu40E9-H3- D99R.H	193	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSYVIHWVR QAPGQGLEWMGYINPYNDVIKYNEKFKGRVTLTSDKSTS TAYMELSSLRSED ^T AVYYCAR <u>R</u> SYYSYDGFAYWGQGT LTVSS
hu40E9-H3- S100R.H	194	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSYVIHWVR QAPGQGLEWMGYINPYNDVIKYNEKFKGRVTLTSDKSTS TAYMELSSLRSED ^T AVYYCARD <u>R</u> YYSYDGFAYWGQGT LTVSS
hu40E9-H3- Y102S.H	195	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSYVIHWVR QAPGQGLEWMGYINPYNDVIKYNEKFKGRVTLTSDKSTS TAYMELSSLRSED ^T AVYYCARD ^S Y <u>S</u> SYDGFAYWGQGT LTVSS
hu40E9-H3- D105R.H	196	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSYVIHWVR QAPGQGLEWMGYINPYNDVIKYNEKFKGRVTLTSDKSTS TAYMELSSLRSED ^T AVYYCARD ^S YYSY <u>R</u> GFAYWGQGT LTVSS
hu40E9-H5	233	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSYVIHWVR QAPGQGLEWMGYINP <u>GSG</u> VIKYNEKFKGRVTLTSDKST STAYMELSSLRSED ^T AVYYCARD ^S YYSYDGFAYWGQGT LTVSS

hu40E9-H6	234	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSYVIHWVR QAPGQGLEWMGYINPYNDVIKYNEKFKGRVTLTSDKSTS TAYMELSSLRSED ^T AVYYCARE <u>S</u> <u>F</u> SSYDGFAYWGQGT LTVSS
hu40E9-H7	235	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSYVIHWVR QAPGQGLEWMGYINP <u>G</u> <u>N</u> GVIKYNEKFKGRVTLTSDKST STAYMELSSLRSED ^T AVYYCARD ^S SYSSYDGFAYWGQGT LTVSS
hu40E9-H8	236	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSYVIHWVR QAPGQGLEWMGYINP <u>G</u> <u>N</u> DVIKYNEKFKGRVTLTSDKST STAYMELSSLRSED ^T AVYYCARE <u>S</u> <u>Y</u> SSYDGFAYWGQGT LTVSS
hu40E9-H9	237	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSYVIHWVR QAPGQGLEWMGYINPY <u>S</u> DVIKYNEKFKGRVTLTSDKSTS TAYMELSSLRSED ^T AVYYCARE <u>S</u> <u>F</u> SYDGFAYWGQGT LTVSS
hu40E9-H10	238	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSYVIHWVR QAPGQGLEWMGYINPYNDVIKYNEKFKGRVTLTSDKSTS TAYMELSSLRSED ^T AVYYCARD ^S YYSY <u>E</u> A ^F AYWGQGT LTVSS
hu40E9-H11	239	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSYVIHWVR QAPGQGLEWMGYINPYNDVIKYNEKFKGRVTLTSDKSTS TAYMELSSLRSED ^T AVYYCARD ^S YYSY <u>R</u> A ^F AYWGQGT LTVSS
hu40E9-H12	240	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSYVIHWVR QAPGQGLEWMGYINPYNDVIKYNEKFKGRVTLTSDKSTS TAYMELSSLRSED ^T AVYYCARD <u>D</u> YYSYDGFAYWGQGT LTVSS
hu40E9-H13	241	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSYVIHWVR QAPGQGLEWMGYINPYNDVIKYNEKFKGRVTLTSDKSTS TAYMELSSLRSED ^T AVYYCARD <u>G</u> YYSYDGFAYWGQGT LTVSS
hu40E9-H14	242	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSYVIHWVR QAPGQGLEWMGYINPYNDVIKYNEKFKGRVTLTSDKSTS TAYMELSSLRSED ^T AVYYCARE <u>S</u> YYSYDGFAYWGQGT

		VTVSS
hu40E9-H15	243	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSYVIHWVR QAPGQGLEWMGYINPYNDVIKYNEKFKGRVTLTSDKSTS TAYMELSSLRSED ^u TAVYYCARG ^u SYYSYDGFAYWGQGTL VTVSS
hu40E9-H16	244	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSD ^u YVIHWVR QAPGQGLEWMGYINPYNDVIKYNEKFKGRVTLTSDKSTS TAYMELSSLRSED ^u TAVYYCARD ^u SYYSYDGFAYWGQGTL VTVSS
hu40E9-H17	245	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSY ^u VIHWVR QAPGQGLEWMGYINPYNDVIKYNEKFKGRVTLTSDKSTS TAYMELSSLRSED ^u TAVYYCARD ^u SYYSYDGFAYWGQGTL VTVSS
hu40E9-L2- N93S.L	197	EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCSASSSVSYMHWYQQKP DQSPKRLIYDTSK ^u LASGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEA EDAATYYCQQWSS ^u PP ^u TFGGG ^u TKVEIK
hu40E9-L2- S91R.L	198	EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCSASSSVSYMHWYQQKP DQSPKRLIYDTSK ^u LASGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEA EDAATYYCQQW ^u RSNP ^u PP ^u TFGGG ^u TKVEIK
hu40E9-L2- N93R.L	199	EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCSASSSVSYMHWYQQKP DQSPKRLIYDTSK ^u LASGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEA EDAATYYCQQWSS ^u R ^u PP ^u TFGGG ^u TKVEIK
hu40E9-L2- N93W.L	200	EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCSASSSVSYMHWYQQKP DQSPKRLIYDTSK ^u LASGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEA EDAATYYCQQWSS ^u ^u PP ^u TFGGG ^u TKVEIK
hu40E9-L4	230	EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCSASSSVSYMHWYQQKP DQSPKRLIYDTSK ^u LASGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEA EDAATYYCQQW ^u RS ^u R ^u PP ^u TFGGG ^u TKVEIK
hu40E9-L5	231	EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCSASSSVSYMHWYQQKP DQSPKRLIYDTSK ^u LASGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEA EDAATYYCQQW ^u RS ^u PP ^u TFGGG ^u TKVEIK
hu40E9-L6	232	EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCSASSSVSYMHWYQQKP DQSPKRLIYDTSK ^u LASGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEA EDAATYYCQQW ^u RS ^u ^u PP ^u TFGGG ^u TKVEIK

Tabla 22. Secuencias de aminoácidos de CDR de ejemplo

Descripción	SEQ ID NO	Secuencia de aminoácidos
hu40E9-H16 (HCDR1)	217	<u>D</u> YVIH
hu40E9-H17 (HCDR1)	218	SY <u>Y</u> IH
Fórmula de hu40E9 HCDR1	219	X ₁₃ YX ₁₄ IH (en donde X ₁₃ =S o D; X ₁₄ =V o Y)
hu40E9-H3-N55S.H (HCDR2)	171	YINPY <u>S</u> DVIKYNEKFKG
hu40E9-H3-Y54G.H (HCDR2)	172	YINP <u>G</u> NDVIKYNEKFKG
hu40E9-H3-D56G.H (HCDR2)	173	YINPYN <u>G</u> VIKYNEKFKG
hu40E9-H5 (HCDR2)	220	YINP <u>G</u> S <u>G</u> VIKYNEKFKG
hu40E9-H7 (HCDR2)	222	YINP <u>G</u> N <u>G</u> VIKYNEKFKG
Fórmula de hu40E9 HCDR2	201	YINPX ₁ X ₂ X ₃ VIKYNEKFKG (en donde X ₁ = Y o G; X ₂ = N o S; y X ₃ = D o G)
hu40E9-H3-D99E.H (HCDR3)	174	<u>E</u> SYYSYDGFAY
hu40E9-H3-Y101F.H (HCDR3)	175	DS <u>F</u> YSYDGFAY
hu40E9-H3-D105E.H (HCDR3)	176	DSYYSY <u>E</u> GFAY
hu40E9-H3-G106A.H (HCDR3)	177	DSYYSYD <u>A</u> FAY
hu40E9-H3-D99R.H (HCDR3)	178	<u>R</u> SYYSYDGFAY
hu40E9-H3-S100R.H (HCDR3)	179	D <u>R</u> YYSYDGFAY
hu40E9-H3-Y102S.H (HCDR3)	180	DSY <u>S</u> SYDGFAY
hu40E9-H3-D105R.H (HCDR3)	181	DSYYSY <u>R</u> GFAY
hu40E9-H6 (HCDR3)	221	<u>E</u> S <u>F</u> SYDGFAY

hu40E9-H8 (HCDR3)	223	<u>E</u> SYSSYDGFAY
hu40E9-H9 (HCDR3)	224	<u>E</u> S <u>F</u> YSYDGFAY
hu40E9-H10 (HCDR3)	225	DSYYSY <u>E</u> AFAY
hu40E9-H11 (HCDR3)	226	DSYYSY <u>R</u> AFAY
hu40E9-H12 (HCDR3)	227	D <u>D</u> YYSYDGFAY
hu40E9-H13 (HCDR3)	228	D <u>G</u> YYSYDGFAY
hu40E9-H15 (HCDR3)	229	<u>G</u> SYYSYDGFAY
Fórmula de hu40E9 HCDR3	162	X ₄ X ₅ X ₆ X ₇ SYX ₈ X ₉ FAY (en donde X ₄ = D o E o R o G; X ₅ = S o R o D o G; X ₆ = Y o F; X ₇ = Y o S; X ₈ = D o E o R; X ₉ = G o A)
hu40E9-L2-N93S.L (LCDR3)	182	QQWSS <u>S</u> PPT
hu40E9-L2-S91R.L (LCDR3)	183	QQWR <u>S</u> NPPT
hu40E9-L2-N93R.L (LCDR3)	184	QQWSS <u>R</u> PPT
hu40E9-L2-N93W.L (LCDR3)	185	QQWSS <u>W</u> PPT
hu40E9-L4 (LCDR3)	214	QQWR <u>S</u> <u>R</u> PPT
hu40E9-L5 (LCDR3)	215	QQWR <u>S</u> <u>S</u> PPT
hu40E9-L6 (LCDR3)	216	QQWR <u>S</u> <u>W</u> PPT
Fórmula de hu40E9 LCDR3	167	QQWX ₁₀ SX ₁₁ PPT (en donde X ₁₀ = S o R; X ₁₁ = N o S o R o W)
hu147E2-H3a-N55Q (HCDR2)	210	NINPS <u>Q</u> GATNYNEKFKS
hu147E2-H3a-N55S (HCDR2)	211	NINP <u>S</u> <u>S</u> GATNYNEKFKS
Fórmula de hu147E2 HCDR2	212	NINPSX ₁₂ GATNYNEKFKS (X ₁₂ =Q, S o N)

La presente descripción proporciona además ejemplos de anticuerpos humanizados y

de afinidad mejorada del clon 40-C12-C10-E9, que incluyen:

- 1) "hu40E9-L2H3-N55S.H" que comprende la región variable de cadena pesada de hu40E9-H3-N55S.H (SEQ ID NO: 186) y la región variable de cadena ligera de hu40E9-L2 (SEQ ID NO: 169);
- 5 2) "hu40E9-L2H3-D99E.H" que comprende la región variable de cadena pesada de hu40E9-H3-D99E.H (SEQ ID NO: 187) y la región variable de cadena ligera de hu40E9-L2 (SEQ ID NO: 169);
- 10 3) "hu40E9-L2H3-Y101F.H" que comprende la región variable de cadena pesada de hu40E9-H3-Y101F.H (SEQ ID NO: 188) y la región variable de cadena ligera de hu40E9-L2 (SEQ ID NO: 169);
- 4) "hu40E9-L2H3-D105E.H" que comprende la región variable de cadena pesada de hu40E9-H3-D105E.H (SEQ ID NO: 189) y la región variable de cadena ligera de hu40E9-L2 (SEQ ID NO: 169);
- 15 5) "hu40E9-L2H3-G106A.H" que comprende la región variable de cadena pesada de hu40E9-H3-G106A.H (SEQ ID NO: 190) y la región variable de cadena ligera de hu40E9-L2 (SEQ ID NO: 169);
- 6) "hu40E9-L2H3-Y54G.H" que comprende la región variable de cadena pesada de hu40E9-H3-Y54G.H (SEQ ID NO: 191) y la región variable de cadena ligera de hu40E9-L2 (SEQ ID NO: 169);
- 20 7) "hu40E9-L2H3-D56G.H" que comprende la región variable de cadena pesada de hu40E9-H3-D56G.H (SEQ ID NO: 192) y la región variable de cadena ligera de hu40E9-L2 (SEQ ID NO: 169);
- 25 8) "hu40E9-L2H3-D99R.H" que comprende la región variable de cadena pesada de hu40E9-H3-D99R.H (SEQ ID NO: 193) y la región variable de cadena ligera de hu40E9-L2 (SEQ ID NO: 169);
- 9) "hu40E9-L2H3-S100R.H" que comprende la región variable de cadena pesada de hu40E9-H3-S100R.H (SEQ ID NO: 194) y la región variable de cadena ligera de hu40E9-L2 (SEQ ID NO: 169);
- 10) "hu40E9-L2H3-Y102S.H" que comprende la región variable de cadena pesada de

hu40E9-H3-Y102S.H (SEQ ID NO: 195) y la región variable de cadena ligera de hu40E9-L2 (SEQ ID NO: 169);

11) "hu40E9-L2H3-D105R.H" que comprende la región variable de cadena pesada de hu40E9-H3-D105R.H (SEQ ID NO: 196) y la región variable de cadena ligera de hu40E9-L2 (SEQ ID NO: 169);

12) "hu40E9-L2H3-N93S.L" que comprende la región variable de cadena pesada de hu40E9-H3 (SEQ ID NO: 165) y la región variable de la cadena ligera de hu40E9-L2-N93S.L (SEQ ID NO: 197);

13) "hu40E9-L2H3-S91R.L" que comprende la región variable de cadena pesada de hu40E9-H3 (SEQ ID NO: 165) y la región variable de la cadena ligera de hu40E9-L2-S91R.L (SEQ ID NO: 198);

14) "hu40E9-L2H3-N93R.L" que comprende la región variable de cadena pesada de hu40E9-H3 (SEQ ID NO: 165) y la región variable de la cadena ligera de hu40E9-L2-N93R.L (SEQ ID NO: 199);

15) 15) "hu40E9-L2H3-N93W.L" que comprende la región variable de cadena pesada de hu40E9-H3 (SEQ ID NO: 165) y la región variable de la cadena ligera de hu40E9-L2-N93W.L (SEQ ID NO: 200);

16) "hu40E9-L2H5" que comprende la región variable de cadena pesada de hu40E9-H5 (SEQ ID NO: 233) y la región variable de cadena ligera de hu40E9-L2 (SEQ ID NO: 169);

17) "hu40E9-L2H6" que comprende la región variable de cadena pesada de hu40E9-H6 (SEQ ID NO: 234) y la región variable de cadena ligera de hu40E9-L2 (SEQ ID NO: 169);

18) "hu40E9-L2H7" que comprende la región variable de cadena pesada de hu40E9-H7 (SEQ ID NO: 235) y la región variable de cadena ligera de hu40E9-L2 (SEQ ID NO: 169);

19) "hu40E9-L2H8" que comprende la región variable de cadena pesada de hu40E9-H8 (SEQ ID NO: 236) y la región variable de cadena ligera de hu40E9-L2 (SEQ ID NO: 169);

20) "hu40E9-L2H9" que comprende la región variable de cadena pesada de hu40E9-H9 (SEQ ID NO: 237) y la región variable de cadena ligera de hu40E9-L2 (SEQ ID NO: 169);

21) "hu40E9-L2H10" que comprende la región variable de cadena pesada de hu40E9-

H10 (SEQ ID NO: 238) y la región variable de cadena ligera de hu40E9-L2 (SEQ ID NO: 169);

22) “hu40E9-L2H11” que comprende la región variable de cadena pesada de hu40E9-H11 (SEQ ID NO: 239) y la región variable de cadena ligera de hu40E9-L2 (SEQ ID NO: 169);

5 23) “hu40E9-L2H12” que comprende la región variable de cadena pesada de hu40E9-H12 (SEQ ID NO: 240) y la región variable de cadena ligera de hu40E9-L2 (SEQ ID NO: 169);

24) “hu40E9-L2H13” que comprende la región variable de cadena pesada de hu40E9-H13 (SEQ ID NO: 241) y la región variable de cadena ligera de hu40E9-L2 (SEQ ID NO: 169);

25) “hu40E9-L2H14” que comprende la región variable de cadena pesada de hu40E9-H14 (SEQ ID NO: 242) y la región variable de cadena ligera de hu40E9-L2 (SEQ ID NO: 169);

10 26) “hu40E9-L2H15” que comprende la región variable de cadena pesada de hu40E9-H15 (SEQ ID NO: 243) y la región variable de cadena ligera de hu40E9-L2 (SEQ ID NO: 169);

27) “hu40E9-L2H16” que comprende la región variable de cadena pesada de hu40E9-H16 (SEQ ID NO: 244) y la región variable de cadena ligera de hu40E9-L2 (SEQ ID NO: 169);

15 28) “hu40E9-L2H17” que comprende la región variable de cadena pesada de hu40E9-H17 (SEQ ID NO: 245) y la región variable de cadena ligera de hu40E9-L2 (SEQ ID NO: 169);

29) “hu40E9-L4H3” que comprende la región variable de cadena pesada de hu40E9-H3 (SEQ ID NO: 165) y la región variable de cadena ligera de hu40E9-L4 (SEQ ID NO: 230);

30) “hu40E9-L5H3” que comprende la región variable de cadena pesada de hu40E9-H3 (SEQ ID NO: 165) y la región variable de cadena ligera de hu40E9-L5 (SEQ ID NO: 231);

20 31) “hu40E9-L6H3” que comprende la región variable de cadena pesada de hu40E9-H3 (SEQ ID NO: 165) y la región variable de cadena ligera de hu40E9-L6 (SEQ ID NO: 232);

32) “hu40E9-L4H7” que comprende la región variable de cadena pesada de hu40E9-H7 (SEQ ID NO: 235) y la región variable de cadena ligera de hu40E9-L4 (SEQ ID NO: 230);

25 33) “hu40E9-L4H8” que comprende la región variable de cadena pesada de hu40E9-H8 (SEQ ID NO: 236) y la región variable de cadena ligera de hu40E9-L4 (SEQ ID NO: 230);

34) “hu40E9-L5H7” que comprende la región variable de cadena pesada de hu40E9-H7 (SEQ ID NO: 235) y la región variable de cadena ligera de hu40E9-L5 (SEQ ID NO: 231);

o

35) "hu40E9-L5H8" que comprende la región variable de cadena pesada de hu40E9-H8 (SEQ ID NO: 236) y la región variable de cadena ligera de hu40E9-L5 (SEQ ID NO: 231).

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-CD3 y fragmentos de unión a antígeno
5 proporcionados en la presente comprenden todo o una parte del dominio variable de cadena pesada y/o todo o una parte del dominio variable de cadena ligera. En una realización, el anticuerpo anti-CD3 y un fragmento de unión a antígeno del mismo proporcionado en la presente es un anticuerpo de dominio único que consiste en todo o una parte del dominio variable de cadena pesada proporcionado en la presente. Más información de dicho
10 anticuerpo de dominio único está disponible en la técnica (véase, por ejemplo, la patente estadounidense Núm. 6248516).

En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-CD3 o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden además una región Fc. En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-CD3 o fragmentos de unión a antígeno de estos
15 proporcionados en la presente comprenden además una región Fc de inmunoglobulina (Ig) humana. En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-CD3 o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos proporcionados en la presente comprenden además una región constante, que opcionalmente comprende además una región constante de cadena pesada y/o cadena ligera. En ciertas realizaciones, la región constante de cadena pesada comprende
20 regiones CH1, bisagra, y/o CH2-CH3 (u opcionalmente regiones CH2-CH3-CH4). En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-CD3 o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos proporcionados en la presente comprende regiones constantes de cadena pesada de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2 o IgM humana. En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-CD3 o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden
25 una cadena ligera lambda (λ) o una cadena ligera kappa (κ). La región constante de los anticuerpos anti-CD3 o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos proporcionados en la presente pueden ser idénticos a la secuencia de región constante tipo silvestre o ser diferentes en una o más mutaciones.

En ciertas realizaciones, la región constante de cadena pesada comprende una región
30 Fc. Se conoce que la región Fc media en las funciones efectoras como ADCC y citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) del anticuerpo. Las regiones Fc de diferentes isotipos de Ig tienen diferentes capacidades para inducir funciones efectoras. Por ejemplo, se ha reconocido que las regiones Fc de IgG1 e IgG3 inducen tanto ADCC como CDC de manera

más efectiva que aquellas de IgG2 e IgG4. En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-CD3 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos proporcionados en la presente comprenden una región Fc de isotipo IgG1 o IgG3, que podría inducir ADCC o CDC; o alternatively, una región constante de isotipo IgG4 o IgG2, que tiene función efectora reducida o agotada.

- 5 En algunas realizaciones, la región Fc derivada de IgG1 humana. En algunas realizaciones, la región Fc derivada de IgG1 humana con funciones efectoras mejoradas. En algunos casos, la región Fc comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 97.

10 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 97)

- 15 En ciertas realizaciones, los anticuerpos o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos proporcionados en la presente tienen una unión específica a CD3 humano que es suficiente para proporcionar un uso de diagnóstico y/o terapéutico.

20 Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos proporcionados en la presente pueden ser un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo recombinante, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo marcado, un anticuerpo bivalente, un anticuerpo anti-idiotípico, o una proteína de fusión. Un anticuerpo recombinante es un anticuerpo preparado *in vitro* utilizando métodos recombinantes en lugar de en animales.

- 25 En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un anticuerpo anti-CD3 o fragmento de unión a antígeno de este, que compite por la unión a CD3 con el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo proporcionado en la presente. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un anticuerpo anti-CD3 o fragmento de unión a antígeno del mismo, que compite por la unión a CD3 humano con cualquiera de los
30 anticuerpos 25-G12-G6-C12, 40-C12-C10-E9, 8-B12-F9-B11, 31-F8-F5-C5, 16-F2-C11-D9, 20-E11-E11-C2, 7-D9-G10-H2, 7-D8-G12-E4, 2-F12-A6-G2, 3-C6-C11-F12, 4-F12-F1-A4, 3-F3-G12-E2, 124E3D6, 126A11A4, 127E2D3, 133B4C7, 140D2B10, 147C6F3, 147E11E2, hu40E9-L1H1, hu40E9-L1H2, hu40E9-L1H3, hu40E9-L1H4, hu40E9-L2H1, hu40E9-L2H2,

hu40E9-L2H3, hu40E9-L2H4, hu40E9-L3H1, hu40E9-L3H2, hu40E9-L3H3, hu40E9-L3H4, hu40E9-L2H3-N55S.H, hu40E9-L2H3-D99E.H, hu40E9-L2H3-Y101F.H, hu40E9-L2H3-D105E.H, hu40E9-L2H3-G106A.H, hu40E9-L2H3-Y54G.H, hu40E9-L2H3-D56G.H, hu40E9-L2H3-D99R.H, hu40E9-L2H3-S100R.H, hu40E9-L2H3-Y102S.H, hu40E9-L2H3-D105R.H, hu40E9-L2H3-N93S.L, hu40E9-L2H3-S91R.L, hu40E9-L2H3-N93R.L, hu40E9-L2H3-N93W.L, hu40E9-L2H5, hu40E9-L2H6, hu40E9-L2H7, hu40E9-L2H8, hu40E9-L2H9, hu40E9-L2H10, hu40E9-L2H11, hu40E9-L2H12, hu40E9-L2H13, hu40E9-L2H14, hu40E9-L2H15, hu40E9-L2H16, hu40E9-L2H17, hu40E9-L4H3, hu40E9-L5H3, hu40E9-L6H3, hu40E9-L4H7, hu40E9-L4H8, hu40E9-L5H7, hu40E9-L5H8, hu147E2-L1H2, hu147E2-L1H3, hu147E2-L1H3a, hu147E2-L1H3b, hu147E2-L1H4, hu147E2-L2H2, hu147E2-L2H3, hu147E2-L2H4, hu147E2-L3H2, hu147E2-L3H3 y hu147E2-L3H4. En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona un anticuerpo anti-CD3 o fragmento de unión a antígeno de este, que compite por el mismo epítipo con el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo proporcionado en la presente.

La capacidad de "bloquear la unión" o "competir por la unión", como se usa en la presente, se refiere a la capacidad de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para inhibir la interacción de unión entre dos moléculas (*por ejemplo*, CD3 humano y un anticuerpo anti-CD3) en cualquier grado detectable. En ciertas realizaciones, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo bloquea la unión entre dos moléculas e inhibe la interacción de unión entre las dos moléculas en al menos 85% o al menos 90%. En ciertas realizaciones, esta inhibición puede ser mayor que 85%, o mayor que 90%.

Los expertos en la técnica reconocerán que es posible determinar, sin experimentación indebida, si un anticuerpo monoclonal humano se une al mismo epítipo que el anticuerpo de la presente descripción (*por ejemplo*, anticuerpos monoclonales de ratón 25-G12-G6-C12, 40-C12-C10-E9, 8-B12-F9-B11, 31-F8-F5-C5, 16-F2-C11-D9, 20-E11-E11-C2, 7-D9-G10-H2, 7-D8-G12-E4, 2-F12-A6-G2, 3-C6-C11-F12, 4-F12-F1-A4, 3-F3-G12-E2, 124E3D6, 126A11A4, 127E2D3, 133B4C7, 140D2B10, 147C6F3, 147E11E2, hu40E9-L1H1, hu40E9-L1H2, hu40E9-L1H3, hu40E9-L1H4, hu40E9-L2H1, hu40E9-L2H2, hu40E9-L2H3, hu40E9-L2H4, hu40E9-L3H1, hu40E9-L3H2, hu40E9-L3H3, hu40E9-L3H4, hu40E9-L2H3-N55S.H, hu40E9-L2H3-D99E.H, hu40E9-L2H3-Y101F.H, hu40E9-L2H3-D105E.H, hu40E9-L2H3-G106A.H, hu40E9-L2H3-Y54G.H, hu40E9-L2H3-D56G.H, hu40E9-L2H3-D99R.H, hu40E9-L2H3-S100R.H, hu40E9-L2H3-Y102S.H, hu40E9-L2H3-D105R.H, hu40E9-L2H3-N93S.L, hu40E9-L2H3-S91R.L, hu40E9-L2H3-N93R.L, hu40E9-L2H3-N93W.L, hu40E9-L2H5, hu40E9-L2H6, hu40E9-L2H7, hu40E9-L2H8, hu40E9-L2H9, hu40E9-L2H10, hu40E9-L2H11, hu40E9-L2H12,

hu40E9-L2H13, hu40E9-L2H14, hu40E9-L2H15, hu40E9-L2H16, hu40E9-L2H17, hu40E9-L4H3, hu40E9-L5H3, hu40E9-L6H3, hu40E9-L4H7, hu40E9-L4H8, hu40E9-L5H7, hu40E9-L5H8, hu147E2-L1H2, hu147E2-L1H3, hu147E2-L1H3a, hu147E2-L1H3b, hu147E2-L1H4, hu147E2-L2H2, hu147E2-L2H3, hu147E2-L2H4, hu147E2-L3H2, hu147E2-L3H3 y hu147E2-

L3H4)) al determinar si el primero evita que el último se una a un polipéptido de antígeno CD3. Si el anticuerpo de prueba compite con el anticuerpo de la presente descripción, como se muestra por una disminución en la unión del anticuerpo de la presente descripción al polipéptido de antígeno CD3, entonces los dos anticuerpos se unen al mismo epítipo o a uno estrechamente relacionado. O si la unión de un anticuerpo de prueba al polipéptido de antígeno CD3 fue inhibida por el anticuerpo de la presente descripción, entonces los dos anticuerpos se unen al mismo epítipo o a uno estrechamente relacionado.

En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona anticuerpos anti-CD3 o fragmentos de unión a antígeno de estos que tienen una afinidad de unión mayor o comparable a CD3 (*por ejemplo*, CD3 humano o CD3 de cynomolgus) en comparación con OKT3, BMK-B219 y/o BMK-TCB.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-CD3 o fragmento de unión a antígeno que compite por la unión a CD3 con el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo proporcionado en la presente no es OKT3, BMK-B219 o BMK-TCB.

"OKT3", como se usa en la presente, se refiere a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 100 y una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 101. Las secuencias de CDR se subrayaron en la SEQ ID NO: 100 y la SEQ ID NO: 101, respectivamente.

QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSR
GYTNYNQKFKDKATLTDDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLT
VSS (SEQ ID NO: 100)

QIVLTQSPAISASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQKSGTSPKRWIYDTSKLASG
VPAHFRGSGSGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEINRAD (SEQ ID NO:
101)

"BMK-B219", como se usa en la presente, se refiere a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una región variable de cadena pesada que tiene

una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 158 y una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 159. Las secuencias de CDR se subrayaron en la SEQ ID NO: 158 y la SEQ ID NO: 159, respectivamente.

5 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKY
NNYATYYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWG
QGTLTVTVSS (SEQ ID NO: 158)

QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIGGTNKR
APGTPARFSGSLLGGKAAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:
159)

10 “BMK-TCB”, como se usa en la presente, se refiere a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 160 y una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 161. Las secuencias de CDR se subrayaron en la SEQ ID NO: 160 y la SEQ ID NO: 161, respectivamente.

15 EVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVSRIRSKY
NNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWG
QGTLTVTVSS (SEQ ID NO: 160)

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQEKPGQAFRGLIGGTNKR
APGTPARFSGSLLGGKAAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:
20 161)

Variantes de anticuerpos

Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos proporcionados en la presente también abarcan varias variantes de las secuencias de anticuerpos proporcionadas en la presente.

25 En ciertas realizaciones, las variantes del anticuerpo comprenden una o más sustituciones o modificaciones de residuos de aminoácidos, pero conservan una afinidad de unión específica con CD3. En ciertas realizaciones, la al menos una de las sustituciones o modificaciones se encuentra en una o más de las secuencias de CDR de la región VH o VL. En ciertas realizaciones, al menos una de las sustituciones o modificaciones se encuentra en
30 una o más de las secuencias no-CDR de la región VH o de la región VL. En ciertas

realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden además una o más sustituciones de aminoácidos no naturales (NNAA). En ciertas realizaciones, el NNAA es capaz de conjugarse.

Por ejemplo, las variantes de anticuerpo comprenden una o más sustituciones o modificaciones de residuos de aminoácidos en una o más de las secuencias de CDR proporcionadas en la Tabla 2 anterior, una o más de las secuencias no de CDR de la región variable de la cadena pesada o de la región variable de la cadena ligera proporcionadas en la Tabla 3 anterior, y/o la región constante (por ejemplo, la región Fc). Dichas variantes conservan la especificidad de unión a CD3 de sus anticuerpos originales, pero tienen una o más propiedades deseables conferidas por las modificaciones o sustituciones. Por ejemplo, las variantes de anticuerpos pueden tener afinidad de unión a antígeno, patrón de glicosilación mejorado, riesgo reducido de glicosilación, desaminación reducida, potenciar la(s) función(es) de los efectores, unión mejorada al receptor FcRn, semivida farmacocinética aumentada, sensibilidad al pH y/o compatibilidad con la conjugación (por ejemplo, uno o más residuos introducidos de cisteína).

La secuencia del anticuerpo original se puede analizar para identificar residuos adecuados o preferidos para ser modificados o sustituidos, utilizando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, "mutagénesis de barrido de alanina" (véase, por ejemplo, Cunningham and Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085). En resumen, los residuos diana (por ejemplo, residuos cargados como Arg, Asp, His, Lys y Glu) se pueden identificar y reemplazar por un aminoácido neutro o cargado negativamente (por ejemplo, alanina o polialanina), y los anticuerpos modificados se producen y se seleccionan para la propiedad interesada. Si la sustitución en una ubicación de aminoácido particular demuestra un cambio funcional interesado, entonces la posición puede identificarse como un residuo potencial para la modificación o sustitución. Los residuos potenciales se pueden evaluar adicionalmente mediante la sustitución con un tipo diferente de residuo (por ejemplo, residuo de cisteína, residuo cargado positivamente, etc.).

Variantes de afinidad

Las variantes de afinidad de anticuerpos pueden contener modificaciones o sustituciones en una o más secuencias de CDR como se proporcionan en la tabla 2 anterior, una o más secuencias FR, o las secuencias de región variable de cadena pesada o ligera proporcionadas en la Tabla 3 anterior. Las secuencias de FR se pueden identificar fácilmente por un experto en la técnica con base en las secuencias de CDR en la tabla 2 anterior y las

secuencias de región variable en la tabla 3 anterior, puesto que es bien conocido en la técnica que una región de CDR está flanqueada por dos regiones de FR en la región variable. Las variantes de afinidad retienen afinidad de unión específica a CD3 del anticuerpo original, o incluso tienen afinidad de unión específica a CD3 mejorada con respecto al anticuerpo original.

- 5 En ciertas realizaciones, al menos una (o todas) de las sustituciones en las secuencias de CDR, secuencias de FR o secuencias de región variable comprenden una sustitución conservadora.

Una persona experta en la técnica entenderá que en las secuencias de CDR proporcionadas en la tabla 2 anterior, y las secuencias de región variable proporcionadas en la tabla 3 anterior, se pueden sustituir uno o más residuos de aminoácidos, pero el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno resultante aún retiene la afinidad de unión o capacidad de unión a CD3, o incluso tiene una afinidad o capacidad de unión mejorada. Diversos métodos conocidos en la técnica se pueden utilizar para lograr este propósito. Por ejemplo, se puede generar una biblioteca de variantes de anticuerpos (tal como variantes de Fab o scFv) y expresarse con tecnología de expresión en fagos, y entonces examinarse para la afinidad de unión a CD3 humano. Para otro ejemplo, se puede utilizar software de computadora para simular virtualmente la unión de los anticuerpos a CD3 humano, e identificar los residuos de aminoácidos en los anticuerpos que forman la interfaz de unión. Estos residuos se pueden ya sea evitar en la sustitución a fin de evitar la reducción en la afinidad de unión, o dirigirse a la sustitución para proporcionar una unión más fuerte.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo humanizado o fragmento de unión a antígeno del mismo proporcionado en la presente comprende una o más sustituciones de residuos de aminoácidos en una o más de las secuencias de CDR, y/o una o más de las secuencias de FR. En ciertas realizaciones, una variante de afinidad comprende no más de 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, o 1 sustituciones en las secuencias de CDR y/o secuencias de FR en total.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-CD3 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos proporcionados en la presente comprenden 1, 2 o 3 secuencias CDR que tienen al menos un 80 % (por ejemplo, al menos un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con la (o las) enumeradas en la Tabla 2 anterior, pero conservando la afinidad de unión específica a CD3 a un nivel similar o incluso superior al de su anticuerpo original.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-CD3 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos comprenden una o más secuencias de región variable que tienen al menos un

80 % (por ejemplo, al menos un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con la (o las) enumeradas en la Tabla 3 anterior, pero conservando la afinidad de unión específica a CD3 a un nivel similar o incluso superior al de su anticuerpo original. En algunas realizaciones, un total de 1 a 10 aminoácidos se han sustituido, insertado o eliminado en una secuencia de región variable mencionada en la Tabla 3 anterior. En algunas realizaciones, las sustituciones, inserciones o deleciones ocurren en regiones fuera de las CDR (por ejemplo, en las FR).

Variantes de glicosilación

Los anticuerpos anti-CD3 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos proporcionados en la presente también abarcan variantes de glicosilación, que se pueden obtener para ya sea incrementar o disminuir el grado de glicosilación de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos proporcionados en la presente pueden comprender una o más modificaciones que introducen o remueven un sitio de glicosilación. Un sitio de glicosilación es un residuo de aminoácidos con una cadena lateral a la que se puede unir un resto carbohidrato (por ejemplo, una estructura de oligosacárido). La glicosilación de los anticuerpos está típicamente ligada a N o ligada a O. Enlazado a N se refiere a la unión del resto de carbohidrato a la cadena lateral de un residuo de asparagina, por ejemplo, un residuo de asparagina en una secuencia tripéptido tal como asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina. La glicosilación unida a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un hidroxiaminoácido, más comúnmente a serina o treonina. La eliminación de un sitio de glicosilación natural se puede lograr convenientemente, por ejemplo, alterando la secuencia de aminoácidos de modo que se sustituya una de las secuencias de tripéptidos descritas anteriormente (para sitios de glicosilación unidos a N) o residuos de serina o treonina (para sitios de glicosilación unidos a O) presentes en la secuencia. Se puede crear un nuevo sitio de glicosilación de una manera similar mediante la introducción de dicha secuencia de tripéptidos o residuo de serina o treonina.

Variantes de ingeniería de cisteína

Los anticuerpos anti-CD3 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos proporcionados en la presente también abarcan variantes modificadas por cisteína, que comprenden uno o más residuos de aminoácidos de cisteína libres introducidos.

Un residuo de cisteína libre es uno que no es parte de un puente disulfuro. Una variante modificada con cisteína es útil para la conjugación con, por ejemplo, un compuesto citotóxico y/o de formación de imágenes, un marcador o un radioisotipo, entre otros, en el sitio de la cisteína modificada, a través de, por ejemplo, una maleimida o haloacetilo. Los métodos para modificar anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno para introducir residuos de cisteína libres son conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, el documento WO2006/034488.

Variantes de Fc

Los anticuerpos anti-CD3 y fragmentos de unión a antígeno proporcionados en la presente también abarcan una variante de Fc, que comprende una o más modificaciones o sustituciones de residuos de aminoácidos en su región Fc y/o región bisagra.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-CD3 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos proporcionados en la presente comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que mejoran la unión dependiente del pH al receptor de Fc neonatal (FcRn). Dicha variante puede tener una semivida farmacocinética prolongada, ya que se une a FcRn a pH ácido, lo que le permite escapar de la degradación en el lisosoma y luego ser translocada y liberada fuera de la célula. Los métodos para modificar un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo para mejorar la afinidad de unión con FcRn son bien conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, Vaughn, D. et al., *Structure*, 6(1): 63-73, 1998; Kontermann, R. et al., *Antibody Engineering*, Volumen 1, Capítulo 27: Engineering of the Fc region for improved PK, publicado por Springer, 2010; Yeung, Y. et al., *Cancer Research*, 70: 3269-3277 (2010); y Hinton, P. et al., *J. Immunology*, 176:346-356 (2006).

En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-CD3 o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que alteran ADCC. Ciertos residuos de aminoácidos en el dominio CH2 de la región Fc pueden sustituirse para proporcionar una actividad de ADCC mejorada. De manera alternativa o adicional, las estructuras de carbohidratos en el anticuerpo se pueden cambiar para mejorar la actividad de ADCC. Los métodos para alterar la actividad de ADCC mediante ingeniería de anticuerpos se han descrito en la técnica, véase, por ejemplo, Shields RL. et al., *J Biol Chem*. 2001. 276(9): 6591-604; Idusogie EE. et al., *J Immunol*. 2000.164(8):4178-84; Steurer W. et al., *J Immunol*. 1995, 155(3): 1165- 74; Idusogie EE. et al., *J Immunol*. 2001, 166(4): 2571-5; Lazar GA. et al., *PNAS*, 2006, 103(11): 4005-4010; Ryan MC. et al., *Mol. Cancer Ther.*, 2007, 6: 3009-3018; Richards JO,. et al., *Mol Cancer Ther*. 2008, 7(8): 2517-27; Shields R. L. et al., *J. Biol. Chem*, 2002, 277: 26733-26740; Shinkawa T. et al., *J. Biol. Chem*, 2003, 278: 3466-

3473.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-CD3 o fragmentos de unión a antígeno de estos comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que alteran los CDC, por ejemplo, al mejorar o disminuir la unión a C1q y/o CDC (ver, por ejemplo, WO99/51642; 5 Duncan & Winter *Nature* 322:738-40 (1988); patente estadounidense No. 5,648,260; patente estadounidense No. 5,624,821); y el documento WO94/29351 con respecto a otros ejemplos de variantes de la región Fc. Uno o más aminoácidos seleccionados de los residuos de aminoácidos 329, 331 y 322 de la región Fc se pueden reemplazar con un residuo de aminoácido diferente para alterar la unión de Clq y/o potenciar la CDC (véase, la patente 10 estadounidense Núm. 6,194,551 por Idusogie *et al.*). También se pueden introducir una o más sustituciones de aminoácidos para alterar la capacidad del anticuerpo para fijar el complemento (véase la publicación PCT WO 94/29351 de Bodmer *et al.*).

En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-CD3 o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden una o más sustituciones de aminoácidos 15 en inmunoglobulina humana (*por ejemplo*, IgG1) en la posición 234 y/o 235 (de acuerdo con la numeración EU). En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-CD3 o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden dos sustituciones de aminoácidos en inmunoglobulina humana (*por ejemplo*, IgG1) en las posiciones 234 y 235 (de acuerdo con la numeración EU). En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-CD3 o 20 fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden sustituciones de aminoácidos L234A y L235A (de acuerdo con la numeración EU).

En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-CD3 o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden una o más sustituciones de aminoácidos en inmunoglobulina humana (por ejemplo, IgG4) en la posición 228 (de acuerdo con la 25 numeración EU). En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-CD3 o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden una sustitución de aminoácido S228P (de acuerdo con la numeración EU).

En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-CD3 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos proporcionados en la presente, comprenden una o más sustituciones de 30 aminoácidos en la interfaz de la región Fc para facilitar y/o promover la heterodimerización. Estas modificaciones comprenden la introducción de una protuberancia en un primer polipéptido de Fc y una cavidad en un segundo polipéptido de Fc, en donde la protuberancia se puede colocar en la cavidad a fin de promover la interacción del primer y segundo

polipéptidos de Fc para formar un heterodímero o un complejo. Los métodos para generar anticuerpos con estas modificaciones se conocen en la técnica, por ejemplo, como se describe en la patente estadounidense No. 5,731,168.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-CD3 o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden una sustitución de aminoácido en la posición 366 (de acuerdo con la numeración EU) de un primer polipéptido Fc, y comprende una, dos o tres sustituciones de aminoácido en una, dos o tres posiciones de 366, 368 y 407 (de acuerdo con la numeración EU) de un segundo polipéptido Fc. En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-CD3 o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden una sustitución T366W (de acuerdo con la numeración EU) de un primer polipéptido Fc, y comprenden sustituciones T366S+L368A+Y407V (de acuerdo con la numeración EU) de un segundo polipéptido Fc.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-CD3 o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden además una o más sustituciones de aminoácidos de un primer polipéptido Fc, y comprenden una o más sustituciones de aminoácidos de un segundo polipéptido Fc, para introducir un enlace disulfuro no natural entre los dos polipéptidos Fc. Por ejemplo, los anticuerpos anti-CD3 o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden una sustitución de aminoácido en la posición 354 (de acuerdo con la numeración EU) de un primer polipéptido Fc, y comprenden una sustitución de aminoácido en la posición 349 (de acuerdo con la numeración EU) de un segundo polipéptido Fc. En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-CD3 o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden la sustitución S354C (de acuerdo con la numeración EU) de un primer polipéptido Fc y comprenden la sustitución Y349C (de acuerdo con la numeración EU) de un segundo polipéptido Fc.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-CD3 o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente comprenden un primer polipéptido Fc que comprende la secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 98, y un segundo polipéptido Fc que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 99.

KTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 98)

KTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
SDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 99)

5 Fragmentos de unión a antígeno

En la presente también se proporcionan fragmentos de unión a antígeno anti-CD3. Varios tipos de fragmentos de unión a antígeno se conocen en la técnica y se pueden desarrollar con base en los anticuerpos anti-CD3 proporcionados en la presente, que incluyen, por ejemplo, los anticuerpos de ejemplo cuyas CDR se muestran en la tabla 2 anterior, y las
10 secuencias variables se muestran en la tabla 3 anterior, y sus diferentes variantes (tal como variantes de afinidad, variantes de glicosilación, variantes de Fc, variantes modificadas por cisteína, y así sucesivamente).

En ciertas realizaciones, se proporciona un fragmento de unión de antígeno anti-CD3 en la presente como un diacuerpo, un Fab, un Fab', un F(ab')₂, un Fd, un fragmento Fv, un
15 fragmento Fv estabilizado con disulfuro (dsFv), un (dsFv)₂, un dsFv biespecífico (dsFv-dsFv'), un diacuerpo estabilizado con disulfuro (diacuerpo ds), una molécula de anticuerpo monocatenario (scFv), un dímero de scFv (diacuerpo bivalente), un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo de dominio único camelizado, un nanocuerpo, un anticuerpo de dominio o un anticuerpo de dominio bivalente.

Se pueden utilizar diversas técnicas para la producción de dichos fragmentos de unión a antígeno. Los métodos ilustrativos incluyen la digestión enzimática de anticuerpos intactos (ver, por ejemplo, Morimoto *et al.*, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992); y Brennan *et al.*, *Science*, 229:81 (1985)), expresión recombinante por células hospedadoras tal como *E. Coli* (por ejemplo, para fragmentos de anticuerpo Fab, Fv y ScFv),
20 examinación de una biblioteca de expresión en fagos como se analiza anteriormente (por ejemplo, para ScFv) y acoplamiento químico de dos fragmentos Fab'-SH para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para una persona experta en la técnica.

En ciertas realizaciones, el fragmento de unión a antígeno es un scFv. La generación de scFv se describe, por ejemplo, en WO 93/16185; patente estadounidense Núms. 5,571,894; y 5,587,458. scFv se puede fusionar a una proteína efectora en el extremo amino o carboxilo

para proporcionar una proteína de fusión (véase, por ejemplo, Antibody Engineering, ed. Borrebaeck).

5 En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-CD3 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos proporcionados en la presente son bivalentes, tetravalentes, hexavalentes, o multivalentes. Cualquier molécula que sea más que bivalente se considera multivalente, que abarca, por ejemplo, trivalente, tetravalente, hexavalente, y así sucesivamente.

10 Una molécula bivalente puede ser monoespecífica si los dos sitios de unión son ambos específicos para la unión al mismo antígeno o al mismo epítipo. Esto, en ciertas realizaciones, proporciona una unión más fuerte al antígeno o al epítipo que una contraparte monovalente. De manera similar, una molécula multivalente también puede ser monoespecífica. En ciertas realizaciones, en un resto de unión a antígeno bivalente o multivalente, la primera valencia del sitio de unión y la segunda valencia del sitio de unión son estructuralmente idénticas (es decir, que tienen las mismas secuencias), o estructuralmente diferentes (es decir, que tienen secuencias diferentes, aunque con la misma especificidad).

15 Un bivalente también puede ser biespecífico, si los dos sitios de unión son específicos para diferentes antígenos o epítopos. Esto también se aplica a una molécula multivalente. Por ejemplo, una molécula trivalente puede ser biespecífica cuando dos sitios de unión son monoespecíficos para un primer antígeno (o epítipo) y el tercer sitio de unión es específico para un segundo antígeno (o epítipo).

20 **Anticuerpos biespecíficos o multiespecíficos**

25 En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-CD3 o un fragmento de unión a antígeno de este proporcionado en la presente es biespecífico o multiespecífico. En ciertas realizaciones, el anticuerpo de anti-CD3 o fragmento de unión a antígeno del mismo proporcionado en la presente se enlaza además a una segunda fracción funcional que tiene una especificidad de unión diferente de dicho anticuerpo de anti-CD3 o fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunas realizaciones, los anticuerpos biespecíficos o multiespecíficos y fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente tienen una primera especificidad para CD3 y una segunda especificidad. En algunas realizaciones, la segunda especificidad es para CD3 pero para diferentes epítopos. En 30 algunas realizaciones, la segunda especificidad es para un segundo antígeno diferente de CD3 y cuya presencia en la proximidad de células T que expresan CD3 es deseable para que el segundo antígeno sea reconocido por el sistema inmunitario. Por ejemplo, poner las células

T que expresan CD3 muy cerca de un antígeno tumoral o un antígeno patógeno y, por lo tanto, promover el reconocimiento o la eliminación de dicho antígeno por parte del sistema inmunitario.

En ciertas realizaciones, la segunda especificidad es para un antígeno asociado a tumor o un epítipo de este. El término "antígeno asociado a tumor" se refiere a un antígeno que se presenta o puede presentarse en una superficie de célula tumoral y que se encuentra en o dentro de las células tumorales. En algunas realizaciones, los antígenos asociados al tumor pueden presentarse solo por células tumorales y no por células normales, *es decir*, células no tumorales. En algunas otras realizaciones, los antígenos asociados al tumor pueden expresarse exclusivamente en células tumorales o pueden representar una mutación específica del tumor en comparación con células no tumorales. En algunas otras realizaciones, los antígenos asociados al tumor se pueden encontrar tanto en células tumorales como en células no tumorales, pero se sobreexpresan en células tumorales en comparación con células no tumorales o son accesibles para la unión de anticuerpos en células tumorales debido a la estructura menos compacta del tejido tumoral en comparación con el tejido no tumoral. En algunas realizaciones, el antígeno asociado al tumor se encuentra en la vasculatura de un tumor.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos biespecíficos o multiespecíficos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente son capaces de unirse específicamente a uno o más (*por ejemplo*, 1, 2, 3, 4, 5 o más) antígenos adicionales distintos de CD3, o un segundo epítipo en CD3. En ciertas realizaciones, el uno o más antígenos adicionales distintos de CD3 se seleccionan del grupo que consiste en CD16a, CD33, CD38, CD45, CD123, CD146, CD228, CLL-1, FLT3, FLT3L, TAF1, TgPRF, HVCN1, IL-6R, IL-11R, IL17A, IL-23R, IL-33, ILDR2, VUELTA, TSLP, TREM-1, ANGPT2, APOE, IFNAR, CypA, DOG-1, NKp30, CSF-1R, CCR2, LRRC15, mesotelina, Dickkopf2, DLL3, HER-2, C10orf54, TrkA, MEKK1, KRAS, ERK, XPO1, mTORC1/2, PAK4, NAMPT, ATR, EGFR, FGFR, VEGF, LILRB (*por ejemplo*, LILRB1, LILRB2, LILRB3, LILRB4, LILRB5), c-MET, Her2, Her3, CTLA4, GITA, CD112R, CD2, CD7, CD16, CD19, CD20, CD24, CD27, CD30, CD34, CD37, CD39, CD70, CD73, CD83, CD28, CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), CD40, CD40L (CD154), CD47, SIRPα, CD122, CD137, CD137L, OX40 (CD134), OX40L (CD252), BCMA (*por ejemplo*, BCMA02), PSMA, CLDN18 (*por ejemplo*, CLDN18.2), NKG2C, 4-1BB, LUZ, PVRIG, SLAMF7, HVEM, BAFFR, ICAM-1, 2B4, LFA-1, GITR, ICO (CD278), ICOSLG (CD275), LAG3 (CD223), A2AR, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), B7-H5, BTLA (CD272), CD160, CTLA-4 (CD152), GPRC5D, IDO (*por ejemplo*, IDO1, IDO2), TDO, KIR, LAIR-1, NOX2, PD-1, PD-L1, PD-L2, TIM-3, VISTA,

SIGLEC-7 (CD328), SIGLEC-9 (CD329), SIGLEC-15, TIGIT, PVR (CD155), TLR3, CLEC9A, DEC-205, STING y TGFβ.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos biespecíficos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente son capaces de unirse específicamente a CD3 y CD19. En ciertas realizaciones, los anticuerpos biespecíficos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente son capaces de unirse específicamente a CD3 y CLDN18 (*por ejemplo*, CLDN18.2). En ciertas realizaciones, los anticuerpos biespecíficos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente son capaces de unirse específicamente a CD3 y PD-L1. En ciertas realizaciones, los anticuerpos biespecíficos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente son capaces de unirse específicamente a CD3 y BCMA. En ciertas realizaciones, los anticuerpos biespecíficos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente son capaces de unirse específicamente a CD3 y GPRC5D.

Conjugados

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-CD3 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos proporcionados en la presente, comprenden además uno o más restos conjugado. El resto conjugado se puede vincular a los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos. Un resto conjugado es un resto que se puede unir al anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo. Se contempla que se puede unir una variedad de restos conjugados a los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos proporcionados en la presente (véase, *por ejemplo*, “Conjugate Vaccines”, Contributions to Microbiology and Immunology, J. M. Cruse and R. E. Lewis, Jr. (eds.), Carger Press, New York, (1989)). Estos restos conjugados pueden unirse a los anticuerpos o fragmentos de unión de antígeno mediante unión covalente (*por ejemplo*, unión disulfuro), unión por afinidad, intercalación, unión coordinada, complejación, asociación, mezcla o adición, entre otros métodos. En algunas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos se pueden vincular a uno o más conjugados mediante un enlazador o un agente reticulante. El enlazador o agente de reticulación comprende un grupo químico reactivo que puede reaccionar con los anticuerpos anti-CD3 o fragmentos de unión a antígeno de estos. Los grupos químicos reactivos pueden ser ésteres de N-succinimidilo y ésteres de N-sulfosuccinimidilo. Además, el enlazador comprende un grupo químico reactivo, que puede ser un grupo ditiopiridilo que puede reaccionar con el fármaco para formar un enlace disulfuro. Las moléculas enlazadoras incluyen, *por ejemplo*, 4-(maleimidometil) ciclohexanocarboxilato

de N-succinimidilo (SMCC), 3-(2-piridilditio) propionato de N-succinimidilo (SPDP) (véase, *por ejemplo*, Carlsson *et al.*, *Biochem. J.*, 173: 723-737 (1978)), 4-(2-piridilditio)butanoato de N-succinimidilo (SPDB) (ver, *por ejemplo*, la patente estadounidense No. 4,563,304), 4-(2-piridilditio)2-sulfobutanoato de N-succinimidilo (sulfo-SPDB) (ver la publicación estadounidense No. 20090274713), 4-(2-piridilditio) pentanoato de N-succinimidilo (SPP) (ver, *por ejemplo*, el número de registro CAS 341498-08-6), 2-iminotiolano o anhídrido acetilsuccínico. Por ejemplo, el anticuerpo o agente de unión celular puede modificarse con reactivos de reticulación y el anticuerpo o agente de unión celular que contiene grupos tiol libres o protegidos derivados de este modo se hace reaccionar con un maitansinoide que contiene disulfuro o tiol para producir conjugados. Los conjugados se pueden purificar mediante cromatografía, que incluye, entre otros, HPLC, exclusión por tamaño, adsorción, intercambio iónico y captura por afinidad, diálisis o filtración de flujo tangencial.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos proporcionados en la presente pueden modificarse para que contengan sitios específicos fuera de la parte de unión al epítipo que pueden utilizarse para la unión a uno o más restos conjugados. Por ejemplo, dicho sitio puede incluir uno o más residuos de aminoácidos reactivos, tales como, por ejemplo, residuos de cisteína o histidina, para facilitar el enlace covalente a un resto conjugado.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos proporcionados en la presente, se pueden vincular a un resto conjugado indirectamente, o a través de otro resto conjugado. Por ejemplo, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos proporcionados en la presente se pueden conjugar a biotina, entonces conjugarse indirectamente a un segundo conjugado que se conjuga a avidina. En algunas realizaciones, la porción conjugada comprende un agente modificador de la depuración (*por ejemplo*, un polímero tal como PEG que extiende la semivida), un agente quimioterapéutico, una toxina, un isótopo radiactivo, un lantánido, un marcador detectable (*por ejemplo*, un marcador luminiscente, un marcador fluorescente, un marcador de sustrato enzimático), un alquilador de ADN, un inhibidor de topoisomerasa, un aglutinante de tubulina, una porción de purificación u otros fármacos anticancerosos (*por ejemplo*, agonista del receptor tipo toll 7 (TLR-7), TLR-8 y/o TLR-9, ARNip, anticuerpo o fragmentos de unión a antígeno de este, un péptido (tal como un péptido corto), etc.).

Una "toxina" puede ser cualquier agente que sea perjudicial para las células o que pueda dañar o destruir células. Los ejemplos de toxinas incluyen, sin limitación, taxol, taxoides,

Análogos de CC-1065 y CC-1065, duocarmicinas y análogos de duocarmicina, enediinas tal como calicheamicinas, dolastatina y análogos de dolastatina, incluidas auristatinas, derivados de tomamicina, derivados de leptomicina, cisplatino, carboplatino, daunorubicina, doxorubicina, vincristina, vinblastina, melfalán, mitomicina C, clorambucil y morfolino
5 doxorubicina, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, MMAE, MMAF, DM1, DM4, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxiantracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, puomicina y análogos de la misma, antimetabolitos (*por ejemplo*, metotrexato, 6-
10 mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo decarbazina), agentes alquilantes (*por ejemplo*, mecloretamina, tioepa clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfano, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C, y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (*por ejemplo*, daunorubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (*por ejemplo*, dactinomicina
15 (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina, y antramicina (AMC)), agentes antimitóticos (*por ejemplo*, vincristina y vinblastina), un inhibidor de la topoisomerasa, y un aglutinante de tubulina.

Los ejemplos de etiquetas detectables pueden incluir etiqueta fluorescentes (por ejemplo, fluoresceína, rodamina, dansilo, ficoeritrina o Texas Red), etiqueta de sustrato
20 enzimático (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, luciferasas, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasas o β -D-galactosidasa), radioisótopo (por ejemplo, ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S , ^3H , ^{111}In , ^{112}In , ^{14}C , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{86}Y , ^{88}Y , ^{90}Y , ^{177}Lu , ^{211}At , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{212}Bi , y ^{32}P , otros lantánidos), etiquetas luminiscentes, resto cromóforo, digoxigenina, biotina/avidina, una molécula de ADN u oro para la detección.

25 En ciertas realizaciones, el resto conjugado puede ser un agente modificador de la depuración que ayuda a aumentar la semivida del anticuerpo. Los ejemplos ilustrativos incluyen polímeros solubles en agua, tales como PEG, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, copolímeros de etilenglicol/propilenglicol y similares. El polímero puede ser de cualquier peso molecular, y puede ser ramificado o no ramificado. La
30 cantidad de polímeros unidos al anticuerpo puede variar, y si se unen más de un polímero, pueden ser moléculas iguales o diferentes.

En ciertas realizaciones, el resto conjugado puede ser un resto de purificación tal como una perla magnética.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo proporcionado en la presente, se usan como una base para un conjugado.

En ciertas realizaciones de realización, el anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo proporcionado en la presente se conjuga con un péptido señal. Se puede
5 utilizar un péptido señal (a veces denominado secuencia señal, secuencia líder o péptido líder) para facilitar la secreción y el aislamiento de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente. Los péptidos señal se caracterizan habitualmente por un núcleo de aminoácidos hidrófobos que generalmente se escinden de la proteína madura durante la secreción en uno o más eventos de escisión. Dichos péptidos señal contienen sitios
10 de procesamiento que permiten la escisión de la secuencia señal de las proteínas maduras a medida que pasan a través de la vía secretora. Por lo tanto, la invención se refiere a los polipéptidos descritos que tienen una secuencia señal, así como a polipéptidos a partir de los cuales la secuencia señal se ha escindido proteolíticamente (*es decir*, los productos de escisión). En una realización, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una
15 secuencia señal puede estar enlazada operativamente en un vector de expresión a una proteína de interés, tal como una proteína que normalmente no se secreta o es difícil de aislar. La secuencia señal dirige la secreción de la proteína, tal como de un huésped eucariota en el que se transforma el vector de expresión, y la secuencia señal se escinde posterior o simultáneamente. Luego, la proteína puede purificarse fácilmente a partir del medio
20 extracelular mediante métodos reconocidos en la técnica. De manera alternativa, la secuencia señal puede unirse a la proteína de interés utilizando una secuencia que facilite la purificación, tal como con un dominio GST.

Receptor de Antígeno Quimérico

En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un receptor de antígeno
25 quimérico que comprende el anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de este proporcionado en la presente, una región transmembrana y una región de señal intracelular.

El término "receptor de antígeno quimérico" o "CAR" o "CAR", tal como se usa en la presente, se refiere a receptores modificados genéticamente, que injertan una especificidad de antígeno en células (por ejemplo, células T tal como células T vírgenes, células T de
30 memoria central, células T de memoria efectora, células T reguladoras, células asesinas naturales o combinación de estas). Los CAR también se conocen como receptores de células T artificiales, receptores de células T quiméricas o inmunorreceptores quiméricos. En algunas realizaciones, los CAR comprenden una región de direccionamiento específica de antígeno

(por ejemplo, los fragmentos de unión a antígeno del anticuerpo anti-CD3 como se proporciona en la presente), una región extracelular, una región transmembrana, una o más regiones coestimuladoras y una región de señal intracelular.

En algunas realizaciones, la región de direccionamiento específica de antígeno es un scFv. En algunas realizaciones, la región transmembrana comprende una región transmembrana de CD3, CD4, CD8 o CD28. En algunas realizaciones, la región coestimuladora comprende un dominio coestimulador de CD28, ICOS, CD27, 4-1BB, OX40 y CD40L. En algunas realizaciones, la región de señal intracelular se selecciona del grupo que consiste en: una secuencia de regiones de señal intracelular de CD3, FcγRI, CD27, CD28, CD137, CD134, MyD88, CD40, CD278, TLR o una combinación de estos.

Los CAR pueden injertarse en varias células, por ejemplo, células alogénicas, células autólogas o células xenogénicas.

El término "célula alogénica", tal como se usa en la presente, se refiere a cualquier célula derivada de un sujeto diferente de la misma especie.

El término "célula autóloga", tal como se usa en la presente, se refiere a cualquier célula derivada del mismo sujeto en la que luego se reintroducirán.

El término "célula xenogénica", tal como se usa en la presente, se refiere a cualquier célula derivada de un sujeto diferente de una especie diferente.

En algunas realizaciones, los CAR se injertan en células efectoras inmunitarias, por ejemplo, células T, células asesinas naturales, células macrófagas, linfocitos infiltrantes de tumores, etc.

Polinucleótidos y métodos recombinantes

La presente divulgación proporciona polinucleótidos aislados que codifican los anticuerpos anti-CD3 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos y/o los receptores de antígeno quimérico proporcionados en la presente. El término "ácido nucleico" o "polinucleótido", tal como se usa en la presente, se refiere a ácidos desoxirribonucleicos (ADN) o ácidos ribonucleicos (ARN) y polímeros de estos en forma monocatenaria o bicatenaria. A menos que se indique lo contrario, una secuencia de polinucleótidos particular también abarca implícitamente variantes modificadas de forma conservadora de esta (por ejemplo, sustituciones de codones degenerados), alelos, ortólogos, SNP y secuencias

complementarias, así como la secuencia indicada explícitamente. Específicamente, las sustituciones de codones degenerados se pueden lograr generando secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) se sustituye con residuos de base mixta y/o desoxiinosina (véase Batzer *et al.*, *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991); Ohtsuka *et al.*, *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985); y Rossolini *et al.*, *Mol. Cell. Probes* 8:91-98 (1994)).

El ADN que codifica para el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, o el receptor de antígeno quimérico proporcionado en la presente se aísla y secuencia fácilmente utilizando procedimientos convencionales (por *ejemplo*, mediante el uso de sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican para las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo). El ADN de codificación también se puede obtener por métodos sintéticos.

El polinucleótido aislado que codifica para los anticuerpos anti-CD3 o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente y/o los receptores de antígeno quiméricos proporcionados en la presente se pueden insertar en un vector para clonación adicional (amplificación del ADN) o para expresión, usando técnicas recombinantes conocidas en la técnica. Hay muchos vectores disponibles. Los componentes del vector generalmente incluyen, de modo no taxativo, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor (por ejemplo, SV40, CMV, EF-1 α) y una secuencia de terminación de la transcripción.

La presente descripción proporciona vectores que comprende los polinucleótidos aislado proporcionado en la presente. En ciertas realizaciones, los polinucleótidos proporcionados en la presente codifican los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos y/o los receptores de antígeno quimérico proporcionados en la presente, al menos un promotor (por ejemplo, SV40, CMV, EF-1 α) enlazado operablemente a la secuencia de ácido nucleico, y al menos un marcador de selección. Los ejemplos de vectores incluyen, pero no se limitan a, retrovirus (incluyendo lentivirus), adenovirus, virus adenoasociados, herpesvirus (por ejemplo, virus del herpes simple), poxvirus, baculovirus, virus del papiloma, papovavirus (por ejemplo, SV40), fago lambda, y el fago M13, plásmido pcDNA3.3, pMD18-T, pOptivec, pCMV, pEGFP, pIRES, pQD-Hyg-GSeu, pALTER, pBAD, pcDNA, pCal, pL, pET, pGEMEX, pGEX, pCI, pEGFT, pSV2, pFUSE, pVITRO, pVIVO, pMAL, pMONO, pSELECT, pUNO, pDUO, Psg5L, pBABE, pWPXL, pBI, p15TV-L, pPro18, pTD, pRS10, pLexA, pACT2.2, pCMV-SCRIPT.RTM., pCDM8, pcDNA1.1/amp, pcDNA3.1, pRc/RSV, PCR 2.1, pEF-1, pFB,

pSG5, pXT1, pCDEF3, pSVSPORT, pEF-Bos etc.

Los vectores que comprenden la secuencia polinucleotídica que codifica para el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo y/o el receptor de antígeno quimérico proporcionado en la presente pueden introducirse en un sistema de expresión del huésped (por ejemplo, una célula huésped) para la clonación o expresión génica. En ciertas realizaciones, el sistema de expresión del huésped proporcionado en la presente es un microorganismo, una levadura o una célula de mamífero. En ciertas realizaciones, el microorganismo se selecciona del grupo que consiste en *E. coli* y *B. subtilis*. En ciertas realizaciones, la levadura es *Saccharomyces*. En ciertas realizaciones, la célula de mamífero se selecciona del grupo que consiste en células COS, CHO-S, CHO-K1, HEK-293 y 3T3.

Las células hospedadoras adecuadas para clonar o expresar el ADN en los vectores de la presente son las células procariotas, de levadura o eucariotas superiores descritas anteriormente. Los procariotas adecuados para este propósito incluyen eubacterias, tales como organismos Gram-negativos o Gram-positivos, por ejemplo, *Enterobacteriaceae* tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans*, y *Shigella*, así como *Bacilli* tal como *B. subtilis* y *B. licheniformis*, *Pseudomonas* tal como *P. aeruginosa* y *Streptomyces*.

Además de los procariotas, los microbios eucariotas tales como hongos filamentosos o levaduras son huéspedes de clonación o expresión adecuados para los vectores que codifican anticuerpos anti-CD3. *Saccharomyces cerevisiae*, o levadura de panadería común, es el más utilizado entre los microorganismos huéspedes eucariotas inferiores. Sin embargo, varios otros géneros, especies y cepas están comúnmente disponibles y son útiles en la presente, como *Schizosaccharomyces pombe*; *Kluyveromyces* hospedadores, tales como, por ejemplo, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12,424), *K. bulgaricus* (ATCC 16,045), *K. wickerhamii* (ATCC 24,178), *K. waltii* (ATCC 56,500), *K. drosophilae* (ATCC 36,906), *K. thermotolerans* y *K. marxianus*; *Yarrowia* (EP 402,226); *Pichia pastoris* (EP 183,070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244,234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* tal como *Schwanniomyces occidentalis*; y filamentosos fungi tal como, por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, y hospedadores *Aspergillus*, tales como *A. nidulans* y *A. niger*.

Las células hospedadoras adecuadas para la expresión de anticuerpos glicosilados o fragmento de antígeno del mismo proporcionada en la presente se derivan de organismos multicelulares. Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células de plantas e

insectos. Se han identificado numerosas cepas y variantes baculovirales y las correspondientes células huésped de insectos permisivas de huéspedes como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (fruitfly) y *Bombyx mori*. Una variedad de cepas virales para la transfección están disponibles públicamente, por ejemplo, la variante L-1 de *Autographa californica* NPV y la cepa Bm-5 de *Bombyx mori* NPV, y dichos virus pueden usarse como el virus en la presente de acuerdo con la presente invención, particularmente para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*. Los cultivos de células vegetales de algodón, maíz, papa, soya, petunia, jitomate y tabaco también se pueden utilizar como huéspedes.

Sin embargo, el interés ha sido mayor en las células de vertebrados, y la propagación de células de vertebrados en cultivo (cultivo de tejidos) se ha convertido en un procedimiento de rutina. Ejemplos de líneas celulares hospedadoras de mamífero útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo en suspensión, Graham *et al.*, *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); células de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); células de sertoli de ratón (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather *et al.*, *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; células de carcinoma de preestómago de ratón (MFC), células SNU620 y una línea de hepatoma humano (Hep G2). En algunas realizaciones, la célula hospedadora es una línea celular cultivada de mamífero, tal como CHO, BHK, NS0, 293, MFC, SNU620 y sus derivados.

Las células hospedadoras se transforman con los vectores de expresión o clonación descritos anteriormente para la producción de anticuerpos anti-CD3 y se cultivan en medios nutritivos convencionales modificados según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas. En otra realización, el anticuerpo se puede producir por recombinación homóloga conocida en la técnica. En ciertas realizaciones, la célula hospedadora es capaz de producir el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo proporcionado en la presente.

La presente descripción también proporciona un método para expresar el anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo y/o el receptor de antígeno quimérico proporcionado en la presente, que comprende cultivar el sistema de expresión del huésped proporcionado en la presente en la condición en la que se expresa el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo y/o el receptor de antígeno quimérico. Los sistemas de expresión hospederos utilizados para producir los anticuerpos o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos y/o el receptor de antígeno quimérico proporcionados en la presente pueden cultivarse en una variedad de medios. Los medios disponibles comercialmente como Ham 's F10 (Sigma), medio mínimo esencial (MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y medio modificado de águila de Dulbecco (DMEM), Sigma) son adecuados para cultivar las células hospederas. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham *et ál.*, *Meth. Enz.* 58:44 (1979), Barnes *et al.*, *Anal. Biochem.* 102:255 (1980), patente estadounidense N.º 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655; o 5,122,469; WO 90/03430; WO 87/00195; o la patente estadounidense Re. 30,985 se pueden usar como medios de cultivo para las células hospedoras. Cualquiera de estos medios puede complementarse según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (como cloruro de sodio, calcio, magnesio y fosfato), amortiguadores (como HEPES), nucleótidos (como adenosina y timidina), antibióticos (como el fármaco GENTAMICINA™), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos generalmente presentes en concentraciones finales en el rango micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. También se puede incluir cualquier otro suplemento necesario a concentraciones apropiadas que serían conocidas por un experto en la técnica. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH y similares, son las utilizadas previamente con la célula hospedadora seleccionada para la expresión, y serán evidentes para un experto en la técnica.

Cuando se utilizan técnicas recombinantes, el anticuerpo puede producirse intracelularmente, en el espacio periplásmico o secretarse directamente en el medio. Si el anticuerpo se produce intracelularmente, como primera etapa, los residuos particulados, ya sean células huésped o fragmentos lisados, se eliminan, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10:163-167 (1992) describen un procedimiento para aislar anticuerpos que se secretan al espacio periplásmico de *E. coli*. En resumen, la pasta celular se descongela en presencia de acetato de sodio (pH 3,5), EDTA y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) durante aproximadamente 30 min. Los residuos celulares se pueden eliminar por centrifugación. Cuando el anticuerpo se secreta en el medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión generalmente se concentran primero

utilizando un filtro de concentración de proteínas disponible comercialmente, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Se puede incluir un inhibidor de proteasa tal como PMSF en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y se pueden incluir antibióticos para prevenir el crecimiento de contaminantes adventicios.

5 Los anticuerpos anti-CD3 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos y/o los receptores antigénicos quiméricos preparados a partir de los sistemas de expresión hospederos pueden purificarse usando, por ejemplo, cromatografía de hidroxapatita, electroforesis en gel, diálisis, cromatografía de intercambio iónico DEAE-celulosa, precipitación con sulfato de amonio, lavado y cromatografía de afinidad, siendo la
10 cromatografía de afinidad la técnica de purificación preferida.

En ciertas modalidades, la proteína A inmovilizada en una fase sólida se utiliza para la purificación por inmunoafinidad del anticuerpo y del fragmento de unión a antígeno del mismo y/o del receptor de antígeno quimérico proporcionado en la presente. La idoneidad de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie y el isotipo de cualquier dominio
15 Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. La proteína A se puede utilizar para purificar anticuerpos que se basan en cadenas pesadas gamma1, gamma2 o gamma4 humanas (Lindmark *et al.*, *J. Immunol. Meth.* (1983) 62:1-13). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para gamma3 humano (Guss *et al.*, *EMBO J.* 5:1567 1575 (1986)). La matriz a la que se une el ligando de afinidad es con mayor frecuencia agarosa,
20 pero hay otras matrices disponibles. Las matrices mecánicamente estables, como el vidrio de poro controlado o el poli(estirenodivinil)benceno, permiten caudales más rápidos y tiempos de procesamiento más cortos que los que se pueden lograr con agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio CH3, la resina Bakerbond ABXTM (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.) es útil para la purificación. También están disponibles otras técnicas para la purificación de
25 proteínas, tales como fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía en sílice, cromatografía en heparina SEPHAROSTM, cromatografía en una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatografía de enfoque, SDS-PAGE y precipitación con sulfato de amonio, dependiendo del anticuerpo a recuperar.

30 Después de cualquier etapa o etapas de purificación preliminares, la mezcla que comprende el anticuerpo de interés y los contaminantes se puede someter a cromatografía de interacción hidrofóbica a pH bajo usando un amortiguador de elución a un pH entre aproximadamente 2,5-4,5, preferentemente realizado a concentraciones de sal bajas (por

ejemplo, de aproximadamente 0-0,25 M de sal).

Composición farmacéutica

La presente descripción proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos anti-CD3 o fragmentos de unión a antígeno de estos y/o los receptores de antígeno quiméricos proporcionados en la presente, y uno o más portadores farmacéuticamente aceptables.

Los portadores farmacéuticamente aceptables para su uso en las composiciones farmacéuticas descritas en la presente pueden incluir, por ejemplo, portadores líquidos, geles o sólidos farmacéuticamente aceptables, vehículos acuosos, vehículos no acuosos, agentes antimicrobianos, agentes isotónicos, amortiguadores, antioxidantes, anestésicos, agentes de suspensión/dispersión, agentes secuestrantes o quelantes, diluyentes, adyuvantes, excipientes o sustancias auxiliares no tóxicas, otros componentes conocidos en la técnica o varias combinaciones de estos.

Los componentes adecuados pueden incluir, por ejemplo, antioxidantes, rellenos, aglutinantes, desintegrantes, amortiguadores, conservantes, lubricantes, saborizantes, espesantes, agentes colorantes, emulsionantes o estabilizantes tales como azúcares y ciclodextrinas. Los antioxidantes adecuados pueden incluir, por ejemplo, metionina, ácido ascórbico, EDTA, tiosulfato de sodio, platino, catalasa, ácido cítrico, cisteína, tioglicerol, ácido tioglicólico, tiosorbitol, hidroxanisol butilado, hidroxitolueno butilado y/o galato de propilo. Como se divulga en la presente, la inclusión de uno o más antioxidantes tal como metionina en una composición que comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo y conjugados proporcionados en la presente disminuye la oxidación del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo. Esta reducción en la oxidación previene o reduce la pérdida de afinidad de unión, mejorando así la estabilidad del anticuerpo y maximizando la vida útil. Por lo tanto, en ciertas realizaciones se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos como se describe en la presente y uno o más antioxidantes tales como metionina. Además, se proporcionan métodos para prevenir la oxidación, extender la vida útil y/o mejorar la eficacia de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno como se proporciona en la presente mediante la mezcla del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno con uno o más antioxidantes tales como metionina.

Para ilustrar adicionalmente, los portadores farmacéuticamente aceptables pueden

incluir, por ejemplo, vehículos acuosos tales como inyección de cloruro de sodio, inyección de Ringer, inyección de dextrosa isotónica, inyección de agua estéril o inyección de dextrosa y lactato de Ringer, vehículos no acuosos tales como aceites fijos de origen vegetal, aceite de semilla de algodón, aceite de maíz, aceite de ajonjolí o aceite de cacahuate, agentes antimicrobianos a concentraciones bacteriostáticas o fungistáticas, agentes isotónicos tales como cloruro de sodio o dextrosa, amortiguadores tales como amortiguadores de fosfato o citrato, antioxidantes tales como bisulfato de sodio, anestésicos locales tales como clorhidrato de procaína, agentes de suspensión y dispersión tales como carboximetilcelulosa de sodio, hidroxipropilmetilcelulosa o polivinilpirrolidona, agentes emulsionantes tales como Polysorbate 80 (TWEEN-80), agentes secuestrantes o quelantes tales como EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) o EGTA (ácido etilenglicoltetraacético), alcohol etílico, polietilenglicol, propilenglicol, hidróxido de sodio, ácido clorhídrico, ácido cítrico o ácido láctico. Los agentes antimicrobianos utilizados como portadores se pueden agregar a composiciones farmacéuticas en recipientes de dosis múltiples que incluyen fenoles o cresoles, mercuriales, alcohol bencílico, clorobutanol, ésteres metílicos y propílicos del ácido p-hidroxibenzoico, timerosal, cloruro de benzalconio y cloruro de bencetonio. Los excipientes adecuados pueden incluir, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol o etanol. Las sustancias auxiliares no tóxicas adecuadas pueden incluir, por ejemplo, agentes humectantes o emulsionantes, agentes amortiguadores del pH, estabilizadores, potenciadores de la solubilidad o agentes tales como acetato de sodio, monolaurato de sorbitán, oleato de trietanolamina o ciclodextrina.

Las composiciones farmacéuticas pueden ser una solución líquida, suspensión, emulsión, píldora, cápsula, comprimido, formulación de liberación sostenida o polvo. Las formulaciones orales pueden incluir portadores estándar tales como grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, polivinilpirrolidona, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, etc.

En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se formulan en una composición inyectable. Las composiciones farmacéuticas inyectables se pueden preparar en cualquier forma convencional, tal como, por ejemplo, solución líquida, suspensión, emulsión o formas sólidas adecuadas para generar solución, suspensión o emulsión líquida. Las preparaciones para inyección pueden incluir soluciones estériles y/o no piréticas listas para inyección, productos solubles secos estériles, tales como polvos liofilizados, listos para combinarse con un disolvente justo antes de su uso, incluyendo comprimidos hipodérmicos, suspensiones estériles listas para inyección, productos insolubles secos estériles listos para combinarse con un vehículo justo antes de su uso y emulsiones estériles y/o no piréticas. Las

soluciones pueden ser acuosas o no acuosas.

En ciertas realizaciones, las preparaciones parenterales de dosis unitaria se envasan en una ampollita, un vial o una jeringa con una aguja. Todas las preparaciones para administración parenteral deben ser estériles y no piréticas, como se conoce y se practica en la técnica.

En ciertas realizaciones, se prepara un polvo liofilizado estéril disolviendo un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno como se describe en la presente en un solvente adecuado. El solvente puede contener un excipiente que mejora la estabilidad u otros componentes farmacológicos del polvo o solución reconstituida, preparada a partir del polvo. Los excipientes que se pueden usar incluyen, de modo no taxativo, agua, dextrosa, sorbital, fructosa, jarabe de maíz, xilitol, glicerina, glucosa, sacarosa u otro agente adecuado. El solvente puede contener un amortiguador, tal como citrato, fosfato de sodio o potasio u otro amortiguador conocido por un experto en la técnica a, en una realización, aproximadamente pH neutro. La posterior filtración estéril de la solución seguida de liofilización en condiciones estándar conocidas por un experto en la técnica proporciona una formulación deseable. En una realización, la solución resultante se distribuirá en viales para la liofilización. Cada vial puede contener una dosificación individual o múltiples dosificaciones del anticuerpo anti-CD3 o fragmento de unión a antígeno del mismo o composición del mismo. El llenado excesivo de los viales con una pequeña cantidad por encima de la necesaria para una dosis o conjunto de dosis (por ejemplo, aproximadamente el 10 %) es aceptable para facilitar la extracción precisa de la muestra y la dosificación precisa. El polvo liofilizado se puede almacenar en condiciones apropiadas, tal como de alrededor de 4 °C a temperatura ambiente.

La reconstitución de un polvo liofilizado con agua para inyección proporciona una formulación para su uso en la administración parenteral. En una realización, para la reconstitución, el agua estéril y/o no pirética u otro portador líquido adecuado se agrega al polvo liofilizado. La cantidad precisa depende de la terapia seleccionada que se administre y se puede determinar empíricamente.

Kits

En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un kit que comprende el anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de este proporcionado en la presente y/o la composición farmacéutica proporcionada en la presente y/o el receptor de antígeno quimérico proporcionado en la presente. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona

un kit que comprende el anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de este proporcionado en la presente y/o la composición farmacéutica proporcionada en la presente y/o el receptor de antígeno quimérico proporcionado en la presente, y un segundo agente terapéutico. En ciertas realizaciones, el segundo agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en

5 un agente quimioterapéutico, un fármaco anticancerígeno, un agente de radioterapia, un agente de inmunoterapia, un agente antiangiogénico, un agente de terapia dirigida, un agente de terapia celular, un agente de terapia génica, un agente de terapia hormonal, un agente antiviral, un antibiótico, un analgésico, un antioxidante, un quelante metálico y citocinas.

Estos kits pueden incluir además, si se desea, uno o más de varios componentes de

10 kit farmacéuticos convencionales, tal como, por ejemplo, recipientes con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, recipientes adicionales, etc., tal como será fácilmente evidente un experto en la técnica. También se pueden incluir en el kit instrucciones, ya sea como prospectos o como marcas, que indiquen las cantidades de los componentes que se van a administrar, directrices para la administración, y/o directrices para mezclar los

15 componentes.

Métodos de uso

La presente descripción también proporciona métodos para tratar, prevenir o aliviar una enfermedad, trastorno o condición en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo

20 proporcionado en la presente, y/o la composición farmacéutica proporcionada en la presente, y/o el receptor de antígeno quimérico proporcionado en la presente. En ciertas realizaciones, la enfermedad, trastorno o condición es una enfermedad, trastorno o condición relacionada con CD3. En ciertas realizaciones, el sujeto es un humano.

En algunas realizaciones, la enfermedad, trastorno o condición relacionada con CD3

25 se caracteriza por expresar o sobreexpresar CD3.

En ciertas realizaciones, la enfermedad, trastorno o condición es una enfermedad inmunitaria, una enfermedad inflamatoria, un cáncer o una enfermedad neurológica. En ciertas realizaciones, el cáncer es un cáncer que expresa CD3. "Cáncer que expresa CD3", tal como se utiliza en la presente, se refiere a un cáncer caracterizado por expresar la proteína CD3 en

30 una célula cancerosa, una célula inmunitaria infiltrante en un tumor, o por expresar CD3 en una célula cancerosa, una célula inmunitaria infiltrante en un tumor a un nivel significativamente superior al que cabría esperar de una célula normal. Se pueden utilizar

varios métodos para determinar la presencia y/o cantidad de CD3 en una muestra biológica de prueba del sujeto. Por ejemplo, la muestra biológica de prueba puede exponerse a un anticuerpo anti-CD3 o a un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une a la proteína CD3 expresada y la detecta. Alternativamente, CD3 también se pueden detectar a nivel de expresión de ácido nucleico, usando métodos tales como qPCR, PCR de transcriptasa inversa, micromatriz, SAGE, FISH y similares. En algunas realizaciones, la muestra de prueba se deriva de una célula o tejido canceroso, o células inmunitarias infiltrantes de tumores. La muestra de referencia puede ser una muestra de control obtenida de un individuo sano o no enfermo, o una muestra sana o no enferma obtenida del mismo individuo del que se obtiene la muestra de prueba. Por ejemplo, la muestra de referencia puede ser una muestra adyacente sin enfermedad o en la proximidad de la muestra de prueba (por ejemplo, tumor). En ciertas realizaciones, el cáncer es un tumor sólido o tumor hematológico.

En ciertas realizaciones, la enfermedad, trastorno o condición se selecciona del grupo que consiste en cáncer de pulmón (*por ejemplo*, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC), adenocarcinoma de pulmón o carcinoma de células escamosas de pulmón), cáncer peritoneal, cáncer carcinoide, cáncer de huesos, cáncer de páncreas, tumor neuroectodérmico primitivo, cáncer de piel, cáncer de vesícula biliar, cáncer de cabeza o cuello, cáncer de células escamosas, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer rectal, cáncer de próstata, cáncer de vejiga (por ejemplo,, cáncer urotelial), cáncer de la región anal (por ejemplo,, carcinoma de células escamosas anal), cáncer gástrico o de estómago (por ejemplo,, cáncer gastrointestinal), cáncer de esófago, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de útero, cáncer de hígado (por ejemplo,, hepatoblastoma, carcinoma hepatocelular/hepatoma o carcinoma hepático), colangiocarcinoma, sarcoma, cáncer colorrectal, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma de las glándulas salivales, carcinoma del cuello uterino, carcinoma endometrial o uterino, osteosarcoma, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, cáncer de esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de la glándula paratiroides, cáncer de la glándula suprarrenal, cáncer de la nasofaringe, sarcoma de tejido blando, policitemia vera, cáncer de la uretra, cáncer del pene, cáncer del riñón o del uréter (por ejemplo,, tumor rabdoide del riñón), linfoma cutáneo de células T, meduloblastoma, nefroblastoma, síndrome mielodisplásico, trastorno mieloproliferativo crónico y no crónico, papiloma del plexo coroideo, carcinoma de células renales, carcinoma de la pelvis renal, neoplasias del sistema nervioso central (SNC), sarcoma de tejidos blandos (por ejemplo,, rhabdomyosarcoma, fibrosarcoma, sarcoma de Kaposi), tumores del eje espinal, glioma (por ejemplo,, ependimoma, astrocitoma, astrocitoma anaplásico, oligodendroglioma,

cáncer ocular (por ejemplo,, retinoblastoma), glioma del tronco encefálico o glioma mixto como oligoastrocitoma), tumor cerebral (por ejemplo,, glioblastoma/glioblastoma multiforme (GBM), tumor cerebral no glioblastoma o meningioma), melanoma (por ejemplo,, melanoma cutáneo o intraocular), trombocitemia, mesotelioma, micosis fungoide, síndrome de Sézary,

5 mielofibrosis idiopática, plasmocitoma solitario, schwannoma vestibular, sarcoma de Ewing, condrosarcoma, poliposis asociada a MYH, adenoma pituitario, cánceres pediátricos como sarcomas pediátricos (por ejemplo,, neuroblastoma, rabdomiosarcoma y osteosarcoma), cáncer hematológico, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, leucemia (por ejemplo,, leucemia linfocítica/linfoblástica), leucemia crónica o aguda, leucemia de mastocitos, linfomas

10 linfocíticos, linfoma primario del sistema nervioso central, leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia mieloide crónica (LMC), leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia mielomonocítica crónica (LMMC), leucemia linfoblástica crónica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia de células pilosas (LCP), linfoma de Burkitt (LB), mieloma múltiple (por ejemplo,, mieloma múltiple recidivante o refractario), Linfoma de células T o B,

15 linfoma de células del manto (LCM) (por ejemplo,, linfoma de células del manto recidivante o refractario), melanoma maligno, linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), DLBCL que resulta de un linfoma folicular, linfoma de células B de alto grado, linfoma mediastínico primario de células B grandes, linfoma folicular (FL) y linfoma mediastínico primario de células B.

En algunas realizaciones, se ha identificado que el sujeto tiene una célula cancerosa

20 o células inmunitarias infiltrantes de tumores que expresan CD3, opcionalmente a un nivel significativamente mayor que el nivel normalmente encontrado en células no cancerosas.

En otro aspecto, se proporcionan métodos para tratar, prevenir o aliviar una enfermedad, trastorno o condición en un sujeto que se beneficiaría de la modulación de la actividad de CD3, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz

25 del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo proporcionado en la presente, y/o la composición farmacéutica proporcionada en la presente, y/o el receptor de antígeno quimérico proporcionado en la presente. En ciertas realizaciones, la enfermedad, trastorno o condición es una enfermedad, trastorno o condición relacionada con CD3, que se define anteriormente.

La cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno

30 se proporciona en la presente dependerá de diversos factores conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, peso corporal, edad, antecedentes médicos, medicamentos actuales, estado de salud del sujeto y potencial de reacción cruzada, alergias, sensibilidades y efectos

secundarios adversos, así como la vía de administración y el alcance del desarrollo de la enfermedad. Las dosis pueden reducirse o aumentarse proporcionalmente por un experto en la técnica (por ejemplo, médico o veterinario) según lo indiquen estas y otras circunstancias o requisitos.

5 En ciertas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo y/o el receptor de antígeno quimérico proporcionado en la presente puede administrarse a una dosificación terapéuticamente eficaz de alrededor de 0,01 mg/kg a alrededor de 100 mg/kg. En ciertas realizaciones, la dosificación de administración puede cambiar en el transcurso del tratamiento. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la dosificación de administración inicial
10 puede ser mayor que las dosificaciones de administración posteriores. En ciertas realizaciones, la dosificación de administración puede variar durante el curso del tratamiento dependiendo de la reacción del sujeto.

 Los regímenes de dosificación se pueden ajustar para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, se puede administrar
15 una sola dosis, o se pueden administrar varias dosis divididas a lo largo del tiempo.

 Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente se pueden administrar por cualquier vía conocida en la técnica, por ejemplo, la administración es a través de una vía parenteral que comprende inyección subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular o intradérmica; o una vía no parenteral que
20 comprende transdérmica, oral, intranasal, intraocular, sublingual, rectal o tópica.

 En algunas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos y/o los receptores de antígeno quimérico proporcionados en la presente se pueden administrar solos o en combinación una cantidad terapéuticamente efectiva de un segundo agente terapéutico. Por ejemplo, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos
25 y/o los receptores de antígeno quiméricos descritos en la presente pueden administrarse en combinación con un segundo agente terapéutico, por ejemplo, un agente quimioterapéutico, un fármaco anticanceroso, un agente de radioterapia, un agente de inmunoterapia, un agente de terapia dirigida, un agente de terapia celular, un agente de terapia génica, un agente de terapia hormonal, un agente antiviral, un antibiótico, un analgésico, un antioxidante, un
30 quelante metálico, citocinas, un agente activo, un agente de imagen, un agente citotóxico, un inhibidor de angiogénesis, un inhibidor de cinasa, un agonista de molécula de coestimulación, un bloqueador de molécula de cohibición, un bloqueador de molécula de adhesión, un anticuerpo anti-citocina o fragmento funcional de este, un marcador o indicador detectable, un

antimicrobiano, un agente de edición génica, un agonista beta, un inhibidor de ARN viral, un inhibidor de polimerasa, un interferón o un microARN.

5 El término "inmunoterapia", como se usa en la presente, se refiere a un tipo de terapia que estimula el sistema inmunitario para luchar contra enfermedades como el cáncer o que estimula el sistema inmunitario de manera general. Los ejemplos de inmunoterapia incluyen, sin limitación, moduladores de puntos de control, transferencia de células adoptivas, citocinas, virus oncolíticos y vacunas terapéuticas.

10 "Terapia dirigida" es un tipo de terapia que actúa sobre moléculas específicas asociadas con el cáncer, tal como proteínas específicas que están presentes en las células cancerosas pero no en las células normales o que son más abundantes en las células cancerosas, o las moléculas diana en el microentorno del cáncer que contribuyen al crecimiento y la supervivencia del cáncer. La terapia dirigida dirige un agente terapéutico a un tumor, evitando así que el tejido normal tenga los efectos del agente terapéutico.

15 En algunas de estas realizaciones, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo proporcionado en la presente, y/o la composición farmacéutica proporcionada en la presente, y/o el receptor de antígeno quimérico proporcionado en la presente que se administra en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales puede administrarse simultáneamente con uno o más agentes terapéuticos adicionales, y en algunas de estas realizaciones el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, y/o la
20 composición farmacéutica proporcionada en la presente, y/o el receptor de antígeno quimérico proporcionado en la presente, y el o los agentes terapéuticos adicionales pueden administrarse como parte de la misma composición farmacéutica. Sin embargo, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, y/o una composición farmacéutica proporcionada en la presente, y/o un receptor de antígeno quimérico proporcionado en la presente
25 administrado "en combinación" con otro agente terapéutico no tiene que administrarse simultáneamente con o en la misma composición que el agente. Se considera que un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, composición farmacéutica o receptor de antígeno quimérico administrado antes o después de otro agente se administra "en combinación" con dicho agente tal como se utiliza la frase en la presente, incluso si el
30 anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, composición farmacéutica o receptor de antígeno quimérico y el segundo agente se administran por vías diferentes. Cuando sea posible, los agentes terapéuticos adicionales administrados en combinación con los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, composiciones farmacéuticas o receptores de

antígeno quimérico divulgados en la presente se administran de acuerdo con el esquema indicado en la hoja de información del producto del agente terapéutico adicional, o de acuerdo con el Physicians' Desk Reference 2003 (Physicians' Desk Reference, 57th Ed; Medical Economics Company; ISBN: 1563634457; 57th edition (November 2002)) o protocolos bien conocidos en la técnica.

La presente descripción proporciona además un método para activar células T que expresan CD3 *in vivo* o *in vitro*, que comprende poner en contacto las células T que expresan CD3 con el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo proporcionado en la presente, y/o la composición farmacéutica proporcionada en la presente, y/o el receptor de antígeno quimérico proporcionado en la presente.

La presente descripción proporciona además métodos para modular la actividad de CD3 en células que expresan CD3, que comprenden exponer las células que expresan CD3 a los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente, y/o la composición farmacéutica proporcionada en la presente, y/o el receptor de antígeno quimérico proporcionado en la presente.

La presente descripción proporciona además métodos para promover el procesamiento *in vivo* o *in vitro* de un segundo antígeno por células T que expresan CD3, que comprende poner en contacto las células T que expresan CD3 con los anticuerpos biespecíficos o fragmentos de unión a antígeno de estos proporcionados en la presente, en donde los anticuerpos biespecíficos o fragmentos de unión a antígeno de estos son capaces de unirse específicamente tanto a las células T que expresan CD3 como a un segundo antígeno, lo que pone a ambos en estrecha proximidad.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona métodos para detectar la presencia o cantidad de CD3 en una muestra, que comprende poner en contacto la muestra con el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo proporcionado en la presente, y/o la composición farmacéutica proporcionada en la presente, y/o el receptor de antígeno quimérico proporcionado en la presente, y determinar la presencia o cantidad de CD3 en la muestra.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método de diagnóstico de una enfermedad, trastorno o condición relacionados con CD3 en un sujeto, que comprende: a) obtener una muestra del sujeto, b) poner en contacto la muestra obtenida del sujeto con el anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo proporcionado en la presente y/o la

1.1. Vacunación

Para generar anticuerpos contra CD3, se inmunizaron ratones SJL, Balb/c y CD1 con células (*es decir*, células que sobreexpresan CD3 humano (Jurkat-hCD3mix o 293T-hCD3mix), células T CD3⁺ humanas, células T CD3⁺ humanas activadas, células T CD3⁺ de cynomolgus), proteínas CD3 (*es decir*, complejo CD3 δε humano y complejo CD3 γε humano, complejo CD3 δε de cynomolgus y proteína del complejo CD3 γε de cynomolgus) o genes (plásmido pTT5-Human CD3 δε, plásmido pTT5-Cynomolgus CD3 δε) en cada grupo. Se inmunizaron ratones Balb/c y CD1 como se muestra en la Tabla 4. Los ratones SJL se inmunizaron como se muestra en la Tabla 5. La inmunización primaria fue seguida por varios refuerzos hasta que los animales desarrollaron títulos de antisuero satisfactorios adecuados para el desarrollo del hibridoma. Se utilizó CPG como adyuvante. Los protocolos de inmunización para cada grupo de animales se mostraron en las Tablas 6, 7, 8, 9, 10 y 11 a continuación.

Tabla 4. Agrupación de ratones Balb/c yCD1

Grupo	Inmunógeno	Vía	Animal/ Cepa	Tamaño del grupo	Dosificación
1	Jurkat-hCD3mix	I.P.	Balb/c yCD1	5/5	5×10 ⁶ por ratón
2	Células T CD3 ⁺ humanas	I.P.	Balb/c yCD1	5/5	5×10 ⁶ por ratón
3	Células T CD3 ⁺ humanas activadas	I.P.	Balb/c yCD1	5/5	5×10 ⁶ por ratón
4	Complejo CD3 δε humano Complejo CD3 γε humano	I.H.	Balb/c yCD1	5/5	25µg 25µg

Tabla 5. Agrupación de ratones SJL

Grupo	Inmunógeno	Vía	Animal/ Cepa	Tamaño del grupo	Dosificación
5	plásmido pTT5- Cynomolgus CD3 δε	Pistola de genes	SLJ	3/3	4 µg

	Plásmido pTT5-CD3 δε humano	Pistola de genes			4 µg
	Plásmido pTT5-CD3 δε humano + Plásmido pTT5-CD3 δε de cynomolgus & Complejo CD3 δε humano + Complejo CD3 γε humano + Complejo CD3 δε de Cynomolgus + Complejo CD3 γε de Cynomolgus	Pistola de genes S.C.			2 µg +2 µg 12,5 µg +12,5 µg +12,5 µg
	Plásmido pTT5-CD3 δε humano + Plásmido pTT5-CD3 δε de cynomolgus	Pistola de genes			2 µg +2 µg
	Plásmido pTT5-CD3 δε humano + Plásmido pTT5-CD3 δε de cynomolgus & Complejo CD3 δε humano + Complejo CD3 γε humano + Complejo CD3 δε de Cynomolgus + Complejo CD3 γε de Cynomolgus & Células Jurkat + Células T CD3 ⁺ de Cynomolgus	Pistola de genes S.C. I.P.			2 µg +2 µg 12,5 µg +12,5 µg +12,5 µg 5 x 10 ⁶ por ratón + 5 x 10 ⁶ por ratón
6	plásmido pTT5-	Pistola	SLJ	2/2	4 µg

	Cynomolgus CD3 $\delta\epsilon$	de genes			
	Plásmido pTT5-CD3 $\delta\epsilon$ humano	Pistola de genes			4 μg
	Plásmido pTT5-CD3 $\delta\epsilon$ humano + Plásmido pTT5-CD3 $\delta\epsilon$ de cynomolgus & Complejo CD3 $\delta\epsilon$ humano + Complejo CD3 $\gamma\epsilon$ humano + Complejo CD3 $\delta\epsilon$ de Cynomolgus + Complejo CD3 $\gamma\epsilon$ de Cynomolgus	Pistola de genes S.C.			2 μg +2 μg 12,5 μg +12,5 μg +12,5 μg
	Plásmido pTT5-CD3 $\delta\epsilon$ humano + Plásmido pTT5-CD3 $\delta\epsilon$ de cynomolgus	Pistola de genes			2 μg +2 μg
	Plásmido pTT5-CD3 $\delta\epsilon$ humano + Plásmido pTT5-CD3 $\delta\epsilon$ de cynomolgus & Células 293T-hCD3mix + Células T CD3 ⁺ de cynomolgus	Pistola de genes I.P.			2 μg +2 μg 5×10^6 por ratón + 5×10^6 por ratón

Tabla 6. Protocolo de inmunización para el Grupo 1

Día 0	Pre-sangrado (15-30 μL de suero/ratón)Primario: 5×10^6 células por ratón I.P.
Día 21	Refuerzo 1: 5×10^6 células por ratón I.P.
Día 35	Sangrado de prueba (15-30 μL de suero/ratón) (TB1)

Día 42	Refuerzo 2: 5×10^6 células por ratón I.P.
Día 56	Sangrado de prueba (15-30 μ L de suero/ratón) (TB2)
Día 77	Refuerzo 3: 5×10^6 células por ratón I.P.
Día 91	Sangrado de prueba (15-30 μ L de suero/ratón) (TB3)
	Análisis de datos y conclusión de fase
Día 118	Refuerzo de perfusión (final), para cada ratón: 25 μ g de complejo CD3 $\delta\epsilon$ I.H., 25 μ g de complejo CD3 $\gamma\epsilon$, I.H., 5×10^6 JURKAT-HCD3MIX I.P., 5×10^6 Células T CD3 ⁺ activadas, I.P.
Los animales no seleccionados para la fusión celular se mantuvieron en jaulas y se les pueden dar inmunizaciones de refuerzo adicionales.	

Tabla 7. Protocolo de inmunización para el Grupo 2

Día 0	Pre-sangrado (15-30 μ L de suero/ratón)Primario: 5×10^6 células por ratón I.P.
Día 21	Refuerzo 1: 5×10^6 células por ratón I.P.
Día 35	Sangrado de prueba (15-30 μ L de suero/ratón) (TB1)
Día 42	Refuerzo 2: 5×10^6 células por ratón I.P.
Día 56	Sangrado de prueba (15-30 μ L de suero/ratón) (TB2)
Día 77	Refuerzo 3: 5×10^6 células por ratón I.P.
Día 91	Sangrado de prueba (15-30 μ L de suero/ratón) (TB3)
	Análisis de datos y conclusión de fase
Día 118	Refuerzo de perfusión (final), para cada ratón: 25 μ g de complejo CD3 $\delta\epsilon$ I.H., 25 μ g de complejo CD3 $\gamma\epsilon$, I.H., 5×10^6 JURKAT-HCD3MIX I.P., 5×10^6 Células T CD3 ⁺ activadas, I.P.
Los animales no seleccionados para la fusión celular se mantuvieron en jaulas y se les pueden dar inmunizaciones de refuerzo adicionales.	

Tabla 8. Protocolo de inmunización para el Grupo 3

Día 0	Pre-sangrado (15-30 μ L de suero/ratón)Primario: 5×10^6 células por ratón I.P.
Día 21	Refuerzo 1: 5×10^6 células por ratón I.P.
Día 35	Sangrado de prueba (15-30 μ L de suero/ratón) (TB1)

Día 42	Refuerzo 2: 5 x 10 ⁶ células por ratón I.P.
Día 56	Sangrado de prueba (15-30 µL de suero/ratón) (TB2)
Día 77	Refuerzo 3: 5 x 10 ⁶ células por ratón I.P.
Día 91	Sangrado de prueba (15-30 µL de suero/ratón) (TB3)
	Análisis de datos y conclusión de fase
Día 118	Refuerzo de prefusión (final), para cada ratón: 25 µg de complejo CD3 δε I.H., 25 µg de complejo CD3 γε, I.H., 5 x 10 ⁶ JURKAT-HCD3MIX I.P., 5 x 10 ⁶ Células T CD3 ⁺ activadas, I.P.
Los animales no seleccionados para la fusión celular se mantuvieron en jaulas y se les pueden dar inmunizaciones de refuerzo adicionales.	

Tabla 9. Protocolo de inmunización para el Grupo 4

Día 0	Pre-sangrado (15-30 µL de suero/ratón)Primario: 25 µg de complejo CD3 δε I.H., 25 µg de complejo CD3 γε, I.H.
Día 21	Refuerzo 1: 25 µg de complejo CD3 δε I.H., 25 µg de complejo CD3 γε, I.H. por ratón
Día 35	Sangrado de prueba (15-30 µL de suero/ratón) (TB1)
Día 42	Refuerzo 2: 25 µg de complejo CD3 δε I.H., 25 µg de complejo CD3 γε, I.H. por ratón
Día 56	Sangrado de prueba (15-30 µL de suero/ratón) (TB2)
Día 77	Refuerzo 3: 25 µg de complejo CD3 δε I.H., 25 µg de complejo CD3 γε, I.H. por ratón
Día 91	Sangrado de prueba (15-30 µL de suero/ratón) (TB3)
	Análisis de datos y conclusión de fase
Día 118	Refuerzo de prefusión (final), para cada ratón: 25 µg de complejo CD3 δε I.H., 25 µg de complejo CD3 γε, I.H., 5 x 10 ⁶ JURKAT-HCD3MIX I.P., 5 x 10 ⁶ Células T CD3 ⁺ activadas, I.P.
Los animales no seleccionados para la fusión celular se mantuvieron en jaulas y se les pueden dar inmunizaciones de refuerzo adicionales.	

Tabla 10. Protocolo de inmunización para el Grupo 5

Día 0	Pre-sangrado (15-30 µL de suero/ratón)Primario: pTT5-Cynomolgus CD3 δε
-------	--

	plásmido 4 µg, pistola génica.
Día 14	Refuerzo 1: plásmido pTT5-CD3 δε humano, 4 µg, pistola génica.
Día 21	Sangrado de prueba (15-30 µL de suero/ratón) (TB1)
Día 28	Refuerzo 2: plásmido pTT5-CD3 δε de Cynomolgus 4 µg, pistola génica.
Día 35	Sangrado de prueba (15-30 µL de suero/ratón) (TB2)
Día 42	Refuerzo 3: plásmido pTT5-CD3 δε humano 2 µg + plásmido pTT5-CD3 δε de Cynomolgus 2 µg, pistola génica; Complejo CD3 δε humano 12,5 µg + Complejo CD3 γε humano 12,5 µg + Complejo CD3 δε de Cynomolgus 12,5 µg + Complejo CD3 γε de Cynomolgus 12,5 µg, S.C.
Día 49	Sangrado de prueba (15-30 µL de suero/ratón) (TB3)
Día 56	Refuerzo 4: plásmido pTT5-CD3 δε humano 2 µg + plásmido pTT5-CD3 δε de Cynomolgus 2 µg, pistola génica.
Día 78	Refuerzo 5: plásmido pTT5-CD3 δε humano 2 µg + plásmido pTT5-CD3 δε de Cynomolgus 2 µg, pistola génica; Complejo CD3 δε humano 12,5 µg + Complejo CD3 γε humano 12,5 µg + Complejo CD3 δε de Cynomolgus 12,5 µg + Complejo CD3 γε de Cynomolgus 12,5 µg, S.C.
Día 85	Sangrado de prueba (15-30 µL de suero/ratón) (TB5)
	Análisis de datos y conclusión de fase
Día 92	Pre-fusión (final) Refuerzo: plásmido pTT5-CD3 δε humano 2 µg + plásmido pTT5-CD3 δε de Cynomolgus 2 µg, pistola génica; Complejo CD3 δε humano 12,5 µg + Complejo CD3 γε humano 12,5 µg + Complejo CD3 δε de Cynomolgus 12,5 µg + Complejo CD3 γε de Cynomolgus 12,5 µg, S.C.; 5 x 10 ⁶ células Jurkat + 5 x 10 ⁶ células T CD3 ⁺ de Cynomolgus, I.P..
Los animales no seleccionados para la fusión celular se mantuvieron en jaulas y se les pueden dar inmunizaciones de refuerzo adicionales.	

Tabla 11. Protocolo de inmunización para el Grupo 6

Día 0	Pre-sangrado (15-30 µL de suero/ratón)Primario: pTT5-Cynomolgus CD3 δε plásmido 4 µg, pistola génica.
Día 14	Refuerzo 1: plásmido pTT5-CD3 δε humano, 4 µg, pistola génica.
Día 21	Sangrado de prueba (15-30 µL de suero/ratón) (TB1)
Día 28	Refuerzo 2: plásmido pTT5-CD3 δε de Cynomolgus 4 µg, pistola génica.

Día 35	Sangrado de prueba (15-30 µL de suero/ratón) (TB2)
Día 42	Refuerzo 3: plásmido pTT5-CD3 δε humano 2 µg + plásmido pTT5-CD3 δε de Cynomolgus 2 µg, pistola génica; Complejo CD3 δε humano 12,5 µg + Complejo CD3 γε humano 12,5 µg + Complejo CD3 δε de Cynomolgus 12,5 µg + Complejo CD3 γε de Cynomolgus 12,5 µg, S.C.
Día 49	Sangrado de prueba (15-30 µL de suero/ratón) (TB3)
Día 56	Refuerzo 4: plásmido pTT5-CD3 δε humano 2 µg + plásmido pTT5-CD3 δε de Cynomolgus 2 µg, pistola génica.
Día 78	Refuerzo 5: plásmido pTT5-CD3 δε humano 2 µg + plásmido pTT5-CD3 δε de Cynomolgus 2 µg, pistola génica; 5 x 10 ⁶ células 293T-hCD3mix + 5 x 10 ⁶ células T CD3 ⁺ de Cynomolgus, I.P..
Día 85	Sangrado de prueba (15-30 µL de suero/ratón) (TB5)
	Análisis de datos y conclusión de fase
Día 92	Pre-fusión (final) Refuerzo: plásmido pTT5-CD3 δε humano 2 µg + plásmido pTT5-CD3 δε de Cynomolgus 2 µg, pistola génica; Complejo CD3 δε humano 12,5 µg + Complejo CD3 γε humano 12,5 µg + Complejo CD3 δε de Cynomolgus 12,5 µg + Complejo CD3 γε de Cynomolgus 12,5 µg, S.C.; 5 x 10 ⁶ células Jurkat + 5 x 10 ⁶ células T CD3 ⁺ de Cynomolgus, I.P..
Los animales no seleccionados para la fusión celular se mantuvieron en jaulas y se les pueden dar inmunizaciones de refuerzo adicionales.	

1.2. Generación y cribado de hibridomas

1.2.1. Fusión y cribado de células

Se realizaron fusiones de esplenocitos en los ratones que respondieron mejor a las inmunizaciones según lo determinado por FACS de sangre de prueba y/o ELISA. El ensayo FACS se realizó en una línea celular 293F, HEK 293T o Jurkat que sobreexpresaba CD3 humano de forma estable. Los linfocitos de bazo y ganglios linfáticos se fusionaron a una línea celular de mieloma de ratón (SP2/0) utilizando un protocolo de electrofusión optimizado. Se realizaron múltiples fusiones para garantizar el éxito del proyecto.

Las fusiones se colocaron en placas (2x10⁴ a 10⁵ células por pocillo) en una pila de placas de 96 pocillos. Las placas se monitorearon para determinar el crecimiento y se

alimentaron semanalmente. Los pocillos con crecimiento celular se cribaron mediante ensayos de cribado primario en 10-14 días con FACS y/u otros ensayos factibles tal como ELISA (con complejo CD3 $\delta\epsilon$ humano marcado con biotina). Se realizaron y cribaron múltiples fusiones para cada antígeno de direccionamiento. Los clones parentales positivos que mostraron unión positiva con células CD3 humanas que sobreexpresan de manera estable (CHO-K1-hCD3mix) HEK293T-hCD3mix, Jurkat-hCD3mix o CHO-K1 y señal ELISA positiva (tal como señal ELISA con complejo CD3 $\delta\epsilon$ humano y complejo CD3 $\gamma\epsilon$ humano) del cribado primario se expandieron en placas de 24 pocillos para el cribado secundario. Se eligieron hibridomas de interés (tal como hibridomas que mostraron una unión basada en células positiva con células Jurkat y 293F-cynoCD3mix) para proceder a la subclonación.

1.2.2. Subclonación, cribado y criopreservación de hibridomas

Los hibridomas parentales con reactividad e isotipos deseados del embudo de selección anterior se subclonaron mediante múltiples rondas de dilución limitante o clasificación de células individuales hasta que se obtuvieron monoclonales.

Las placas de subclonación se examinaron mediante proteína, ELISA basado en células o ensayo de unión basado en células (tal como ensayo de unión basado en células en células CHO-K1-hCD3mix, ensayo ELISA en proteínas del complejo CD3 $\delta\epsilon$ humano y del complejo CD3 $\gamma\epsilon$ humano), y los subclones con buena capacidad de unión se expandieron a 24 pocillos para pruebas de confirmación mediante ensayo de unión basado en células en células HEK293T y HEK293T-hCD3mix, o células Jurkat y 293F-cynoCD3mix.

Las líneas celulares subclonales deseadas se secuenciaron y se expandieron aún más en matraces de cultivo para su criopreservación. Se criopreservaron inicialmente 4-6 viales por línea celular a $0,5-13,0 \times 10^6$ células/vial. Se estableció un banco de células maestro y un banco de células de trabajo para las líneas celulares más valiosas seleccionadas.

Como resultado, se descubrieron 19 anticuerpos con secuencias únicas. Entre los 19 anticuerpos, 12 anticuerpos mostraron una unión positiva con la proteína CD3 humana de sobreexpresión estable de células HEK293T (293T-hCD3mix) pero no se unieron a células HEK293T parentales (como se muestra en la Tabla 12 a continuación), lo que sugiere que estos anticuerpos son anticuerpos humanos que reconocen CD3; los otros 7 anticuerpos mostraron una unión positiva con células Jurkat y 293F-cynoCD3mix pero no se unieron a células Jurkat-KO o 293F parentales (como se muestra en la Tabla 13 a continuación), lo que sugiere que estos anticuerpos son anticuerpos humanos y de cynomolgus que reconocen CD3.

Tabla 12. FACS MFI de anticuerpos que se unen con HEK293T y 293T-hCD3mix

Anticuerpo	FACS MFI (HEK293T)	FACS MFI (HEK293T-hCD3mix)
25-G12-G6-C12	200	38920
16-F2-C11-D9	2070	80290
20-E11-E11-C2	2140	55240
7-D9-G10-H2	4330	50980
31-F8-F5-C5	500	77328
7-D8-G12-E4	1616	65240
40-C12-C10-E9	290	13120
2-F12-A6-G2	880	53840
3-C6-C11-F12	1760	21750
8-B12-F9-B11	160	67080
4-F12-F1-A4	500	16760
3-F3-G12-E2	14080	92740

Tabla 13. MFI de anticuerpos que se unen con células Jurkat, Jurkat-KO, 293F-cynoCD3mix y 293F

Anticuerpo	FACS_MFI (Jurkat)	FACS_MFI (Jurkat-KO)	FACS_MFI (293F-cynoCD3mix)	FACS_MFI (293F)
124E3D6	126	97	400	98
126A11A4	1621	101	2215	101
127E2D3	930	109	1925	102
133B4C7	681	105	1785	100
140D2B10	872	100	2038	98
147C6F3	1857	101	2231	98
147E11E2	2453	104	2526	102

5

Ejemplo 2. Caracterización de anticuerpos

2.1. Anticuerpos

Se caracterizaron los clones de anticuerpo de hibridoma 25-G12-G6-C12, 40-C12-C10-E9, 8-B12-F9-B11, 31-F8-F5-C5, 16-F2-C11-D9, 20-E11-E11-C2, 7-D9-G10-H2, 7-D8-G12-E4, 2-F12-A6-G2, 3-C6-C11-F12, 4-F12-F1-A4, 3-F3-G12-E2, 124E3D6, 126A11A4, 127E2D3, 133B4C7, 140D2B10, 147C6F3 y 147E11E2.

5 **2.2. Secuenciación de hibridomas**

Se aisló el ARN total de las células de hibridoma siguiendo el manual técnico de RNAiso Plus (TAKARA Cat#9109). Luego, el ARN total se transcribió de forma inversa en ADNc utilizando cebadores antisentido específicos de isotipo o cebadores universales siguiendo el manual técnico del Kit de síntesis de ADNc de 1ª cadena PrimeScript II (TAKARA Cat# 6210A). Los fragmentos de anticuerpo de VH y VL se amplificaron de acuerdo con TaKaRa Taq™ (Cat#R001A). Los fragmentos de anticuerpo amplificados se clonaron en un vector de clonación estándar por separado. Se realizó PCR de colonias para detectar clones con insertos de tamaños correctos. Se secuenciaron no menos de cinco colonias con insertos de tamaños correctos para cada fragmento. Se alinearon las secuencias de diferentes clones y se proporcionó la secuencia de consenso de estos clones.

Las secuencias de región variable de los anticuerpos de hibridoma se proporcionan en la presente en la Tabla 3 anterior.

20 **2.3. Caracterización de anticuerpos 25-G12-G6-C12, 40-C12-C10-E9, 8-B12-F9-B11, 31-F8-F5-C5, 16-F2-C11-D9, 20-E11-E11-C2, 7-D9-G10-H2, 7-D8-G12-E4, 2-F12-A6-G2, 3-C6-C11-F12, 4-F12-F1-A4 y 3-F3-G12-E2**

La capacidad de activación de células T de estos anticuerpos se determinó mediante el ensayo de activación de Jurkat NFAT-Luciferasa. Se utilizó OKT3 como control positivo. El protocolo para el análisis de activación se describe de la siguiente manera:

Se recubrieron anticuerpos de ratón en placas de 96 pocillos a 37°C durante 1 hora, 50 µg/mL y 100 µl por pocillo;

Se sembraron células Jurkat-NFAT-Luciferasa en cada pocillo durante 24 horas, 2x10⁴ células por pocillo;

Se agregaron 20 µL de Bright-Glo a cada pocillo, el valor de luciferasa se leyó con un lector de microplacas.

30 Los resultados se muestran en la Tabla 14 a continuación. Como se muestra en la

Tabla 14, la capacidad de activación de estos anticuerpos de ratón fue mayor que el control positivo OKT3.

Tabla 14. Activación de Jurkat-NFAT-luciferasa con anticuerpos de ratón

Placa 1			
Número	Nombre	RLU	
1	OKT3	5626	5711
2	Control de isotipo	564	582
3	16-F2-C11-D9	941	789
4	20-E11-E11-C2	748	710
5	7-D9-G10-H2	772	712
6	40-C12-C10-E9	1101	1057
7	2-F12-A6-G2	786	688
8	4-F12-F1-A4	1504	1557
Placa 2			
Número	Nombre	RLU	
1	OKT3	2594	2520
2	Control de isotipo	386	380
3	25-G12-G6-C12	1503	1211
4	31-F8-F5-C5	606	722
5	7-D8-G12-E4	395	378
6	3-C6-C11-F12	509	513
Placa 3			
Número	Nombre	RLU	
1	OKT3	1131	1045
2	Control de isotipo	237	231
3	8-B12-F9-B11	1039	1144

5 Ejemplo 3. Generación y caracterización de anticuerpos quiméricos

3.1. Generación de anticuerpos quiméricos

Se seleccionaron secuencias de 16 anticuerpos de hibridoma (25-G12-G6-C12, 4-F12-F1-A4, 7-D8-G12-E4, 20-E11-E11-C2, 7-D9-G10-H2, 40-C12-C10-E9, 31-F8-F5-C5, 8-B12-

F9-B11, 3-F3-G12-E2, 133B4C7, 124E3D6, 147E11E2, 126A11A4, 147C6F3, 127E2D3 y 140D2B10) para generar y producir anticuerpos quiméricos IgG1 humanos. Se sintetizaron ADN que codifican para regiones variables de los 16 anticuerpos de hibridoma y se subclonaron en un vector de expresión donde se incluyó de antemano el gen constante de IgG humana. Los vectores se transfectaron en células de mamífero para la expresión de proteínas recombinantes y el anticuerpo expresado se purificó utilizando una columna de cromatografía de afinidad de proteína A. Los anticuerpos quiméricos resultantes se denominan en la presente ch25-G12-G6-C12, ch4-F12-F1-A4, ch7-D8-G12-E4, ch20-E11-E11-C2, ch7-D9-G10-H2, ch40-C12-C10-E9, ch31-F8-F5-C5, ch8-B12-F9-B11, ch3-F3-G12-E2, ch133B4C7, ch124E3D6, ch147E11E2, ch126A11A4, ch147C6F3, ch127E2D3, ch140D2B10, donde el prefijo "ch" indica "quimérico", y lo siguiente indica el clon de anticuerpo de hibridoma. Por ejemplo, ch25-G12-G6-C12 indica que es un anticuerpo quimérico del anticuerpo de hibridoma 25-G12-G6-C12.

3.2. Ensayos de capacidad de activación de células T de ch124E3D6, ch126A11A4, ch127E2D3, ch133B4C7, ch140D2B10, ch147C6F3 y ch147E11E2

Las capacidades de activación de células T de los anticuerpos quiméricos ch124E3D6, ch126A11A4, ch127E2D3, ch133B4C7, ch140D2B10, ch147C6F3 y ch147E11E2 se determinaron mediante el ensayo de activación de Jurkat NFAT-Luciferasa. Se utilizaron BMK-B219 (un anticuerpo anti-CD3 desarrollado por JNJ) y BMK-TCB (un anticuerpo anti-CD3 desarrollado por Roche) como controles positivos y se utilizó el isotipo hIgG1 como control negativo. El protocolo para el análisis de activación se describe de la siguiente manera:

Se recubrieron anticuerpos de prueba diluidos en serie en una placa de 96 pocillos a 37°C durante 2 horas, 100 µl por pocillo;

Se sembraron células Jurkat-NFAT-Luciferasa en cada pocillo y se incubaron durante 24 horas, 2x10⁴ células por pocillo;

Los sobrenadantes se retiraron y las células se lisaron con reactivo de lisis (Promega, RLB-E3971) a 25 µL por pocillo;

Las muestras se crioconservaron durante 30 minutos a -80° C y luego se calentaron durante 15 minutos a 37° C en una incubadora bioquímica;

La placa de 96 pocillos se centrifugó durante 10 minutos a 500xg y 20 µL de sobrenadante de cada pocillo se transfirió a una nueva placa de 96 pocillos opaca de color

blanco;

Se agregaron 100 µL por pocillo de sustrato de ensayo de luciferasa (Promega, E4530) a la placa de 96 pocillos;

El lector de microplacas se utilizó para determinar las unidades de luminiscencia relativa (RLU) que reflejan el nivel de actividad de luciferasa.

Los resultados se muestran en la Figura 1 y Tabla 15 a continuación. Como se muestra en la Figura 1 y la Tabla 15, la capacidad de activación de los anticuerpos seleccionados fue mayor o comparable con dos anticuerpos de referencia.

Tabla 15. Activación de Jurkat-NFAT-luciferasa con anticuerpos quiméricos

Clasificación	Anticuerpo	EC ₅₀ (nM)	Señal superior
1	ch133B4C7	27,97	290
2	ch124E3D6	32,38	482,3
3	ch147E11E2	32,99	420,8
4	ch126A11A4	33,56	681,7
5	ch147C6F3	57,36	427,8
6	BMK-TCB	59,35	752,6
7	ch127E2D3	61,68	336,6
8	BMK-B219	68,37	811,3

3.3. Afinidad de unión basada en células a células Jurkat

La afinidad de unión de los anticuerpos quiméricos producidos y los anticuerpos de referencia (OKT3, BMK-B219 o BMK-TCB) con la línea celular de cáncer de linfocito derivado de paciente humano Jurkat, se determinó mediante análisis FACS, y el isotipo hIgG1 se utilizó como control negativo. El protocolo para el análisis FACS se describe de la siguiente manera:

Las células Jurkat se recolectaron y se resuspendieron con amortiguador FACS;

Se contaron las células y la concentración se ajustó a 4×10^6 células/ml. Se agregaron 50 µl/pocillo de suspensión de células a placas de 96 pocillos;

Se agregaron 50 µl/pocillo de anticuerpos de prueba diluidos en serie 2x a las placas.

Las placas se incubaron a 4 °C durante 1 hora;

Las placas se centrifugaron a 300 g durante 3 minutos y se descartó el sobrenadante;

Las células se lavaron en 200 µl de amortiguador FASC dos veces y se repitió el paso (d);

5 Se agregaron 100 µl/pocillo de anticuerpo secundario Acp de cabra a IgG-PE humana o Acp de cabra a IgG-PE de ratón a las placas. Las placas se incubaron a 4 °C durante 30 minutos;

Las placas se centrifugaron a 300 g durante 3 minutos y se descartó el sobrenadante;

10 Las células se lavaron en 200 µl de amortiguador FASC dos veces y se repitió el paso (g);

Las células se resuspendieron con 150 µl de amortiguador FASC y se probaron en FACS.

Como se muestra en la Figura 2 y la Tabla 16 a continuación, los anticuerpos quiméricos ch31-F8-F5-C5, ch25-G12-G6-C12, ch40-C12-C10-E9 y ch8-B12-F9-B11, así como el anticuerpo de referencia OKT3 tenían afinidad de unión positiva a células Jurkat. Como se muestra en la Figura 3 y la Tabla 17 a continuación, la afinidad de unión de los anticuerpos quiméricos ch147E11E2, ch126A11A4 y ch147C6F3 en células Jurkat fue mayor o comparable con dos anticuerpos de referencia BMK-B219 y BMK-TCB.

Tabla 16. Afinidad de unión de anticuerpos quiméricos seleccionados a células Jurkat.

Clasificación	Anticuerpo	EC ₅₀ (nM)	Señal FACS superior
1	OKT3	0,22	3124
2	ch31-F8-F5-C5	0,74	2540
3	ch25-G12-G6-C12	0,84	2790
4	ch40-C12-C10-E9	1,01	2545
5	ch8-B12-F9-B11	17,99	2721

Tabla 17. Afinidad de unión de anticuerpos quiméricos seleccionados a células Jurkat.

Clasificación	Anticuerpo	EC ₅₀ (nM)	Señal superior
1	ch147E11E2	0,4192	2777
2	ch126A11A4	0,5668	1764
3	BMK-B219	1,47	3001
4	ch147C6F3	1,774	2282
5	BMK-TCB	1,912	3145

3.4. Afinidad de unión basada en células a células 293T-cynoCD3mix

La afinidad de unión de anticuerpos quiméricos seleccionados y anticuerpos de referencia en células CD3 de cynomolgus (293T-cynoCD3mix) que sobreexpresan HEK 293T de manera estable se determinó mediante análisis FACS. Se utilizaron BMK-B219 y BMK-TCB como controles positivos y se utilizó el isotipo hIgG1 como control negativo. El protocolo para el análisis FACS se describe de la siguiente manera:

(a) Se recolectaron células 293T-cynoCD3mix y se resuspendieron con amortiguador FACS;

(b) Se contaron las células y la concentración se ajustó a 4×10^6 células/ml. Se agregaron 50 µl/pocillo de suspensión de células a una placa de 96 pocillos;

(c) Se agregaron 50 µl/pocillo de anticuerpos de prueba diluidos en serie 2x a la placa y se incubaron a 4°C durante 1 hora;

(d) La placa se centrifugó a 300 g durante 3 minutos y el sobrenadante se descartó;

(e) Las células se lavaron en 200 µl de amortiguador FACS dos veces y se repitió el paso (d);

(f) Se agregaron 100 µl/pocillo de anticuerpo secundario pAb de cabra a IgG-PE humana (Abcam, ab98596) a la placa y se incubaron a 4°C durante 30 minutos;

(g) La placa se centrifugó a 300 g durante 3 minutos y el sobrenadante se descartó;

(h) Las células se lavaron en 200 µl de amortiguador FACS dos veces y se repitió el paso (g);

(i) Las células se resuspendieron con 150 µl de amortiguador FACS y se probaron

en FACS.

Como se muestra en la Figura 4 y la Tabla 18 a continuación, la afinidad de unión de los anticuerpos quiméricos seleccionados en células 293T-cynoCD3mix fue mayor que la de dos anticuerpos de referencia.

5 **Tabla 18. Afinidad de unión a células 293T-cynoCD3mix.**

Clasificación	Anticuerpo	EC ₅₀ (nM)	Señal superior
1	ch147E11E2	2,19	53876
2	ch127E2D3	2,33	46947
3	ch124E3D6	2,64	45795
4	ch140D2B10	2,81	52929
5	ch133B4C7	2,81	45246
6	ch126A11A4	2,91	57049
7	ch147C6F3	4,15	55201
8	BMK-B219	4,34	60013
9	BMK-TCB	4,72	60397

3.5. Ensayo de activación de Jurkat-NFAT-Luciferasa

10 El ensayo de activación de Jurkat-NFAT-Luciferasa de varios anticuerpos quiméricos seleccionados y anticuerpo de referencia (OKT3) con la línea celular de cáncer de linfocito derivado de paciente humano Jurkat, se realizó de la siguiente manera.

(a) Se recubrieron placas con 50 µl por pocillo de anticuerpos de prueba diluidos en serie a 37°C durante 2 horas;

(b) Se recolectaron células Jurkat-NFAT-Luc y se resuspendieron con medio 1640 (FBS al 10%, P/S al 1%);

15 (c) Se contaron las células y la concentración se ajustó a 2×10^5 células/ml. Se sembraron 100 µl/pocillo de suspensión de células en una placa de cultivo celular de 96 pocillos. Se agregaron 100 µl de medio como control negativo;

(d) La placa de células se devolvió a una incubadora de CO₂ al 5% a 37°C durante 24 horas;

(e) Centrifugado a 500 g durante 10 min y se descartó el sobrenadante;

(f) Las células se lavaron en PBS una vez y se repitió el paso (e);

(g) Se agregaron 30 µl/pocillo de amortiguador de lisis 1x, la placa se colocó en un congelador de -80 °C durante 30 min y luego se movió a una incubadora de 37°C durante 15 min;

(h) Centrifugar a 500 g durante 10 min y se transfirieron 20 µl de sobrenadante a otra placa de 96 pocillos (Coring 3903). Se agregaron 100 µl/pocillo de sustrato de ensayo de luciferasa y se mezclaron suavemente;

(i) Leer la placa en el lector de microplacas para ver la señal de luminiscencia (RLU).

10 Como se muestra en la Figura 5 y la Tabla 19 a continuación, la capacidad de activación de los anticuerpos quiméricos seleccionados fue mayor o comparable con el anticuerpo de referencia OKT3.

Tabla 19. Capacidad de activación de los anticuerpos quiméricos en células Jurkat-NFAT-Luc.

Clasificación	Anticuerpo	EC ₅₀ (nM)	Señal FACS superior
1	ch25-G12-G6-C12	1,674	249,8
2	ch31-F8-F5-C5	3,83	253,2
3	OKT3	10,12	363,7
4	ch8-B12-F9-B11	11,27	457,2
5	ch40-C12-C10-E9	24,17	810,2

15

3.6. Ensayo de activación de PBMC

3.6.1 Experimento 1

20 Se utilizó un ensayo primario basado en células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) para determinar la capacidad de activación de varios anticuerpos quiméricos seleccionados para células T. El ensayo de activación de PBMC de los anticuerpos quiméricos seleccionados y el anticuerpo de referencia (OKT3) con PBMC se realizó de la siguiente manera.

(a) Se recubrieron placas con 50 µl/pocillo de anticuerpos de prueba diluidos en serie a 37°C durante 2 horas;

(b) Se descartaron las soluciones de anticuerpos y los pocillos de la placa se lavaron con 200 µl de PBS por una vez;

5 (c) Se aislaron las PBMC y se resuspendieron con medio 1640 (FBS al 10%, P/S al 1%);

(d) Se contaron las células y la concentración se ajustó a 1×10^6 células/ml. Se sembraron 200 µl/pocillo de suspensión de células en una placa de cultivo celular de 96 pocillos. Se agregaron 200 µl de medio como control negativo;

10 (e) Las placas de células se devolvieron a una incubadora de CO₂ al 5% a 37°C durante 120 horas;

(f) Se centrifugaron a 400 g durante 5 min y se recogió el sobrenadante para detectar la liberación de citocinas IL-2 e IFN γ mediante ensayo ELISA.

El ensayo ELISA se realizó de la siguiente manera.

15 (a) Se adicionó 100 µl de Ab de captura diluido a cada pocillo. Se incubó durante la noche a 4° C;

(b) Se aspiró y lavó 3 veces;

(c) Placas de bloqueo: 200 µl de diluyente de ensayo en cada pocillo. Se incubó por 1 hora a TA;

20 (d) Se aspiró y lavó 3 veces;

(e) Se agregó 100 µl de estándar o muestra a cada pocillo. Se incubó por 2 horas a TA;

(f) Se aspiró y lavó 5 veces;

(g) Se añadió 100 µl de detector de trabajo (Ab de detección + SAV-HRP) a cada pocillo.
25 Se incubó por 1 hora a TA;

(h) Se aspiró y lavó 7 veces (con remojos de 30 segundos a 1 minuto);

(i) Se agregó 100 µl de Solución de Sustrato a cada pocillo. Se incubó por 30 min a TA en la oscuridad;

(j) Se agregó 50 µl de solución de parada a cada pocillo;

(k) Se leyó a 450 nm en 30 min.

5 Los resultados de la liberación de IL-2 e IFN γ se muestran en la Figura 6 y la Figura 7, respectivamente. Como se muestra en la Figura 6, los anticuerpos quiméricos seleccionados ch25-G12-G6-C12, ch40-C12-C10-E9, ch31-F8-F5-C5 y ch8-B12-F9-B11, así como el anticuerpo de referencia OKT3 indujeron significativamente la liberación de IL-2. Como se muestra en la Figura 7, los anticuerpos quiméricos seleccionados ch25-G12-G6-C12, ch40-
10 C12-C10-E9, ch31-F8-F5-C5, ch8-B12-F9-B11, así como el anticuerpo de referencia OKT3 aumentaron significativamente la liberación de IFN γ , y la capacidad de activación de PBMC de los anticuerpos quiméricos seleccionados fue mayor o al menos comparable con el anticuerpo de referencia OKT3.

3.6.2. Experimento 2

15 Se utilizó un ensayo primario basado en células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) para determinar la capacidad de activación de varios otros anticuerpos quiméricos seleccionados para células T. Es bien sabido que cuando se activan las células T, la expresión de la proteína de superficie CD25 está regulado de forma positiva. Se utilizaron BMK-B219 y BMK-TCB como controles positivos y se utilizó el isotipo hIgG1 como control
20 negativo. El protocolo para el análisis de activación se describe de la siguiente manera:

(a) Se recubrieron 100 µl por pocillo de anticuerpos de prueba de 10 µg/ml en una placa de 96 pocillos a 37 °C durante 2 horas;

(b) Se sembraron 2x10⁵ células por pocillo. Se sembraron PBMC humanas frescas en cada pocillo y se incubaron durante 3 días;

25 (j) Las células se recolectaron y transfirieron a una nueva placa de 96 pocillos. La placa se centrifugó a 400 g durante 3 minutos y el sobrenadante se descartó;

(c) Las células se resuspendieron en 100 µl de amortiguador FASC que contenía anticuerpo conjugado anti-CD25 Alexa Fluor 488 humano (R&D, FAB9926G) y anticuerpo conjugado anti-CD3 Brillante Violeta 421 humano (Biolegend, 317344);

(d) La placa se incubó a 4°C durante 30 minutos;

(e) La placa se centrifugó a 400 g durante 3 minutos y el sobrenadante se descartó;

(f) Las células se lavaron en 200 µl de amortiguador FASC dos veces y se repitió el paso (d);

5 (g) Las células se resuspendieron con 150 µl de amortiguador FASC y se probaron en FACS.

Como se muestra en la Figura 8, los controles positivos BMK-B219 y BMK-TCB indujeron la regulación positiva de CD25 en células T humanas como lo indica la tasa de subconjuntos de células CD25⁺ en las células T CD3⁺. Entre los anticuerpos quiméricos, varios
10 (a saber, ch124E3D6, ch126A11A4, ch140D2B10, ch147C6F3 y ch147E11E2) indujeron la expresión de CD25 en un grado más débil que los controles positivos. Los anticuerpos quiméricos ch127E2D3 y ch133B4C7 no indujeron significativamente la regulación positiva de CD25.

15 **Ejemplo 4. Anticuerpo humanizado de 40-C12-C10-E9: Generación, maduración de afinidad y caracterización de anticuerpos**

4.1 Generación de anticuerpos humanizados

Se seleccionó el anticuerpo quimérico ch40-C12-C10-E9 como clon para la humanización. Las secuencias de anticuerpos se alinearon con secuencias de línea germinal humana para identificar el modelo de mejor ajuste. Las secuencias de línea germinal humana
20 mejor emparejadas se seleccionaron como plantillas para la humanización con base en la homología con las secuencias originales de anticuerpos de ratón. En general, la humanización de un anticuerpo se realizó comparando la base de datos de genes de cepa variable de cadena pesada y ligera de anticuerpo humano IMGT (<https://www.imgt.org>), se seleccionaron genes de cepa variable de cadena pesada y cadena ligera con alta homología con anticuerpo
25 derivado de murino como plantillas, y se trasplantaron CDR de anticuerpo derivado de murino en plantillas humanas correspondientes. Se formó una secuencia de región variable con el orden FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Según sea necesario, los aminoácidos clave en la secuencia del esqueleto se reversionaron y mutaron a los correspondientes a anticuerpos murinos para garantizar la afinidad original.

30 Se obtuvo un total de 12 anticuerpos humanizados para ch40-C12-C10-E9 mezclando

y emparejando 3 variantes de regiones variables de cadena ligera humanizadas (*es decir*, hu40E9-L1, hu40E9-L2 y hu40E9-L3) y 4 variantes de regiones variables de cadena pesada humanizadas (*es decir*, hu40E9-H1, hu40E9-H2, hu40E9-H3 y hu40E9-H4). Los 12 anticuerpos humanizados se designaron como hu40E9-L1H1, hu40E9-L2H1, etc., como se muestra en la Tabla 25 a continuación, de la misma manera. Se evaluaron el riesgo de inmunogenicidad y el punto de acceso en estos anticuerpos humanizados producidos, y no se identificó ningún riesgo de inmunogenicidad o punto de acceso.

Tabla 25. Regiones variables de cadena pesada y ligera de anticuerpos humanizados de ejemplo para ch40-C12-C10-E9

Región VL Región VH	hu40E9-L1 (SEQ ID NO: 168)	hu40E9-L2 (SEQ ID NO: 169)	hu40E9-L3 (SEQ ID NO: 170)
hu40E9-H1 (SEQ ID NO: 163)	hu40E9-L1H1 (SEQ ID NO: 168/163)	hu40E9-L2H1 (SEQ ID NO: 169/163)	hu40E9-L3H1 (SEQ ID NO: 170/163)
hu40E9-H2 (SEQ ID NO: 164)	hu40E9-L1H2 (SEQ ID NO: 168/164)	hu40E9-L2H2 (SEQ ID NO: 169/164)	hu40E9-L3H2 (SEQ ID NO: 170/164)
hu40E9-H3 (SEQ ID NO: 165)	hu40E9-L1H3 (SEQ ID NO: 168/165)	hu40E9-L2H3 (SEQ ID NO: 169/165)	hu40E9-L3H3 (SEQ ID NO: 170/165)
hu40E9-H4 (SEQ ID NO: 166)	hu40E9-L1H4 (SEQ ID NO: 168/166)	hu40E9-L2H4 (SEQ ID NO: 169/166)	hu40E9-L3H4 (SEQ ID NO: 170/166)

4.2 Maduración por afinidad

La variante hu40E9-L2 (*es decir*, SEQ ID NO: 169) y variante hu40E9-H3 (*es decir*, SEQ ID NO: 165) obtenido en el Ejemplo 4.1 para llevar a cabo la maduración de afinidad. En particular, las posiciones 31~33 (con respecto a la SEQ ID NO: 165) en CDR1 de la SEQ ID NO: 165, posiciones 54, 55 y 56 (con respecto a la SEQ ID NO: 165) en CDR2 de la SEQ ID NO: 165, posiciones 99~106 (relativa a la SEQ ID NO: 165) en CDR3 de la SEQ ID NO: 165, y las posiciones 91, 92 y 93 (con respecto a la SEQ ID NO: 169) en CDR3 de la SEQ ID NO: 169 fueron seleccionados para modificación de afinidad. Se obtuvo un total de 20 mutaciones

después de considerar varios factores, a saber, S31D, V33Y, N55S, D99E, Y101F, D105E, G106A, Y54G, D56G, D99R, D99G, S100R, S100D, S100G, Y102S o D105R en la región variable de cadena pesada como se establece en la SEQ ID NO: 165; o N93S, S91R, N93R o N93W en la región variable de cadena ligera como se establece en la SEQ ID NO: 169.

Por consiguiente, se obtuvieron un total de 34 clones de anticuerpos humanizados y madurados por afinidad para ch40-C12-C10-E9, mezclando y emparejando 24 variantes de regiones variables de cadena pesada de ch40-C12-C10-E9 humanizadas (*es decir*, hu40E9-H3-N55S.H, hu40E9-H3-D99E.H, hu40E9-H3-Y101F.H, hu40E9-H3-D105E.H, hu40E9-H3-G106A.H, hu40E9-H3-Y54G.H, hu40E9-H3-D56G.H, hu40E9-H3-D99R.H, hu40E9-H3-S100R.H, hu40E9-H3-Y102S.H, hu40E9-H3-D105R.H, hu40E9-H5, hu40E9-H6, hu40E9-H7, hu40E9-H8, hu40E9-H9, hu40E9-H10, hu40E9-H11, hu40E9-H12, hu40E9-H13, hu40E9-H14, hu40E9-H15, hu40E9-H16 y hu40E9-H17) y 7 variantes de regiones variables de cadena ligera de ch40-C12-C10-E9 humanizadas (*es decir*, hu40E2-NL93, hu40E9-LLR. Los 34 clones de anticuerpos humanizados se designaron como hu40E9-L2H3-N55S.H, hu40E9-L2H3-N93S.L, hu40E9-L2H5, etc., como se muestra en la Tabla 26, Tabla 27, Tabla 32~34 a continuación, donde el prefijo "hu" indica "humanizado", y el sufijo "L2H3-N55S.H", por ejemplo, denota el número de serie del clon de anticuerpo humanizado de ch40-C12-C10-E9, que tiene la región variable variante hu40E9-L2 y la región variable variante hu40E9-H3-N55S.H. Para otro ejemplo, el anticuerpo humanizado hu40E9-L2H3-N93S.L denota el número de serie del clon de anticuerpo humanizado de ch40-C12-C10-E9, que tiene la región variable variante hu40E9-L2-N93S.L y la región variable variante hu40E9-H3. Para otro ejemplo más, el anticuerpo humanizado hu40E9-L2H5 denota el número de serie del clon de anticuerpo humanizado de ch40-C12-C10-E9, que tiene la región variable variante hu40E9-L2 y la región variable variante hu40E9-H5.

Tabla 26. Regiones variables de cadena pesada y ligera de anticuerpos humanizados de ejemplo para ch40-C12-C10-E9

Región VL Región VH	hu40E9-L2 (SEQ ID NO: 169)
hu40E9-H3-N55S.H (SEQ ID NO: 186)	hu40E9-L2H3-N55S.H (SEQ ID NO: 169/186)
hu40E9-H3-D99E.H (SEQ ID NO: 187)	hu40E9-L2H3-D99E.H (SEQ ID NO: 169/187)

hu40E9-H3-Y101F.H (SEQ ID NO: 188)	hu40E9-L2H3-Y101F.H (SEQ ID NO: 169/188)
hu40E9-H3-D105E.H (SEQ ID NO: 189)	hu40E9-L2H3-D105E.H (SEQ ID NO: 169/189)
hu40E9-H3-G106A.H (SEQ ID NO: 190)	hu40E9-L2H3-G106A.H (SEQ ID NO: 169/190)
hu40E9-H3-Y54G.H (SEQ ID NO: 191)	hu40E9-L2H3-Y54G.H (SEQ ID NO: 169/191)
hu40E9-H3-D56G.H (SEQ ID NO: 192)	hu40E9-L2H3-D56G.H (SEQ ID NO: 169/192)
hu40E9-H3-D99R.H (SEQ ID NO: 193)	hu40E9-L2H3-D99R.H (SEQ ID NO: 169/193)
hu40E9-H3-S100R.H (SEQ ID NO: 194)	hu40E9-L2H3-S100R.H (SEQ ID NO: 169/194)
hu40E9-H3-Y102S.H (SEQ ID NO: 195)	hu40E9-L2H3-Y102S.H (SEQ ID NO: 169/195)
hu40E9-H3-D105R.H (SEQ ID NO: 196)	hu40E9-L2H3-D105R.H (SEQ ID NO: 169/196)

Tabla 27. Regiones variables de cadena pesada y ligera de anticuerpos humanizados de ejemplo para ch40-C12-C10-E9

Región VH Región VL	hu40E9-H3 (SEQ ID NO: 165)
hu40E9-L2-N93S.L (SEQ ID NO: 197)	hu40E9-L2H3-N93S.L (SEQ ID NO: 197/165)
hu40E9-L2-S91R.L (SEQ ID NO: 198)	hu40E9-L2H3-S91R.L (SEQ ID NO: 198/165)
hu40E9-L2-N93R.L (SEQ ID NO: 199)	hu40E9-L2H3-N93R.L (SEQ ID NO: 199/165)
hu40E9-L2-N93W.L (SEQ ID NO: 200)	hu40E9-L2H3-N93W.L (SEQ ID NO: 200/165)

Tabla 32. Regiones variables de cadena pesada y ligera de anticuerpos humanizados de ejemplo para ch40-C12-C10-E9

Región VL Región VH	hu40E9-L2 (SEQ ID NO: 169)
hu40E9-H5 (SEQ ID NO: 233)	hu40E9-L2H5 (SEQ ID NO: 169/233)
hu40E9-H6 (SEQ ID NO: 234)	hu40E9-L2H6 (SEQ ID NO: 169/234)
hu40E9-H7 (SEQ ID NO: 235)	hu40E9-L2H7 (SEQ ID NO: 169/235)
hu40E9-H8 (SEQ ID NO: 236)	hu40E9-L2H8 (SEQ ID NO: 169/236)
hu40E9-H9 (SEQ ID NO: 237)	hu40E9-L2H9 (SEQ ID NO: 169/237)
hu40E9-H10 (SEQ ID NO: 238)	hu40E9-L2H10 (SEQ ID NO: 169/238)
hu40E9-H11 (SEQ ID NO: 239)	hu40E9-L2H11 (SEQ ID NO: 169/239)
hu40E9-H12 (SEQ ID NO: 240)	hu40E9-L2H12 (SEQ ID NO: 169/240)
hu40E9-H13 (SEQ ID NO: 241)	hu40E9-L2H13 (SEQ ID NO: 169/241)
hu40E9-H14 (SEQ ID NO: 242)	hu40E9-L2H14 (SEQ ID NO: 169/242)
hu40E9-H15 (SEQ ID NO: 243)	hu40E9-L2H15 (SEQ ID NO: 169/243)
hu40E9-H16 (SEQ ID NO: 244)	hu40E9-L2H16 (SEQ ID NO: 169/244)

Tabla 33. Regiones variables de cadena pesada y ligera de anticuerpos humanizados de ejemplo para ch40-C12-C10-E9

Región VH Región VL	hu40E9-H3 (SEQ ID NO: 165)
hu40E9-L4 (SEQ ID NO: 230)	hu40E9-L4H3 (SEQ ID NO: 230/165)
hu40E9-L5 (SEQ ID NO: 231)	hu40E9-L5H3 (SEQ ID NO: 231/165)
hu40E9-L6 (SEQ ID NO: 232)	hu40E9-L6H3 (SEQ ID NO: 232/165)

Tabla 34. Regiones variables de cadena pesada y ligera de anticuerpos humanizados de ejemplo para ch40-C12-C10-E9

Región VH Región VL	hu40E9-H7 (SEQ ID NO: 235)	hu40E9-H8 (SEQ ID NO: 236)
---	-------------------------------	-------------------------------

Región VL		
hu40E9-L4 (SEQ ID NO: 230)	hu40E9-L4H7 (SEQ ID NO: 230/235)	hu40E9-L4H8 (SEQ ID NO: 230/236)
hu40E9-L5 (SEQ ID NO: 231)	hu40E9-L5H7 (SEQ ID NO: 231/235)	hu40E9-L5H8 (SEQ ID NO: 231/236)

4.3 Afinidad de unión basada en células a células Jurkat

La afinidad de unión de los anticuerpos 40-C12-C10-E9 humanizados generados y los anticuerpos madurados por afinidad basados en 40E9-L2H3 en la línea celular de cáncer de linfocito derivado de paciente humano Jurkat se determinó mediante análisis FACS. El anticuerpo de referencia BMK-TCB se utilizó como control positivo y el isotipo hIgG1 se utilizó como control negativo. El protocolo para el análisis FACS se describe en el Ejemplo 3.3, excepto que los anticuerpos de prueba utilizados en el paso (c) fueron diferentes.

Como se muestra en la Figura 9A, la Figura 9B y la Tabla 23 a continuación, la afinidad de unión de los anticuerpos 40-C12-C10-E9 humanizados y/o madurados por afinidad producidos a células Jurkat fue mayor o comparable con el anticuerpo de referencia BMK-TCB. Como se muestra en la Figura 16A, la Figura 16B y la Tabla 35 a continuación, los anticuerpos 40-C12-C10-E9 humanizados y/o madurados por afinidad seleccionados fueron capaces de unirse a células Jurkat.

Tabla 23. Afinidad de unión de anticuerpos humanizados seleccionados a células Jurkat.

Clasificación	Anticuerpo	EC ₅₀ (nM)	Señal FACS superior
1	hu40E9-L2H3-D99E.H	0,31	957
2	hu40E9-L2H3-S91R.L	0,32	1358
3	hu40E9-L2H3-D56G.H	0,32	1452
4	ch40-C12-C10-E9	0,45	1621
5	hu40E9-L2H3-Y102S.H	0,47	1165
6	hu40E9-L3H4	0,49	1365
7	hu40E9-L2H3-N93W.L	0,51	1210
8	hu40E9-L2H3-Y54G.H	0,51	1186
9	hu40E9-L2H3-N55S.H	0,51	1165
10	hu40E9-L3H2	0,52	1412

11	hu40E9-L2H3-D105R.H	0,56	1479
12	hu40E9-L2H3-N93S.L	0,60	1355
13	hu40E9-L2H3-N93R.L	0,63	1417
14	hu40E9-L2H3-Y101F.H	0,64	1187
15	hu40E9-L2H3	0,65	1578
16	hu40E9-L2H1	0,73	892
17	hu40E9-L3H1	0,75	1250
18	hu40E9-L2H2	0,81	1573
19	hu40E9-L2H4	0,86	1571
20	hu40E9-L2H3-D105E.H	1,16	1409
21	BMK-TCB	1,60	1739
22	hu40E9-L2H3-G106A.H	2,39	771

Tabla 35. Afinidad de unión de anticuerpos humanizados seleccionados a células Jurkat.

Clasificación	Anticuerpo	EC ₅₀ (nM)	Señal FACS superior
1	hu40E9-L2H5	0,36	1915
2	ch40-C12-C10-E9	0,41	2937
3	hu40E9-L2H14	0,43	2019
4	hu40E9-L5H7	0,48	1851
5	hu40E9-L2H9	0,56	1764
6	hu40E9-L2H7	0,66	2377
7	hu40E9-L5H3	0,66	2489
8	hu40E9-L6H3	0,80	1993
9	hu40E9-L2H16	1,27	2006
10	BMK-TCB	1,30	2574
11	hu40E9-L4H7	1,52	1903
12	hu40E9-L4H3	1,59	2491
13	hu40E9-L2H10	2,55	1682
14	hu40E9-L2H6	4,17	1255
15	hu40E9-L2H11	5,00	2001
16	hu40E9-L5H8	25,44	531
17	hu40E9-L4H8	26,92	255

18	hu40E9-L2H8	27,99	1237
19	hu40E9-L2H15	51,69	796
20	hu40E9-L2H12	72,92	850
21	hu40E9-L2H13	83,69	2051

4.4 Ensayo de activación de Jurkat-NFAT-Luciferasa

La capacidad de activación de células T de estos anticuerpos se determinó mediante el ensayo de activación de Jurkat NFAT-Luciferasa. El anticuerpo de referencia BMK-TCB se utilizó como control positivo y el isotipo hlgG1 se utilizó como control negativo. El protocolo para el análisis de activación se describe de la siguiente manera.

a) Se recubrieron anticuerpos de prueba diluidos en serie en una placa de 96 pocillos a 37°C durante 2 horas, 100 µl por pocillo.

b) Se sembraron células Jurkat-NFAT-Luciferasa en cada pocillo y se incubaron durante 24 horas, 2x10⁴ células por pocillo.

c) Los sobrenadantes se retiraron y las células se lisaron con reactivo de lisis (Promega, RLB-E3971) a 25 µL por pocillo.

d) Las muestras se crioconservaron durante 30 minutos a -80° C y luego se calentaron durante 15 minutos a 37° C en una incubadora bioquímica.

e) La placa de 96 pocillos se centrifugó durante 10 minutos a 500xg y 20 µL de sobrenadante de cada pocillo se transfirió a una nueva placa de 96 pocillos opaca de color blanco.

f) Se agregaron 100 µL por pocillo de sustrato de ensayo de luciferasa (Promega, E4530) a la placa de 96 pocillos.

g) El lector de microplacas se utilizó para determinar las unidades de luminiscencia relativa (RLU) que reflejan el nivel de actividad de luciferasa.

Los valores de la EC₅₀ activada y la señal superior se normalizaron de acuerdo con ch40-C12-C10-E9 en la misma placa y los valores del anticuerpo de referencia BMK-TCB se mostraron como media. Como se muestra en las Figuras 10A~F y la Tabla 24 a continuación, la capacidad de activación de anticuerpos humanizados y/o madurados por afinidad

seleccionados fue mayor o comparable con el anticuerpo de referencia BMK-TCB. Como se muestra en las Figuras 17A~E y la Tabla 36 a continuación, los anticuerpos humanizados y/o madurados por afinidad seleccionados tenían capacidad de activación en células Jurkat-NFAT-Luciferasa, lo que significa que tenían capacidad de activación de células T.

5 **Tabla 24. Capacidad de activación de los anticuerpos humanizados en células Jurkat-NFAT-luciferasa.**

Clasificación	Anticuerpo	EC ₅₀ _Cambio de veces	Señal FACS superior_Cambio de veces
1	hu40E9-L3H2	0,57	0,73
2	hu40E9-L3H4	0,61	0,64
3	hu40E9-L2H3-D56G.H	0,65	0,82
4	hu40E9-L2H3-N93W.L	0,72	0,88
5	hu40E9-L2H3-N93S.L	0,74	0,87
6	hu40E9-L2H3-S91R.L	0,79	0,95
7	hu40E9-L2H4	0,80	0,89
8	hu40E9-L2H3-N93R.L	0,81	1,07
9	hu40E9-L2H3-Y102S.H	0,87	0,96
10	ch40-C12-C10-E9	1,00	1,00
11	hu40E9-L2H3-Y54G.H	1,06	0,94
12	hu40E9-L2H3-D99E.H	1,19	0,91
13	hu40E9-L2H3-Y101F.H	1,23	0,94
14	hu40E9-L3H1	1,33	0,97
15	hu40E9-L2H3-N55S.H	1,35	1,03
16	hu40E9-L2H3-D105R.H	1,95	0,81
17	hu40E9-L2H2	2,14	1,28
18	hu40E9-L2H3	2,43	1,18
19	hu40E9-L2H3-D105E.H	3,77	0,74
20	hu40E9-L2H3-G106A.H	4,95	0,99
21	hu40E9-L2H1	5,73	1,37
22	BMK-TCB	8,17	0,48

Tabla 36. Capacidad de activación de los anticuerpos humanizados en células Jurkat-NFAT-luciferasa.

Anticuerpo	EC ₅₀ _Cambio de veces	Señal superior_Cambio de veces
ch40-C12-C10-E9	1,00	1,00
hu40E9-L2H7	1,18	0,77
hu40E9-L2H5	1,29	0,79
hu40E9-L4H3	1,82	1,08
hu40E9-L4H7	1,95	1,12
hu40E9-L2H9	2,49	0,87
hu40E9-L2H11	2,97	0,85
hu40E9-L2H13	3,08	0,51
hu40E9-L5H7	3,41	1,15
hu40E9-L2H14	3,86	0,96
hu40E9-L6H3	4,34	0,95
hu40E9-L2H6	4,57	0,74
hu40E9-L2H16	6,18	1,35
hu40E9-L2H10	12,57	1,01
hu40E9-L2H8	18,35	0,69
hu40E9-L2H12	21,28	0,73
hu40E9-L5H3	23,19	1,47
hu40E9-L2H15	98,56	0,75
hu40E9-L4H8	-	0,32
hu40E9-L5H8	-	0,30

4.5 Ensayo de activación de PBMC humanas

- 5 Se utilizó un ensayo primario basado en células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) para determinar la capacidad de activación de los anticuerpos humanizados contra las células T. Es bien sabido que cuando se activan las células T, la expresión de la proteína de superficie CD25 está regulado de forma positiva. El anticuerpo de referencia BMK-TCB se utilizó como control positivo y el isotipo hIgG1 se utilizó como control negativo. El
- 10 protocolo para el análisis de activación se describe en el Ejemplo 3.6.2, excepto que las

concentraciones y los anticuerpos de prueba utilizados en el paso (a) fueron diferentes.

Como se muestra en la Figura 11 y la Figura 18 a continuación, el control positivo BMK-TCB indujo la regulación positiva de CD25 en células T humanas como lo indica la tasa de subconjunto de células CD25⁺ en las células T CD3⁺. El efecto de activación de los anticuerpos humanizados y/o madurados por afinidad fue mayor o comparable con el anticuerpo de referencia BMK-TCB.

Ejemplo 5. Anticuerpo humanizado de 147E11E2: Generación, maduración de afinidad y caracterización de anticuerpos

5.1 Generación de anticuerpos humanizados

Se seleccionó el anticuerpo quimérico ch147E11E2 como clon para la humanización. Las secuencias de anticuerpos se alinearon con secuencias de línea germinal humana para identificar el modelo de mejor ajuste. Las secuencias de línea germinal humana mejor emparejadas se seleccionaron como plantillas para la humanización con base en la homología con las secuencias originales de anticuerpos de ratón. En general, la humanización de un anticuerpo se realizó comparando la base de datos de genes de cepa variable de cadena pesada y ligera de anticuerpo humano IMGT (<https://www.imgt.org>), se seleccionaron genes de cepa variable de cadena pesada y cadena ligera con alta homología con anticuerpo derivado de murino como plantillas, y se trasplantaron CDR de anticuerpo derivado de murino en plantillas humanas correspondientes. Se formó una secuencia de región variable con el orden FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Según sea necesario, los aminoácidos clave en la secuencia del esqueleto se reversionaron y mutaron a los correspondientes a anticuerpos murinos para garantizar la afinidad original.

Se evaluaron el riesgo de inmunogenicidad y el punto de acceso en estos anticuerpos humanizados producidos, y no se identificó ningún riesgo de inmunogenicidad. Un punto caliente (motivo N55G56) que es susceptible de desamidación se identificó en HCDR2 del anticuerpo humanizado (*por ejemplo*, hu147E2-L1H3) para el clon 147E11E2. Para retirar el sitio de desamidación, se introdujeron diferentes mutaciones en N55, y se descubrió que N55 se puede mutar a una variedad de residuos, pero aún conserva la unión específica a CD3. Por ejemplo, se encontró que cuando N55 (la posición es relativa a la SEQ ID NO: 213) fue reemplazado por Q o S, la afinidad de unión del anticuerpo se retuvo y no hubo un impacto negativo en su unión a CD3. También se espera que las otras mutaciones, tal como las mutaciones a G56, también funcionen, siempre y cuando el sitio de desamidación se retire y

aún conserve la unión específica a CD3.

Se obtuvo un total de 11 anticuerpos humanizados de ch147E11E2 mezclando y emparejando 3 variantes de regiones variables de cadena ligera humanizadas (*es decir*, hu147E2-L1, hu147E2-L2 y hu147E2-L3) y 5 variantes de regiones variables de cadena pesada humanizadas (*es decir*, hu147E2-H2, hu147E2-H3, hu147E2-H3a, hu147E2-H3b y hu147E2-H4). Los 11 anticuerpos humanizados se designaron como hu147E2-L1H2, hu147E2-L2H2, etc., como se muestra en la Tabla 28 a continuación, de la misma manera.

Tabla 28. Regiones variables de cadena pesada y ligera de anticuerpos humanizados de ejemplo para ch147E11E2

Región VL Región VH	hu147E2-L1 (SEQ ID NO: 207)	hu147E2-L2 (SEQ ID NO: 208)	hu147E2-L3 (SEQ ID NO: 209)
hu147E2-H2 (SEQ ID NO: 202)	hu147E2-L1H2 (SEQ ID NO: 207/202)	hu147E2-L2H2 (SEQ ID NO: 208/202)	hu147E2-L3H2 (SEQ ID NO: 209/202)
hu147E2-H3 (SEQ ID NO: 203)	hu147E2-L1H3 (SEQ ID NO: 207/203)	hu147E2-L2H3 (SEQ ID NO: 208/203)	hu147E2-L3H3 (SEQ ID NO: 209/203)
hu147E2-H3a (SEQ ID NO: 204)	hu147E2-L1H3a (SEQ ID NO: 207/204)	N/A	N/A
hu147E2-H3b (SEQ ID NO: 205)	hu147E2-L1H3b (SEQ ID NO: 207/205)	N/A	N/A
hu147E2-H4 (SEQ ID NO: 206)	hu147E2-L1H4 (SEQ ID NO: 207/206)	hu147E2-L2H4 (SEQ ID NO: 208/206)	hu147E2-L3H4 (SEQ ID NO: 209/206)

10

5.2 Afinidad de unión basada en células a células Jurkat

La afinidad de unión de varios anticuerpos 147E11E2 humanizados seleccionados en la línea celular de cáncer de linfocito derivado de paciente humano Jurkat se determinó mediante análisis FACS. El anticuerpo de referencia BMK-TCB se utilizó como control positivo

y el isotipo hlgG1 se utilizó como control negativo. El protocolo para el análisis FACS se describe en el Ejemplo 3.3, excepto que los anticuerpos de prueba utilizados en el paso (c) fueron diferentes.

5 Como se muestra en la Figura 12 y la Tabla 29 a continuación, la afinidad de unión de varios anticuerpos 147E11E2 humanizados seleccionados a células Jurkat fue mayor que el anticuerpo de referencia BMK-TCB.

Tabla 29. Afinidad de unión de anticuerpos humanizados seleccionados a células Jurkat.

Clasificación	Anticuerpo	EC ₅₀ (nM)	Señal FACS superior
1	ch147E11E2	0,6494	2775
2	hu147E2-L3H3	0,6589	2675
3	hu147E2-L3H4	0,6715	2675
4	hu147E2-L3H2	0,8911	2726
5	BMK-TCB	1,347	2366

5.3 Afinidad de unión basada en células a células 293T-cynoCD3mix

10 La afinidad de unión de anticuerpos humanizados seleccionados y anticuerpos de referencia en células CD3 de cynomolgus (293T-cynoCD3mix) que sobreexpresan HEK 293T de manera estable se determinó mediante análisis FACS. Se utilizó BMK-TCB como control positivo y se utilizó el isotipo hlgG1 como control negativo. El protocolo para el análisis FACS se describe en el Ejemplo 3.4, excepto que los anticuerpos de prueba utilizados en el paso (c)

15 fueron diferentes.

Como se muestra en la Figura 13 y la Tabla 30 a continuación, la afinidad de unión de los anticuerpos 147E11E2 humanizados producidos a células 293T-cynoCD3mix fue mayor

que el anticuerpo de referencia BMK-TCB.

Tabla 30. Afinidad de unión de anticuerpos humanizados seleccionados a 293T-cynoCD3mix.

Clasificación	Anticuerpo	EC50 (nM)	Señal superior
1	ch147E11E2	1,23	17837
2	hu147E2-L3H4	1,29	16062
3	hu147E2-L1H4	1,31	18693
4	hu147E2-L1H3	1,51	19199
5	hu147E2-L3H3	1,63	18962
6	hu147E2-L2H2	1,64	20532
7	hu147E2-L1H3a	1,66	20682
8	hu147E2-L1H3b	1,68	21141
9	hu147E2-L3H2	1,77	19191
10	hu147E2-L2H3	1,86	21012
11	hu147E2-L1H2	2,01	19743
12	hu147E2-L2H4	2,02	21234
13	BMK-TCB	2,16	12509

5.4 Ensayo de activación de Jurkat-NFAT-Luciferasa

La capacidad de activación de células T de estos anticuerpos se determinó mediante el ensayo de activación de Jurkat NFAT-Luciferasa. El anticuerpo de referencia BMK-TCB se utilizó como control positivo y el isotipo hlgG1 se utilizó como control negativo. El protocolo para el análisis de activación se describe en el Ejemplo 4.4, excepto que los anticuerpos de prueba utilizados en el paso (a) fueron diferentes.

Los valores de la EC₅₀ activada y la señal superior se normalizaron de acuerdo con ch147E11E2 en la misma placa y los valores del anticuerpo de referencia BMK-TCB se mostraron como media. Como se muestra en las Figuras 14A~C y la Tabla 31 a continuación, la capacidad de activación de los anticuerpos humanizados seleccionados fue mayor que el anticuerpo de referencia BMK-TCB.

Tabla 31. Capacidad de activación de los anticuerpos humanizados en células Jurkat-NFAT-luciferasa.

Clasificación	Anticuerpo	EC ₅₀ _Cambio de veces	Señal FACS superior_Cambio de veces
1	ch147E11E2	1,00	1,00
2	hu147E2-L1H4	1,21	0,92
3	hu147E2-L2H4	1,24	0,99
4	hu147E2-L3H3	1,36	0,68
5	hu147E2-L2H2	1,40	0,90
6	hu147E2-L2H3	1,65	0,78
7	hu147E2-L3H2	1,66	0,76
8	hu147E2-L1H3b	1,73	0,87
9	hu147E2-L1H3	1,98	1,00
10	hu147E2-L3H4	2,12	0,60
11	BMK-TCB	2,24	0,50

5.5 Ensayo de activación de PBMC humanas

Se utilizó un ensayo primario basado en células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) para determinar la capacidad de activación de los anticuerpos humanizados contra las células T. Es bien sabido que cuando se activan las células T, la expresión de la proteína de superficie CD25 está regulado de forma positiva. El isotipo hIgG1 se utilizó como control negativo. El protocolo para el análisis de activación se describe en el Ejemplo 3.6.2, excepto que las concentraciones y los anticuerpos de prueba utilizados en el paso (a) fueron diferentes.

Como se muestra en la Figura 15, los anticuerpos humanizados indujeron la regulación positiva de CD25 en células T humanas como lo indica la tasa de subconjuntos de células CD25⁺ en las células T CD3⁺.