

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 979 976**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

C07K 16/32 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.08.2015** **E 19172443 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2024** **EP 3608337**

54 Título: **Moléculas de unión a antígeno activadoras de linfocitos T biespecíficas**

30 Prioridad:

04.08.2014 EP 14179764

05.06.2015 EP 15170866

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.09.2024

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

72 Inventor/es:

AST, OLIVER;
BACAC, MARINA;
IMHOF-JUNG, SABINE;
NEUMANN (FORMALLY JAEGER), CHRISTIANE;
KLEIN, CHRISTIAN;
KLOSTERMANN, STEFAN;
MOLHOJ, MICHAEL;
REGULA, JOERG THOMAS;
SCHAEFER, WOLFGANG y
UMAÑA, PABLO

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 979 976 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Moléculas de unión a antígeno activadoras de linfocitos T biespecíficas

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere en general a moléculas de unión a antígeno biespecíficas para activar linfocitos T.

10 Antecedentes

La destrucción selectiva de una célula individual o un tipo de célula específico es a menudo deseable en una variedad de entornos clínicos. Por ejemplo, un objetivo principal del tratamiento del cáncer es destruir específicamente las células tumorales, mientras que deja las células y tejidos sanos intactos y sin daños.

Una forma atractiva de lograr esto es induciendo una respuesta inmunitaria contra el tumor, para hacer que las células efectoras inmunitarias tales como los linfocitos citolíticos naturales (NK) o los linfocitos T citotóxicos (CTL) ataquen y destruyan las células tumorales. Los CTL constituyen las células efectoras más potentes del sistema inmunitario, sin embargo, no se pueden activar por el mecanismo efector mediado por el dominio Fc de anticuerpos terapéuticos convencionales.

A este respecto, los anticuerpos biespecíficos diseñados para unirse con un "brazo" a un antígeno de superficie en células diana, y con el segundo "brazo" a un componente invariante activador del complejo receptor de linfocitos T (TCR), se han vuelto de interés en los últimos años. La unión simultánea de un anticuerpo de este tipo a ambas de sus dianas forzará una interacción temporal entre la célula diana y el linfocito T, provocando la activación de cualquier linfocito T citotóxico y la posterior lisis de la célula diana. Por consiguiente, la respuesta inmunitaria se redirige a las células diana y es independiente de la presentación de antígenos peptídicos por la célula diana o la especificidad del linfocito T como sería pertinente para la activación restringida para MHC normal de los CTL. En este contexto, es crucial que los CTL solo se activen cuando una célula diana les presente el anticuerpo biespecífico, es decir, se imite la sinapsis inmunológica. Son en particular deseables los anticuerpos biespecíficos que no requieren preconditionamiento o coestimulación de linfocitos para provocar lisis eficaz de células diana.

Se han desarrollado varios formatos de anticuerpos biespecíficos e investigado su idoneidad para inmunoterapia mediada por linfocitos T. De estos, las denominadas moléculas BiTE (captadoras de linfocitos T biespecíficas) se han caracterizado muy bien y ya se han mostrado prometedoras en el ámbito clínico (revisado en Nagorsen y Bäuerle, *Exp Cell Res* 317, 1255-1260 (2011)). Las BiTE son moléculas scFv en tándem en las que dos moléculas scFv se fusionan por un conector flexible. Otros formatos biespecíficos que se evalúan para el acoplamiento de linfocitos T incluyen diacuerpos (Holliger *et al.*, *Prot Eng* 9, 299-305 (1996)) y derivados de los mismos, tales como diacuerpos en tándem (Kipriyanov *et al.*, *J Mol Biol* 293, 41-66 (1999)). Un desarrollo más reciente son las moléculas denominadas DART (reselectividad de afinidad doble), que se basan en el formato de diacuerpos pero presentan un puente disulfuro C terminal para estabilización adicional (Moore *et al.*, *Blood* 117, 4542-51 (2011)). Los denominados triomabs, que son moléculas de IgG de ratón/rata híbridas completas y que también se están evaluando actualmente en ensayos clínicos, representan un formato de mayor tamaño (revisado en Seimetz *et al.*, *Cancer Treat Rev* 36, 458-467 (2010)). La variedad de formatos que se están desarrollando muestra el gran potencial atribuido al redireccionamiento y activación de linfocitos T en inmunoterapia. Sin embargo, la tarea de generar anticuerpos biespecíficos adecuados para esto no es de ninguna manera trivial, sino que implica una serie de dificultades que se han de cumplir relacionadas con la eficacia, toxicidad, aplicabilidad y producibilidad de los anticuerpos.

Las construcciones pequeñas tales como, por ejemplo, moléculas BiTE (si bien pueden reticular eficazmente células diana y efectoras) tienen una semivida en suero muy corta, lo que requiere que se administren a los pacientes por infusión continua. Por otra parte, los formatos de tipo IgG (si bien tienen el gran beneficio de una semivida larga) experimentan toxicidad asociada con las funciones efectoras naturales inherentes de las moléculas IgG. Su potencial inmunogénico constituye otro rasgo característico desfavorable de los anticuerpos biespecíficos de tipo IgG, especialmente los formatos no humanos, para un desarrollo terapéutico satisfactorio. Finalmente, una dificultad principal en el desarrollo general de anticuerpos biespecíficos ha sido la producción de construcciones de anticuerpos biespecíficos en una cantidad y pureza clínicamente suficientes, debido al emparejamiento incorrecto de las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo de especificidades diferentes tras la coexpresión, lo que disminuye el rendimiento de la construcción correctamente ensamblada y da como resultado una serie de productos secundarios no funcionales de los que puede ser difícil de separar el anticuerpo biespecífico deseado.

Se han adoptado enfoques diferentes para superar la cuestión de asociación de cadena en los anticuerpos biespecíficos (véase, por ejemplo, Klein *et al.*, *mAbs* 6, 653-663 (2012)). Por ejemplo, la estrategia de 'botones en ojales' tiene como objetivo forzar el emparejamiento de dos cadenas pesadas de anticuerpo diferentes introduciendo mutaciones en los dominios CH3 para modificar la interfase de contacto. En una cadena se reemplazan aminoácidos voluminosos por aminoácidos con cadenas laterales cortas para crear un 'ojal'. A la

inversa, se introducen aminoácidos con cadenas laterales grandes en el otro dominio CH3, para crear un 'botón'. Al coexpresar estas dos cadenas pesadas (y dos cadenas ligeras idénticas, que tienen que ser apropiadas para ambas cadenas pesadas), se observan rendimientos altos de heterodímero ('botón-ojal') frente a homodímero ('ojal-ojal' o 'botón-botón') (Ridgway, J.B., *et al.*, Protein Eng. 9 (1996) 617-621; y documento WO 96/027011). El porcentaje de heterodímero se podría incrementar además remodelando las superficies de interacción de los dos dominios CH3 usando un enfoque de presentación en fagos y la introducción de un puente disulfuro para estabilizar los heterodímeros (Merchant, A.M., *et al.*, Nature Biotech. 16 (1998) 677-681; Atwell, S., *et al.*, J. Mol. Biol. 270 (1997) 26-35). Se describen nuevos enfoques para la tecnología de botones en ojales, por ejemplo, en el documento EP 1870459 A1.

Sin embargo, la estrategia de 'botones en ojales' no resuelve el problema del emparejamiento incorrecto cadena pesada-cadena ligera, que se produce en anticuerpos biespecíficos que comprenden diferentes cadenas ligeras para unirse a los diferentes antígenos diana.

Una estrategia para evitar el emparejamiento incorrecto cadena pesada-cadena ligera es intercambiar los dominios entre las cadenas pesada y ligera de uno de los brazos de unión de un anticuerpo biespecífico (véanse los documentos WO 2009/080251, WO 2009/080252, WO 2009/080253, WO 2009/080254 y Schaefer, W. *et al.*, PNAS, 108 (2011) 11187-11191, que se refieren a anticuerpos IgG biespecíficos con un entrecruzamiento de dominios).

El intercambio de los dominios variables de cadena pesada y ligera VH y VL en uno de los brazos de unión del anticuerpo biespecífico (documento WO2009/080252, véase también Schaefer, W. *et al.*, PNAS, 108 (2011) 11187-11191) reduce claramente los productos secundarios provocados por el emparejamiento incorrecto de una cadena ligera frente a un primer antígeno con la cadena pesada errónea frente al segundo antígeno (en comparación con enfoques sin dicho intercambio de dominios). No obstante, estas preparaciones de anticuerpos no están completamente libres de productos secundarios. El producto secundario principal se basa en una interacción de tipo Bence Jones (Schaefer, W. *et al.*, PNAS, 108 (2011) 11187-11191; en la fig. S11 del Suplemento). Por tanto, es deseable una reducción adicional de dichos productos secundarios para mejorar, por ejemplo, el rendimiento de dichos anticuerpos biespecíficos.

Dadas las dificultades y desventajas asociadas con los anticuerpos biespecíficos actualmente disponibles para la inmunoterapia mediada por linfocitos T, sigue existiendo la necesidad de formatos mejorados novedosos de dichas moléculas. La presente invención proporciona moléculas de unión a antígeno biespecíficas diseñadas para la activación y redireccionamiento de linfocitos T que combinan buena eficacia y producibilidad con baja toxicidad y propiedades farmacocinéticas favorables.

Sumario de la invención

La invención es como se define en la reivindicación 1. De acuerdo con la invención, la proporción de un anticuerpo biespecífico deseado en comparación con productos secundarios no deseados, en particular productos secundarios de tipo Bence Jones que se producen en anticuerpos biespecíficos con un intercambio de dominios VH/VL en uno de sus brazos de unión, se puede mejorar por la introducción de aminoácidos cargados con cargas opuestas en posiciones de aminoácidos específicas en los dominios CH1 y CL.

Por tanto, la presente invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T como se define en la reivindicación 1, que comprende

(a) una primera molécula Fab que se une específicamente a CD20;

(b) una segunda molécula Fab que se une específicamente a CD3 épsilon, y en la que los dominios variables VL y VH de la cadena ligera de Fab y la cadena pesada de Fab se reemplazan entre sí;

(c) una tercera molécula Fab que se une específicamente a CD20; y

; y

en la que

en el dominio constante CL de la primera molécula Fab en a) y de la tercera molécula Fab en c) el aminoácido en la posición 124 se sustituye por lisina (K) (numeración de acuerdo con Kabat), y en la que en el dominio constante CH1 de la primera molécula Fab en a) y de la tercera molécula Fab en c) el aminoácido en la posición 147 o el aminoácido en la posición 213 se sustituye por ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con índice EU de Kabat);

De acuerdo con la invención, la segunda molécula Fab es una molécula Fab de entrecruzamiento en la que las regiones variables de la cadena ligera de Fab y la cadena pesada de Fab se intercambian, la primera y la tercera

molécula Fab son una molécula Fab convencional, y no más de una molécula Fab que se puede unir específicamente a un antígeno activador de linfocitos T está presente en la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T (es decir, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T proporciona unión monovalente al antígeno activador de linfocitos T).

En el dominio constante CL de la primera molécula Fab en a) y de la tercera molécula Fab en c) el aminoácido en la posición 124 se sustituye por lisina (K) (numeración de acuerdo con Kabat) y el aminoácido en la posición 123 se sustituye por arginina (R) (numeración de acuerdo con Kabat), y en el dominio constante CH1 de la primera molécula Fab en a) y de la tercera molécula Fab en c) el aminoácido en la posición 147 se sustituye por ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye por ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con índice EU de Kabat).

La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de acuerdo con la invención comprende una tercera molécula Fab que se une específicamente al primer antígeno.

La tercera molécula Fab es idéntica a la primera molécula Fab. La tercera molécula Fab comprende por tanto las mismas sustituciones aminoacídicas que la primera molécula Fab. Como la primera molécula Fab, la tercera molécula Fab en particular es una molécula Fab convencional.

La primera y la tercera molécula Fab se unen específicamente a CD20, y la segunda molécula Fab se une específicamente a CD3, más en particular CD3 épsilon.

La primera molécula Fab en a) y la segunda molécula Fab en b) se fusionan entre sí, por medio de un conector peptídico.

De acuerdo con la invención, la primera molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab. En aspectos de la divulgación en los que (i) la segunda molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab o bien (ii) la primera molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab, adicionalmente la cadena ligera de Fab de la molécula Fab y la cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab se pueden fusionar entre sí, opcionalmente por medio de un conector peptídico. La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de acuerdo con la invención comprende adicionalmente un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad que se pueden asociar de forma estable.

La segunda molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la primera subunidad del dominio Fc. La primera molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab.

De acuerdo con la invención, la tercera molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la primera subunidad del dominio Fc. La segunda y la tercera molécula Fab se fusionan cada una en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de una de las subunidades del dominio Fc, y la primera molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab. La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende esencialmente una molécula de inmunoglobulina, en la que en uno de los brazos de Fab las regiones variables de la cadena pesada y ligera VH y VL se intercambian/reemplazan entre sí, y en la que una molécula Fab adicional (convencional) se fusiona de forma N terminal a dicho brazo de Fab.

En la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de acuerdo con la invención, las sustituciones aminoacídicas descritas en el presente documento están en los dominios CH1 y CL de la primera y la tercera molécula Fab. De acuerdo con el concepto de la invención, las sustituciones aminoacídicas como se describe en el presente documento se realizan en la primera y la tercera molécula Fab, y no se realizan dichas sustituciones aminoacídicas en la segunda molécula Fab.

Las sustituciones aminoacídicas como se describe en el presente documento se realizan en la primera y la tercera molécula Fab y el dominio constante CL de la primera y la tercera molécula Fab es de isotipo kappa. El dominio constante CL de la primera (y la tercera) molécula Fab y el dominio constante CL de la segunda molécula Fab son de isotipo kappa.

La molécula de inmunoglobulina comprendida en la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de acuerdo con la invención es una inmunoglobulina de subclase IgG₁. En un aspecto de la divulgación, la inmunoglobulina es una inmunoglobulina de subclase IgG₄.

La invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T como se define en la reivindicación 1, comprendiendo dicha molécula

- a) una primera molécula Fab que se une específicamente a CD20;
- b) una segunda molécula Fab que se une específicamente a CD3 épsilon, y en la que los dominios variables VL y VH de la cadena ligera de Fab y la cadena pesada de Fab se reemplazan entre sí;
- c) una tercera molécula Fab que se une específicamente a CD20; y
- d) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad que se pueden asociar de forma estable;

en la que la tercera molécula Fab en c) es idéntica a la primera molécula Fab en a);

en la que en el dominio constante CL de la primera molécula Fab en a) y la tercera molécula Fab en c) el aminoácido en la posición 124 se sustituye por lisina (K) (numeración de acuerdo con Kabat) y el aminoácido en la posición 123 se sustituye por arginina (R) (numeración de acuerdo con Kabat), y en la que en el dominio constante CH1 de la primera molécula Fab en a) y la tercera molécula Fab en c) el aminoácido en la posición 147 se sustituye por ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye por ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat); y

en la que la primera molécula Fab en a) se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab en b), y la segunda molécula Fab en b) y la tercera molécula Fab en c) se fusionan cada una en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de una de las subunidades del dominio Fc en d).

La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG₁. En un aspecto de la divulgación, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG₄. En un aspecto incluso más específico de la divulgación, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG₄ que comprende la sustitución aminoacídica S228P (numeración de Kabat). El dominio Fc es un dominio Fc humano.

El dominio Fc comprende una modificación que promueve la asociación de la primera y la segunda subunidad del dominio Fc. Un residuo aminoacídico en el dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc se reemplaza por un residuo aminoacídico que tiene un volumen de cadena lateral más grande, generando de este modo una protuberancia dentro del dominio CH3 de la primera subunidad que se puede situar en una cavidad dentro del dominio CH3 de la segunda subunidad, y un residuo aminoacídico en el dominio CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc se reemplaza por un residuo aminoacídico que tiene un volumen de cadena lateral más pequeño, generando de este modo una cavidad dentro del dominio CH3 de la segunda subunidad dentro de la que se puede situar la protuberancia dentro del dominio CH3 de la primera subunidad.

El dominio Fc presenta afinidad de unión reducida por un receptor de Fc y/o función efectora reducida, en comparación con un dominio Fc de IgG₁ natural. El dominio Fc se genomanipula para tener afinidad de unión reducida por un receptor de Fc y/o función efectora reducida, en comparación con un dominio Fc no genomanipulado. El dominio Fc comprende una o más sustituciones aminoacídicas que reducen la unión a un receptor de Fc y/o la función efectora. Las una o más sustituciones aminoacídicas en el dominio Fc que reducen la unión a un receptor de Fc y/o la función efectora están en una o más posiciones seleccionadas del grupo de L234, L235 y P329 (numeración del índice EU de Kabat). Cada subunidad del dominio Fc comprende tres sustituciones aminoacídicas que reducen la unión a un receptor de Fc y/o la función efectora en la que dichas sustituciones aminoacídicas son L234A, L235A y P329G (numeración del índice EU de Kabat). El dominio Fc es un dominio Fc de IgG₁, en particular un dominio Fc de IgG₁ humana. En otros aspectos de la divulgación, cada subunidad del dominio Fc comprende dos sustituciones aminoacídicas que reducen la unión a un receptor de Fc y/o la función efectora en la que dichas sustituciones aminoacídicas son L235E y P329G (numeración del índice EU de Kabat). En un aspecto de este tipo de la divulgación, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG₄, en particular un dominio Fc de IgG₄ humana. En un aspecto, el dominio Fc de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T es un dominio Fc de IgG₄ y comprende las sustituciones aminoacídicas L235E y S228P (SPLE) (numeración del índice EU de Kabat).

El receptor de Fc es un receptor de Fc γ . El receptor de Fc es un receptor de Fc humano y el receptor de Fc es un receptor de Fc activador. El receptor de Fc es Fc γ R1a, Fc γ R1 y/o Fc γ R1a humana. La función efectora es citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de acuerdo con la invención comprende una molécula Fab que se une específicamente a CD3, más en particular CD3 épsilon, comprende la región determinante de la complementariedad (CDR) 1 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 4, la CDR 2 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 5, la CDR 3 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 6, la CDR 1 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 8, la CDR 2 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 9 y la CDR 3 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 10. En un aspecto de la divulgación, la molécula Fab que se une específicamente a un antígeno activador de linfocitos T, en particular CD3, más en particular CD3 épsilon, comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %

idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7. La segunda molécula Fab comprendida en la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de acuerdo con la invención se une específicamente a CD3, más en particular CD3 épsilon, y comprende la región determinante de la complementariedad (CDR) 1 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 4, la CDR 2 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 5, la CDR 3 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 6, la CDR 1 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 8, la CDR 2 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 9 y la CDR 3 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 10. La segunda molécula Fab comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7.

La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de acuerdo con la invención comprende las dos moléculas Fab que se unen específicamente al antígeno de célula diana CD20 que comprende la región determinante de la complementariedad (CDR) 1 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 46, la CDR 2 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 47, la CDR 3 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 48, la CDR 1 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 49, la CDR 2 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 50 y la CDR 3 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 51. En un aspecto de la divulgación, la molécula Fab que se une específicamente a un antígeno de célula diana, en particular CD20, comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30 y una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31. La primera y la tercera molécula Fab comprendidas en la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de acuerdo con la invención se une específicamente a CD20, y comprende la región determinante de la complementariedad (CDR) 1 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 46, la CDR 2 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 47, la CDR 3 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 48, la CDR 1 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 49, la CDR 2 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 50 y la CDR 3 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 51. La primera y la tercera molécula Fab comprenden una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31.

La invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T como se define en la reivindicación 1, comprendiendo dicha molécula

- a) una primera molécula Fab que se une específicamente a un primer antígeno;
- b) una segunda molécula Fab que se une específicamente a un segundo antígeno, y en la que los dominios variables VL y VH de la cadena ligera de Fab y la cadena pesada de Fab se reemplazan entre sí;
- c) una tercera molécula Fab que se une específicamente al primer antígeno; y
- d) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad que se pueden asociar de forma estable; en la que

(i) el primer antígeno es CD20 y el segundo antígeno es CD3, en particular CD3 épsilon;

(ii) la primera molécula Fab en a) y la tercera molécula Fab en c) comprenden cada una la región determinante de la complementariedad (CDR) 1 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 46, la CDR 2 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 47, la CDR 3 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 48, la CDR 1 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 49, la CDR 2 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 50 y la CDR 3 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 51, y la segunda molécula Fab en b) comprende la CDR 1 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 4, la CDR 2 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 5, la CDR 3 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 6, la CDR 1 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 8, la CDR 2 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 9 y la CDR 3 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 10;

(iii) en el dominio constante CL de la primera molécula Fab en a) y la tercera molécula Fab en c) el aminoácido en la posición 124 se sustituye por lisina (K) (numeración de acuerdo con Kabat) y el aminoácido en la posición 123 se sustituye por lisina (K) o arginina (R), en particular por arginina (R) (numeración de acuerdo con Kabat), y en la que en el dominio constante CH1 de la primera molécula Fab en a) y la tercera molécula Fab en c) el aminoácido en la posición 147 se sustituye por ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye por ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat); y

(iv) la primera molécula Fab en a) se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab en b), y la segunda molécula Fab en b) y la tercera molécula Fab en c) se fusionan cada una en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de una de las subunidades del dominio Fc en d).

De acuerdo con otro aspecto de la divulgación se proporciona uno o más polinucleótidos aislados que codifican una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de la invención. La divulgación proporciona además uno o más vectores de expresión que comprenden el/los polinucleótido(s) aislado(s) de la invención, y una célula huésped que comprende el/los polinucleótido(s) aislado(s) o el/los vector(es) de expresión de la divulgación. En algunos aspectos de la divulgación, la célula huésped es una célula eucariota, en particular una célula de mamífero.

En otro aspecto se proporciona un procedimiento de producción de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de la divulgación, que comprende las etapas de a) cultivar la célula huésped de la divulgación en condiciones adecuadas para la expresión de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T y b) recuperar la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T. La divulgación también engloba una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T producida por el procedimiento de la invención.

La divulgación proporciona además una composición farmacéutica que comprende la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. También se engloban por la divulgación procedimientos de uso de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T y una composición farmacéutica de la invención. En un aspecto, la divulgación proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T o una composición farmacéutica de la invención para su uso como un medicamento. En un aspecto se proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T o una composición farmacéutica de acuerdo con la divulgación para su uso en el tratamiento de una enfermedad en un individuo que necesita el mismo. En un aspecto específico de la divulgación, la enfermedad es cáncer.

También se divulga el uso de una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad en un individuo que necesita el mismo; que comprende administrar a dicho individuo una cantidad farmacéuticamente eficaz de una composición que comprende la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de acuerdo con la invención en una forma farmacéuticamente aceptable. En un aspecto de la divulgación, la enfermedad es cáncer. En cualquiera de los aspectos anteriores, el individuo preferentemente es un mamífero, en particular un ser humano.

Breve descripción de los dibujos

FIGURA 1. Configuraciones ejemplares de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T (TCB) de la invención (figura 1 B) y divulgación (figuras A, D-Z). (A, D) Ilustración de la molécula "1+1 CrossMab". (B, E) Ilustración de la molécula "2+1 IgG Crossfab" con orden alternativo de los componentes Crossfab y Fab ("invertida"). (C, F) Ilustración de la molécula "2+1 IgG Crossfab". (G, K) Ilustración de la molécula "1+1 IgG Crossfab" con orden alternativo de los componentes Crossfab y Fab ("invertida"). (H, L) Ilustración de la molécula "1+1 IgG Crossfab". (I, M) Ilustración de la molécula "2+1 IgG Crossfab" con dos CrossFab. (J, N) Ilustración de la molécula "2+1 IgG Crossfab" con dos CrossFab y orden alternativo de los componentes Crossfab y Fab ("invertida"). (O, S) Ilustración de la molécula "Fab-Crossfab". (P, T) Ilustración de la molécula "Crossfab-Fab". (Q, U) Ilustración de la molécula "(Fab)₂-Crossfab". (R, V) Ilustración de la molécula "Crossfab-(Fab)₂". (W, Y) Ilustración de la molécula "Fab-(Crossfab)₂". (X, Z) Ilustración de la molécula "(Crossfab)₂-Fab". Punto negro: modificación opcional en el dominio Fc que promueve la heterodimerización. ++, --: aminoácidos de cargas opuestas introducidos en los dominios CH y CL.

FIGURA 2. Ilustración de las TCB preparadas en el ejemplo 1. (A) "2+1 IgG CrossFab, invertida" sin modificaciones de carga (intercambio CH1/CL en proteína de unión a CD3), (B) "2+1 IgG CrossFab, invertida" con modificaciones de carga (intercambio VH/VL en proteína de unión a CD3, modificación de carga en proteínas de unión a CD20, EE = 147E, 213E; RK = 123R, 124K), (C) "2+1 IgG CrossFab" con modificaciones de carga (intercambio VH/VL en proteína de unión a CD3, modificación de carga en proteínas de unión a CD20, EE = 147E, 213E; RK = 123R, 124K), (D) "2+1 IgG CrossFab, invertida" sin modificaciones de carga (intercambio VH/VL en proteína de unión a CD3), (E) "2+1 IgG CrossFab, invertida" sin modificaciones de carga (intercambio VH-CH1/VL-CL en proteína de unión a CD3), (F) "2+1 IgG CrossFab, invertida" con modificaciones de carga (intercambio VH/VL en proteínas de unión a CD20, modificación de carga en proteína de unión a CD3, EE = 147E, 213E; KK = 123K, 124K), (G) "2+1 IgG CrossFab, invertida" con modificaciones de carga y mutación DDKK en región Fc (intercambio VH/VL en proteína de unión a CD3, modificación de carga en proteínas de unión a CD20, EE = 147E, 213E; RK = 123R, 124K), (H) "1+1 CrossMab" con modificaciones de carga (intercambio VH/VL en proteína de unión a CD3, modificación de carga en proteína de unión a CD20, EE = 147E, 213E; RK = 123R, 124K), (I) "1+1 CrossMab" con modificaciones de carga (intercambio VH/VL en proteína de unión a CD3, modificación de carga en proteína de unión a CD20, EE = 147E, 213E; RK = 123R, 124K, proteína de unión a CD20 diferente), (J) "2+1 IgG CrossFab, invertida" con modificaciones de carga 213E, 123R (intercambio VH/VL en proteína de unión a CD3, modificación de carga en proteína de unión a CD20, E = 213E; R = 123R), (K) "2+1 IgG CrossFab, invertida" con modificaciones de carga (intercambio VH/VL y modificación de carga en proteína de unión a CD3).

FIGURA 3. (A-I, N, O) Análisis por CE-SDS de las TCB preparadas en el ejemplo 1 (preparaciones purificadas finales). (A) Electroferograma de la molécula "A", mostrado en la figura 2A, (B) electroferograma de la molécula "B", mostrado en la figura 2B, (C) electroferograma de la molécula "C", mostrado en la figura 2C, (D) electroferograma de la molécula "D", mostrado en la figura 2D, (E) electroferograma de la molécula "E", mostrado en la figura 2E, (F) electroferograma de la molécula "F", mostrado en la figura 2F, (G) electroferograma de la molécula "G", mostrado en la figura 2G, (H) electroferograma de la molécula "H", mostrado en la figura 2H, (I) electroferograma de la molécula "I", mostrado en la figura 2I, (N) electroferograma de la molécula "J", mostrado en la figura 2J, (O) electroferograma de la molécula "K", mostrado en la figura 2K. Carril A = sin reducción, carril B = con reducción. (J-L, P, Q) Análisis por SDS-PAGE de TCB preparadas en el ejemplo 1 después de la primera etapa de purificación (cromatografía de afinidad con proteína A). (J) SDS-PAGE con bis-tris al 4-12 %, sin reducción; carril 1 = marcador (Mark 12, estándar no teñido, Invitrogen); carril 2-11 = fracciones de cromatografía de afinidad con proteína A de la molécula B, (K) SDS-PAGE con tris-acetato al 3-8 %, sin reducción; carril 1 = marcador (HiMark, Invitrogen); carril 2-12 = fracciones de cromatografía de afinidad con proteína A de la molécula C, (L) SDS-PAGE con bis-tris al 4-12 %, sin reducción; carril 1 = marcador (Mark 12, estándar no teñido, Invitrogen); carril 2-14 = fracciones de cromatografía de afinidad con proteína A de la molécula D, (P) SDS PAGE con bis/tris al 4-12 %, sin reducción; carril 1 = marcador (Mark 12, Invitrogen); carril 2-10 = fracciones de cromatografía de afinidad con proteína A de la molécula J, (Q) SDS PAGE con bis/tris al 4-12 %, sin reducción; carril 1 = marcador (Mark 12, Invitrogen); carril 2-12 = fracciones de cromatografía de afinidad con proteína A de la molécula K. (M) Cromatografía de exclusión por tamaño preparativa (SEC; primera etapa de purificación) de TCB preparadas en el ejemplo 1 (molécula A (primera etapa de SEC), B y D, como se indica).

FIGURA 4. Unión a CD3 y CD20 de anticuerpos biespecíficos de linfocitos T (TCB) anti-CD3/anti-CD20 ("TCB-CD20") con o sin modificaciones de carga ("residuos con carga") (véase el ejemplo 1).

FIGURA 5. Lisis de células tumorales inducida por anticuerpos biespecíficos de linfocitos T (TCB) anti-CD3/anti-CD20 ("TCB-CD20") con o sin modificaciones de carga ("residuos con carga") tras 22 h de incubación con PBMC humanos (véase el ejemplo 1).

FIGURA 6. Activación de linfocitos T CD8⁺ (A) o linfocitos T CD4⁺ (B) tras destrucción mediada por linfocitos T de células diana tumorales que expresan CD20 (Nalm-6) inducida por anticuerpos biespecíficos de linfocitos T (TCB) anti-CD3/anti-CD20 ("TCB-CD20") con o sin modificaciones de carga ("residuos con carga") (véase el ejemplo 1).

FIGURA 7. Activación de linfocitos T CD8⁺ (A) o linfocitos T CD4⁺ (B) tras destrucción mediada por linfocitos T de células diana tumorales que expresan CD20 (Z-138) inducida por anticuerpos biespecíficos de linfocitos T (TCB) anti-CD3/anti-CD20 ("TCB-CD20") con o sin modificaciones de carga ("residuos con carga") (véase el ejemplo 1).

FIGURA 8. Disminución de linfocitos B en sangre completa humana sana tras incubación con anticuerpos biespecíficos de linfocitos T (TCB) anti-CD3/anti-CD20 ("TCB-CD20") con o sin modificaciones de carga ("residuos con carga"); ensayo de 22 h (véase el ejemplo 1).

FIGURA 9. Activación de linfocitos T CD8⁺ (A) o linfocitos T CD4⁺ (B) tras destrucción mediada por linfocitos T de linfocitos B que expresan CD20 en sangre completa sana humana inducida por anticuerpos biespecíficos de linfocitos T (TCB) anti-CD3/anti-CD20 ("TCB-CD20") con o sin modificaciones de carga ("residuos con carga") (véase el ejemplo 1).

FIGURA 10. Unión de TCB anti-CD20/anti-CD3 (molécula "B" mostrada en la figura 2B) a células diana que expresan CD20 (A) y CD3 (B) humanos.

FIGURA 11. Unión de TCB anti-CD20/anti-CD3 (molécula "B" mostrada en la figura 2B) a células diana que expresan CD20 y CD3 humanos y de macaco cangrejero. (A) Linfocitos B, (B) Linfocitos T CD4, (C) Linfocitos T CD8.

FIGURA 12. Lisis de células tumorales mediada por diferentes formatos de anticuerpos TCB anti-CD20/anti-CD3.

FIGURA 13. Lisis de células tumorales y posterior activación de linfocitos T mediada por diferentes formatos de anticuerpos TCB anti-CD20/anti-CD3. (A-C) Lisis de células diana tumorales Z138 por células efectoras PBMC de tres donantes humanos diferentes. (D) Lisis de un panel de líneas celulares tumorales de DLBCL como se indica.

FIGURA 14. Disminución de linfocitos B en sangre completa humana mediada por diferentes formatos de anticuerpos TCB anti-CD20/anti-CD3.

FIGURA 15. Activación de linfocitos T por diferentes formatos de anticuerpos TCB anti-CD20/anti-CD3, evaluada por cuantificación de la intensidad de la señalización hacia 3' de CD3 usando el ensayo de indicadores Jurkat-NFAT.

FIGURA 16. Parámetros farmacocinéticos de una administración por inyección intravenosa rápida de 0,5 mg/kg i.v. de anticuerpo TCB anti-CD20/anti-CD3 (molécula "B" mostrada en la figura 2B) a partir de datos de muestreo disperso en ratones NOG.

5 FIGURA 17. Representación esquemática del diseño de estudio para evaluar la actividad de disminución de linfocitos B del anticuerpo TCB anti-CD20/anti-CD3 (molécula "B" mostrada en la figura 2B) en ratones NOG totalmente humanizados.

10 FIGURA 18. Cinética de frecuencia de linfocitos B y linfocitos T en sangre de ratones NOG totalmente humanizados tratados con (B) anticuerpo TCB anti-CD20/anti-CD3 (molécula "B" mostrada en la figura 2B) o (A) control de vehículo. D0, D7: días de inyección de tratamiento.

15 FIGURA 19. Análisis de la expresión de diferentes marcadores de superficie en linfocitos T periféricos tres días (D3) y diez días (D10) después de inyección de vehículo (barras negras) o de anticuerpo TCB anti-CD20/anti-CD3 (molécula "B" mostrada en la figura 2B) (barras blancas) en ratones totalmente humanizados.

20 FIGURA 20. Análisis de frecuencia de linfocitos B (A), frecuencia de linfocitos T (B) y expresión de marcadores de superficie en linfocitos T (C) en bazo de ratones totalmente humanizados tratados con vehículo (barras negras) o anticuerpo TCB anti-CD20/anti-CD3 (molécula "B" mostrada en la figura 2B) (barras blancas) en la finalización del estudio (D10 después de la primera inyección terapéutica).

FIGURA 21. Actividad antitumoral del anticuerpo TCB anti-CD20/anti-CD3 (molécula "B" mostrada en la figura 2B) (0,5 mg/kg, una vez a la semana) en el modelo WSU-DLCL2 en ratones NOG con transferencia de huPBMC.

25 FIGURA 22. Ilustración de las moléculas "2+1 IgG CrossFab, invertida" preparadas en el ejemplo 2. (1) Molécula sin modificaciones de carga, (2) molécula con modificaciones de carga en los dominios CH1 y CL de las moléculas Fab que se unen específicamente a BCMA (EE = 147E, 213E; KK = 123K, 124K).

30 FIGURA 23. Análisis por CE-SDS (carril A = sin reducción, carril B = con reducción, tabla de picos para el carril A) de moléculas "2+1 IgG CrossFab, invertida" usadas en el ejemplo 2. Se aplicaron diferentes procedimientos de purificación (cromatografía de afinidad con proteína A (PA), cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), cromatografía de intercambio catiónico (cIEX) y una etapa de cromatografía de exclusión por tamaño final (re-SEC)) para la molécula sin modificaciones de carga (83A10-TCB) y la molécula con modificaciones de carga (83A10-TCBcv).

35 FIGURA 24. Análisis por CE-SDS (carril A = sin reducción, carril B = con reducción, tabla de picos para el carril A) de moléculas "2+1 IgG CrossFab, invertida" usadas en el ejemplo 2, en comparación directa (H2H) después de las etapas de purificación por cromatografía de afinidad con proteína A (PA) y cromatografía de exclusión por tamaño (SEC).

40 FIGURA 25. Análisis de citometría de flujo de la unión de anticuerpos biespecíficos de linfocitos T anti-BCMA/anti-CD3 a múltiples líneas celulares de mieloma positivo para BCMA. (A) 83A10-TCB en células H929 y células MKN45, (B) 83A10-TCBcv en células H929 y células MKN45, (C) comparación de 83A10-TCB y 83A10-TCBcv en células H929.

45 FIGURA 26. Destrucción de células de mieloma H929 positivo para BCMA por anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3 ((A) 83A10-TCB, (B) 83A10-TCBcv) como se mide por liberación de LDH.

50 FIGURA 27. Ilustración de los TCB preparados en el ejemplo 3. (A) "2+1 IgG CrossFab, invertida" con modificaciones de carga (intercambio VH/VL en proteína de unión a CD3, modificación de carga en proteínas de unión a Her2, EE = 147E, 213E; RK = 123R, 124K), (B) "2+1 IgG CrossFab" con modificaciones de carga (intercambio VH/VL en proteína de unión a CD3, modificación de carga en proteínas de unión a Her3, EE = 147E, 213E; RK = 123R, 124K).

55 FIGURA 28. Análisis por CE-SDS de los TCB preparados en el ejemplo 3 (preparación purificada final). (A) Electroferograma de TCB-Her2, mostrado en la figura 27A, (B) electroferograma de TCB-Her3, mostrado en la figura 27B. Carril A = sin reducción, carril B = con reducción.

60 FIGURA 29. Unión de TCB-Her2 (A) y TCB-Her3 (B) a células, como se determina por FACS. Mediana de intensidades de fluorescencia para la unión de la molécula TCB-Her2 a CD3 humano en células Jurkat (izquierda) o a Her2 (A) o Her3 (B) humana en células KPL-4 (derecha), como se mide por citometría de flujo. Se representan los valores de la mediana de fluorescencia, basados en triplicados, incluyendo la DE.

65 FIGURA 30. Activación de linfocitos T por TCB-Her3. Tras la coincubación de células efectoras PBMC humanas, células diana KPL-4 y concentraciones crecientes de TCB-Her3, se midió el porcentaje de linfocitos T CD8 positivos para CD69 por FACS después de 48 h. Se muestran triplicados con DE.

FIGURA 31. Activación de células Jurkat por medio de CD3 después de 5 h, como se determina por luminiscencia. Tras la incubación de células tumorales KPL4 con células indicadoras Jurkat-NFAT (E:T 5:1 (A) o 2,5:1 (B)) y concentraciones crecientes de TCB-Her2 (A) o TCB-Her3 (B), se determinó la activación de Jurkat por señales luminiscentes relativas (RLUS) después de 5 h. Se calcularon los valores de CE50 por Graph Pad Prism (34,4 pM (A) y 22 pM (B)). Se representan los valores promedio de triplicados, las barras de error indican la DE.

FIGURA 32. (A, B) Lisis de células tumorales, como se mide por la liberación de LDH, tras incubación de células diana KPL4, N87, T47D o MDA-MB-231 positivas para Her2 con células efectoras PBMC humanas (E:T 10:1) y concentraciones crecientes de la molécula TCB-Her 2 durante 25 h (A) o 46 h (B). Se representan los valores promedio de triplicados, las barras de error indican la DE. Se calcularon los valores de CE50 por GraphPadPrism: 7,5 pM (células KPL4), 25,6 pM (células N87), 30,6 pM (células T47D) y 59,9 pM (células MDA-MB-231). (C) Lisis de células tumorales, como se mide por la liberación de LDH, tras la incubación de células diana KPL4 positivas para Her3 con células efectoras PBMC humanas (E:T 10:1) y concentraciones crecientes de la molécula TCB-Her 3 durante 24 h o 48 h, como se indica. Se representan los valores promedio de triplicados, las barras de error indican la DE. Se calcularon los valores de CE50 por GraphPadPrism: 2,54 pM (24 h) y 0,53 pM (48 h).

FIGURA 33. Lisis de células tumorales, inducida por TCB-Her3, como se determina por la actividad caspasa 3/7 (luminiscencia). Se muestra la señal luminiscente relativa, que se midió como consecuencia de la actividad caspasa 3/7 en células diana con GloSensor para KPL-4-caspasa-3/7 después de 6,5 h de coincubación con PBMC (E:T = 10:1) y diferentes concentraciones de TCB-Her3, como se indica. Se muestran triplicados con DE. Se calculó el valor de CE50 por GraphPadPrism: 0,7 pM.

FIGURA 34. Ilustración de los TCB preparados en el ejemplo 4. (A) "(Fab)₂-CrossFab" con modificaciones de carga (intercambio VH/VL en proteína de unión a CD3, modificación de carga en proteínas de unión a MCSP, EE = 147E, 213E; RK = 123R, 124K), (B) "(Fab)₂-CrossFab" sin modificaciones de carga (intercambio VH/VL en proteína de unión a CD3).

FIGURA 35. Análisis por CE-SDS del TCB con modificaciones de carga preparado en el ejemplo 4 (preparación purificada final): Electroferograma de (Fab)₂-XFab-LC007cv, mostrado en la figura 34A. Carril A = sin reducción, carril B = con reducción.

FIGURA 36. Mediana de intensidades de fluorescencia para la unión de las moléculas TCB a MCSP humano en células MV-3 (izquierda) o a CD3 humano en células Jurkat (derecha), como se mide por citometría de flujo. Se representan los valores de la mediana de fluorescencia, basados en triplicados, incluyendo la DE.

FIGURA 37. Lisis de células tumorales, como se mide por liberación de LDH, tras incubación de células MV-3 positivas para MCSP humano con células efectoras PBMC humanas (E:T 10:1) y concentraciones crecientes de las moléculas TCB durante 24 h (izquierda) o 48 h (derecha). Se representan los valores promedio de triplicados, las barras de error indican la DE.

Descripción detallada de la invención

La invención es como se define en la reivindicación.

Definiciones

Los términos se usan en el presente documento como se usan en general en la técnica, a menos que se defina de otro modo en lo que sigue.

Como se usa en el presente documento, el término "molécula de unión a antígeno" se refiere en su sentido más amplio a una molécula que se une específicamente a un determinante antigénico. Los ejemplos de moléculas de unión a antígeno son inmunoglobulinas y derivados, por ejemplo, fragmentos, de las mismas.

El término "bienespecifica" quiere decir que la molécula de unión a antígeno se puede unir específicamente a al menos dos determinantes antigénicos distintos. Típicamente, una molécula de unión a antígeno bienespecifica comprende dos sitios de unión a antígeno, de los que cada uno es específico para un determinante antigénico diferente. La molécula de unión a antígeno bienespecifica se puede unir simultáneamente a dos determinantes antigénicos, en particular dos determinantes antigénicos expresados en dos células distintas.

El término "valente" como se usa en el presente documento indica la presencia de un número especificado de sitios de unión a antígeno en una molécula de unión a antígeno. Como tal, el término "unión monovalente a un antígeno" indica la presencia de un (y no más de un) sitio de unión a antígeno específico para el antígeno en la molécula de unión a antígeno.

Un "sitio de unión a antígeno" se refiere al sitio, es decir, uno o más residuos aminoácidos, de una molécula de

unión a antígeno que proporciona interacción con el antígeno. Por ejemplo, el sitio de unión a antígeno de un anticuerpo comprende residuos aminoácidos de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR). Una molécula de inmunoglobulina natural típicamente tiene dos sitios de unión a antígeno, una molécula Fab típicamente tiene un único sitio de unión a antígeno.

Como se usa en el presente documento, el término "resto de unión a antígeno" se refiere a una molécula polipeptídica que se une específicamente a un determinante antigénico. El resto de unión a antígeno puede dirigir la entidad a la que se fija (por ejemplo, un segundo resto de unión a antígeno) a un sitio diana, por ejemplo, a un tipo específico de célula tumoral o estroma tumoral que porta el determinante antigénico. El resto de unión a antígeno puede activar la señalización a través de su antígeno diana, por ejemplo, un antígeno del complejo receptor de linfocitos T. Los restos de unión a antígeno incluyen anticuerpos y fragmentos de los mismos como se define además en el presente documento. Los restos de unión a antígeno particulares incluyen un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo, que comprende una región variable de la cadena pesada del anticuerpo y una región variable de la cadena ligera del anticuerpo. En determinados aspectos, los restos de unión a antígeno pueden comprender regiones constantes del anticuerpo como se define además en el presente documento y es conocido en la técnica. Las regiones constantes de la cadena pesada útiles incluyen cualquiera de los cinco isotipos: α , δ , ϵ , γ o μ . Las regiones constantes de la cadena ligera útiles incluyen cualquiera de los dos isotipos: κ y λ .

Como se usa en el presente documento, el término "determinante antigénico" es sinónimo de "antígeno" y "epítipo" y se refiere a un sitio (por ejemplo, un tramo contiguo de aminoácidos o una configuración conformacional constituida por diferentes regiones de aminoácidos no contiguos) en una macromolécula polipeptídica a la que se une un resto de unión a antígeno, formando un complejo de resto de unión a antígeno-antígeno. Los determinantes antigénicos útiles se pueden encontrar, por ejemplo, en las superficies de células tumorales, en las superficies de células infectadas por virus, en las superficies de otras células afectadas, en la superficie de células inmunitarias, libres en suero sanguíneo y/o en la matriz extracelular (MEC). Las proteínas denominadas antígenos en el presente documento (por ejemplo, CD3) pueden ser cualquier forma natural de las proteínas de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos tales como primates (por ejemplo, seres humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique de otro modo. En un modo de realización particular, el antígeno es una proteína humana. Cuando se hace referencia a una proteína específica en el presente documento, el término engloba la proteína no procesada "de longitud completa", así como cualquier forma de la proteína que resulte del procesamiento en la célula. El término también engloba variantes naturales de la proteína, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas. Una proteína humana ejemplar útil como antígeno es CD3, en particular la subunidad épsilon de CD3 (véase UniProt n.º P07766 (versión 130), NCBI RefSeq n.º NP_000724.1, SEQ ID NO: 1 para la secuencia humana; o UniProt n.º Q95LI5 (versión 49), NCBI GenBank n.º BAB71849.1, SEQ ID NO: 2 para la secuencia de macaco cangrejero [*Macaca fascicularis*]). La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de la invención se une a un epítipo de CD3 o un antígeno de célula diana que se conserva entre el CD3 o el antígeno de célula diana de diferentes especies.

Por "unión específica" se quiere decir que la unión es selectiva para el antígeno y se puede discriminar de las interacciones no deseadas o no específicas. La capacidad de un resto de unión a antígeno para unirse a un determinante antigénico específico se puede medir a través de un ensayo de inmuoadsorción enzimática (ELISA) o bien otras técnicas familiares para un experto en la técnica, por ejemplo, la técnica de resonancia de plasmón superficial (SPR) (analizada en un instrumento BIAcore) (Liljeblad *et al.*, Glyco J 17, 323-329 (2000)), y ensayos de unión tradicionales (Heeley, Endocr Res 28, 217-229 (2002)). En un aspecto, la extensión de la unión de un resto de unión a antígeno a una proteína no relacionada es menor que aproximadamente un 10 % de la unión del resto de unión a antígeno al antígeno como se mide, por ejemplo, por SPR. En determinados aspectos, un resto de unión a antígeno que se une al antígeno, o una molécula de unión a antígeno que comprende ese resto de unión a antígeno, tiene una constante de disociación (K_d) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0,1 \text{ nM}$, $\leq 0,01 \text{ nM}$ o $\leq 0,001 \text{ nM}$ (por ejemplo, 10^{-8} M o menos, por ejemplo, de 10^{-8} M a 10^{-13} M , por ejemplo, de 10^{-9} M a 10^{-13} M).

"Afinidad" se refiere a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un receptor) y su compañero de unión (por ejemplo, un ligando). A menos que se indique de otro modo, como se usa en el presente documento, "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de un par de unión (por ejemplo, un resto de unión a antígeno y un antígeno, o un receptor y su ligando). La afinidad de una molécula X por su compañera Y se puede representar, en general, por la constante de disociación (K_d), que es la proporción de las constantes de velocidad de disociación y asociación (k_{dis} y k_{as} , respectivamente). Por tanto, las afinidades equivalentes pueden comprender diferentes constantes de velocidad, siempre que la proporción de las constantes de velocidad permanezca igual. La afinidad se puede medir por procedimientos bien establecidos conocidos en la técnica, incluyendo los descritos en el presente documento. Un procedimiento particular para medir la afinidad es la resonancia de plasmón superficial (RPS).

"Unión reducida", por ejemplo, unión reducida a un receptor de Fc, se refiere a una disminución en la afinidad para la interacción respectiva, como se mide, por ejemplo, por RPS. Por claridad, el término incluye también la reducción

de la afinidad hasta cero (o por debajo del límite de detección del procedimiento analítico), es decir, la supresión completa de la interacción. Por el contrario, "unión incrementada" se refiere a un incremento en la afinidad de unión para la interacción respectiva.

Un "antígeno activador de linfocitos T" como se usa en el presente documento se refiere a un determinante antigénico expresado en la superficie de un linfocito T, en particular un linfocito T citotóxico, que puede inducir la activación de linfocitos T tras la interacción con una molécula de unión a antígeno. Específicamente, la interacción de una molécula de unión a antígeno con un antígeno activador de linfocitos T puede inducir la activación de linfocitos T desencadenando la cascada de señalización del complejo receptor de linfocitos T. El antígeno activador de linfocitos T es CD3, en particular la subunidad épsilon de CD3 (véase UniProt n.º P07766 (versión 130), NCBI RefSeq n.º NP_000724.1, SEQ ID NO: 1 para la secuencia humana; o UniProt n.º Q95LI5 (versión 49), NCBI GenBank n.º BAB71849.1, SEQ ID NO: 2 para la secuencia de macaco cangrejero [*Macaca fascicularis*]).

"Activación de linfocitos T" como se usa en el presente documento se refiere a una o más respuestas celulares de un linfocito T, en particular un linfocito T citotóxico, seleccionadas de: proliferación, diferenciación, secreción de citocinas, liberación de moléculas efectoras citotóxicas, actividad citotóxica y expresión de marcadores de activación. Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T de la invención pueden inducir la activación de linfocitos T. Los ensayos adecuados para medir la activación de linfocitos T son conocidos en la técnica descrita en el presente documento.

Un "antígeno de célula diana" como se usa en el presente documento se refiere a un determinante antigénico presentado en la superficie de una célula diana, por ejemplo, una célula en un tumor tal como una célula cancerosa o una célula del estroma tumoral. El antígeno de célula diana es CD20, en particular CD20 humano (véase UniProt n.º P11836).

Como se usa en el presente documento, los términos "primero/a", "segundo/a" o "tercero/a" con respecto a las moléculas Fab, etc., se usan por conveniencia para distinguir cuando hay más de uno de cada tipo de resto. El uso de estos términos no pretende conferir un orden u orientación específico de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T a menos que se establezca explícitamente así.

Una "molécula Fab" se refiere a una proteína que consiste en el dominio VH y CH1 de la cadena pesada (la "cadena pesada de Fab") y el dominio VL y CL de la cadena ligera (la "cadena ligera de Fab") de una inmunoglobulina.

Por "fusionado" se quiere decir que los componentes (por ejemplo, una molécula Fab y una subunidad de dominio Fc) se enlazan por enlaces peptídicos, directamente o bien por medio de uno o más conectores peptídicos.

Como se usa en el presente documento, el término "monocatenaria" se refiere a una molécula que comprende monómeros de aminoácido enlazados linealmente por enlaces peptídicos. En determinados aspectos de la divulgación, uno de los restos de unión a antígeno es una molécula Fab monocatenaria, es decir, una molécula Fab en la que la cadena ligera de Fab y la cadena pesada de Fab se conectan por un conector peptídico para formar una única cadena peptídica. En un aspecto particular de este tipo, el extremo C de la cadena ligera de Fab se conecta al extremo N de la cadena pesada de Fab en la molécula Fab monocatenaria.

Por molécula Fab de "entrecruzamiento" (también denominada "Crossfab") se quiere decir una molécula Fab en la que los dominios variables de la cadena pesada y ligera de Fab se intercambian (es decir, se reemplazan entre sí), es decir, la molécula Fab de entrecruzamiento comprende una cadena peptídica compuesta por el dominio variable de la cadena ligera VL y el dominio constante 1 de la cadena pesada CH1 (VL-CH1, en sentido N a C terminal), y una cadena peptídica compuesta por el dominio variable de la cadena pesada VH y el dominio constante de la cadena ligera CL (VH-CL, en sentido N a C terminal). Por claridad, en una molécula Fab de entrecruzamiento en la que los dominios variables de la cadena ligera de Fab y la cadena pesada de Fab se intercambian, la cadena peptídica que comprende el dominio constante 1 de la cadena pesada CH1 se denomina en el presente documento "cadena pesada" de la molécula Fab de entrecruzamiento.

Por el contrario a esto, por una molécula Fab "convencional" se quiere decir una molécula Fab en su formato natural, es decir, que comprende una cadena pesada compuesta por los dominios variable y constante de la cadena pesada (VH-CH1, en sentido N a C terminal), y una cadena ligera compuesta por los dominios variable y constante de la cadena ligera (VL-CL, en sentido N a C terminal).

El término "molécula de inmunoglobulina" se refiere a una proteína que tiene la estructura de un anticuerpo natural. Por ejemplo, las inmunoglobulinas de la clase IgG son glucoproteínas heterotetrámeras de aproximadamente 150.000 daltones, compuestas por dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas que se unen con enlaces disulfuro. Desde el extremo N al C, cada cadena pesada tiene un dominio variable (VH), también llamado dominio pesado variable o región variable de la cadena pesada, seguido de tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3), también llamados región constante de la cadena pesada. De forma similar, desde el extremo N al C, cada cadena ligera tiene un dominio variable (VL), también llamado dominio ligero variable o región variable de la cadena ligera, seguido de un dominio constante ligero (CL), también llamado región constante de la cadena ligera. La cadena

pesada de una inmunoglobulina se puede asignar a uno de cinco tipos, llamados α (IgA), δ (IgD), ϵ (IgE), γ (IgG) o μ (IgM), de los que algunos se pueden dividir además en subtipos, por ejemplo, γ_1 (IgG₁), γ_2 (IgG₂), γ_3 (IgG₃), γ_4 (IgG₄), α_1 (IgA₁) y α_2 (IgA₂). La cadena ligera de una inmunoglobulina se puede asignar a uno de dos tipos, llamados kappa (κ) y lambda (λ), en base a la secuencia de aminoácidos de su dominio constante. Una inmunoglobulina

consiste esencialmente en dos moléculas Fab y un dominio Fc, enlazados por medio de la región bisagra de inmunoglobulina.

El término "anticuerpo" en el presente documento se usa en el sentido más amplio y engloba diversas estructuras de anticuerpo, incluyendo pero sin limitarse a anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales y fragmentos de anticuerpo siempre que presenten la actividad de unión a antígeno deseada.

Un "fragmento de anticuerpo" se refiere a una molécula distinta de un anticuerpo intacto que comprende una porción de un anticuerpo intacto que se une al antígeno al que se une el anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen pero no se limitan a Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, diacuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpo monocatenarias (por ejemplo, scFv) y anticuerpos de dominio único. Para una revisión de determinados fragmentos de anticuerpo, véase Hudson *et al.*, Nat Med 9, 129-134 (2003). Para una revisión de los fragmentos scFv, véase, por ejemplo, Plückthun, en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994); véanse también el documento WO 93/16185; y las patentes de EE. UU. n.ºs 5.571.894 y 5.587.458. Para un análisis de los fragmentos Fab y F(ab')₂ que comprenden residuos del epitopo de unión al receptor de rescate y que tienen una semivida *in vivo* incrementada, véase la patente de EE. UU. n.º 5.869.046. Los diacuerpos son fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno que pueden ser bivalentes o biespecíficos. Véanse, por ejemplo, el documento EP 404.097; el documento WO 1993/01161; Hudson *et al.*, Nat Med 9, 129-134 (2003); y Hollinger *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 90, 6444-6448 (1993). También se describen triacuerpos y tetracuerpos en Hudson *et al.*, Nat Med 9, 129-134 (2003). Los anticuerpos de dominio único son fragmentos de anticuerpo que comprenden todo o una porción del dominio variable de la cadena pesada o todo o una porción del dominio variable de la cadena ligera de un anticuerpo. En determinados aspectos de la divulgación, un anticuerpo de dominio único es un anticuerpo de dominio único humano (Domantis, Inc., Waltham, MA; véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 6.248.516 B1). Se pueden preparar fragmentos de anticuerpo por diversas técnicas, incluyendo pero sin limitarse a digestión proteolítica de un anticuerpo intacto, así como producción por células huésped recombinantes (por ejemplo, *E. coli* o fago), como se describe en el presente documento.

El término "dominio de unión a antígeno" se refiere a la parte de un anticuerpo que comprende el área que se une específicamente a y es complementaria a parte de o a todo un antígeno. Se puede proporcionar un dominio de unión a antígeno, por ejemplo, por uno o más dominios variables de anticuerpo (también llamados regiones variables de anticuerpo). En particular, un dominio de unión a antígeno comprende un dominio variable de la cadena ligera (VL) de anticuerpo y un dominio variable de la cadena pesada (VH) de anticuerpo.

El término "región variable" o "dominio variable" se refiere al dominio de una cadena pesada o ligera de anticuerpo que está implicado en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y la cadena ligera (VH y VL, respectivamente) de un anticuerpo natural tienen, en general, estructuras similares, comprendiendo cada dominio cuatro regiones estructurales (FR) conservadas y tres regiones hipervariables (HVR). Véase, por ejemplo, Kindt *et al.*, Kuby Immunology, 6.ª ed., W.H. Freeman and Co., página 91 (2007). Un dominio VH o VL único puede ser suficiente para conferir especificidad de unión a antígeno.

El término "región hipervariable" o "HVR", como se usa en el presente documento, se refiere a cada una de las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en secuencia y/o forman bucles estructuralmente definidos ("bucles hipervariables"). En general, los anticuerpos tetracatenarios naturales comprenden seis HVR; tres en el VH (H1, H2, H3) y tres en el VL (L1, L2, L3). Las HVR comprenden, en general, residuos aminoácidos de los bucles hipervariables y/o de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR), siendo las últimas las de mayor variabilidad de secuencia y/o estando implicadas en el reconocimiento de antígeno. Con la excepción de CDR1 en VH, las CDR comprenden, en general, los residuos aminoácidos que forman los bucles hipervariables. Las regiones hipervariables (HVR) también se denominan "regiones determinantes de la complementariedad" (CDR), y estos términos se usan en el presente documento de manera intercambiable en referencia a porciones de la región variable que forman las regiones de unión a antígeno. Esta región particular se ha descrito por Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) y por Chothia *et al.*, J Mol Biol 196:901-917 (1987), donde las definiciones incluyen la superposición o subconjuntos de residuos aminoácidos cuando se comparan entre sí. No obstante, se pretende que la aplicación de cualquier definición para referirse a una CDR de un anticuerpo o variantes del mismo esté dentro del alcance del término como se define y usa en el presente documento. Los residuos aminoácidos apropiados que engloban las CDR, como se define por cada una de las referencias citadas anteriormente, se exponen a continuación en la tabla 1 como comparación. Los números de residuos exactos que engloba una CDR particular variarán dependiendo de la secuencia y tamaño de la CDR. Los expertos en la técnica pueden determinar de forma rutinaria qué residuos comprenden una CDR particular dada la secuencia de aminoácidos de la región variable del anticuerpo. Las secuencias de CDR dadas en el presente documento en general son de acuerdo con la definición de Kabat.

TABLA 1. Definiciones de CDR¹

CDR	Kabat	Chothia	AbM ²
CDR1 de V _H	31-35	26-32	26-35
CDR2 de V _H	50-65	52-58	50-58
CDR3 de V _H	95-102	95-102	95-102
CDR1 de V _L	24-34	26-32	24-34
CDR2 de V _L	50-56	50-52	50-56
CDR3 de V _L	89-97	91-96	89-97

¹ La numeración de todas las definiciones de CDR en la tabla 1 es de acuerdo con las convenciones de numeración expuestas por Kabat *et al.*, (véase a continuación).
² "AbM" con una "b" minúscula, como se usa en la tabla 1, se refiere a las CDR como se define por el programa informático de modelado de anticuerpos "AbM" de Oxford Molecular.

- 5 Kabat *et al.*, también definieron un sistema de numeración para las secuencias de la región variable que es aplicable a cualquier anticuerpo. Un experto en la técnica puede asignar inequívocamente este sistema de "numeración de Kabat" a cualquier secuencia de la región variable, sin depender de ningún dato experimental más allá de la propia secuencia. Como se usa en el presente documento en relación con secuencias de regiones variables, "numeración de Kabat" se refiere al sistema de numeración expuesto por Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991).
- 10 A menos que se especifique de otro modo, las referencias a la numeración de posiciones de residuos aminoacídicos específicos en una región variable del anticuerpo son de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat.
- 15 Como se usa en el presente documento, las posiciones de aminoácidos de todas las regiones y dominios constantes de la cadena pesada y ligera se numeran de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat descrito en Kabat, *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) y se denomina "numeración de acuerdo con Kabat" o "numeración de Kabat" en el presente documento. Específicamente, el sistema de numeración de Kabat (véanse las páginas 647-660 de Kabat, *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)) se usa para el dominio constante de la cadena ligera CL del isotipo kappa y lambda y el sistema de numeración del índice EU de Kabat (véanse las páginas 661-723) se usa para los dominios constantes de la cadena pesada (CH1, bisagra, CH2 y CH3), lo que se aclara además en el presente documento refiriéndose a la "numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat" en este caso.
- 20 Las secuencias polipeptídicas del listado de secuencias no se numeran de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat. Sin embargo, está bien dentro de la habilidad del experto en la técnica convertir la numeración de las secuencias del listado de secuencias a la numeración de Kabat.
- 25 "Región estructural" o "FR" se refiere a residuos del dominio variable distintos de los residuos de la región hipervariable (HVR). La FR de un dominio variable consiste, en general, en cuatro dominios de FR: FR1, FR2, FR3 y FR4. En consecuencia, las secuencias de HVR y FR aparecen, en general, en la siguiente secuencia en VH (o VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.
- 30 La "clase" de un anticuerpo o inmunoglobulina se refiere al tipo de dominio constante o región constante poseído por su cadena pesada. Existen cinco clases principales de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas se pueden dividir además en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se llaman α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente.
- 35 El término "dominio Fc" o "región Fc" en el presente documento se usa para definir una región C terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina que contiene al menos una porción de la región constante. El término incluye regiones Fc de secuencia natural y regiones Fc variantes. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de IgG podrían variar ligeramente, la región Fc de la cadena pesada de IgG humana se define normalmente por extenderse de Cys226, o de Pro230, al extremo carboxílico de la cadena pesada.
- 40 Sin embargo, los anticuerpos producidos por células huésped pueden experimentar escisión posteriormente a la traducción de uno o más, en particular uno o dos, aminoácidos del extremo C de la cadena pesada. Por lo tanto, un anticuerpo producido por una célula huésped por expresión de una molécula de ácido nucleico específica que codifica una cadena pesada de longitud completa puede incluir la cadena pesada de longitud completa, o puede incluir una variante escindida de la cadena pesada de longitud completa (también denominada en el presente documento "cadena pesada variante escindida"). Este puede ser el caso cuando los dos aminoácidos C terminales finales de la cadena pesada son glicina (G446) y lisina (K447, numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).
- 45
- 50

Por lo tanto, la lisina C terminal (Lys447), o la glicina (Gly446) y lisina (K447) C terminales, de la región Fc pueden estar presentes o no. Las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesadas que incluyen los dominios Fc (o una subunidad de un dominio Fc como se define en el presente documento) se indican en el presente documento sin el dipéptido glicina-lisina C terminal, si no se indica de otro modo. En un aspecto de la divulgación, una cadena pesada que incluye una subunidad de un dominio Fc como se especifica en el presente documento, comprendida en una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de acuerdo con la invención, comprende un dipéptido glicina-lisina C terminal adicional (G446 y K447, numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). En un aspecto de la divulgación, una cadena pesada que incluye una subunidad de un dominio Fc como se especifica en el presente documento, comprendida en una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de acuerdo con la invención, comprende un residuo de glicina C terminal adicional (G446, numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). Las composiciones de la divulgación, tales como las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento, comprenden una población de moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T de la invención. La población de moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T puede comprender moléculas que tienen una cadena pesada de longitud completa y moléculas que tienen una cadena pesada variante escindida. La población de moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T puede consistir en una mezcla de moléculas que tienen una cadena pesada de longitud completa y moléculas que tienen una cadena pesada variante escindida, en la que al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 % o al menos un 90 % de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T tiene una cadena pesada variante escindida. En un aspecto para la divulgación, una composición que comprende una población de moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T de la invención comprende una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende una cadena pesada que incluye una subunidad de un dominio Fc como se especifica en el presente documento con un dipéptido glicina-lisina C terminal adicional (G446 y K447, numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). En un aspecto de la divulgación, una composición que comprende una población de moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T de la invención comprende una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende una cadena pesada que incluye una subunidad de un dominio Fc como se especifica en el presente documento con un residuo de glicina C terminal adicional (G446, numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). En un aspecto de la divulgación, una composición de este tipo comprende una población de moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T compuesta de moléculas que comprenden una cadena pesada que incluye una subunidad de un dominio Fc como se especifica en el presente documento; moléculas que comprenden una cadena pesada que incluye una subunidad de un dominio Fc como se especifica en el presente documento con un residuo de glicina C terminal adicional (G446, numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat); y moléculas que comprenden una cadena pesada que incluye una subunidad de un dominio Fc como se especifica en el presente documento con un dipéptido glicina-lisina C terminal adicional (G446 y K447, numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). A menos que se especifique de otro modo en el presente documento, la numeración de residuos aminoácidos en la región Fc o región constante es de acuerdo con el sistema de numeración EU, también llamado índice EU, como se describe en Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991 (véase también anteriormente). Una "subunidad" de un dominio Fc como se usa en el presente documento se refiere a uno de los dos polipéptidos que forman el dominio Fc dimérico, es decir, un polipéptido que comprende regiones constantes C terminales de una cadena pesada de inmunoglobulina, que se puede autoasociar de forma estable. Por ejemplo, una subunidad de un dominio Fc de IgG comprende un dominio constante CH2 de IgG y uno CH3 de IgG.

Una "modificación que promueve la asociación de la primera y la segunda subunidad del dominio Fc" es una manipulación del esqueleto peptídico o las modificaciones posteriores a la traducción de una subunidad del dominio Fc que reduce o evita la asociación de un polipéptido que comprende la subunidad del dominio Fc con un polipéptido idéntico para formar un homodímero. Una modificación que promueve la asociación como se usa en el presente documento, en particular, incluye modificaciones separadas realizadas en cada una de las dos subunidades del dominio Fc que se desean asociar (es decir, la primera y la segunda subunidad del dominio Fc), en la que las modificaciones son complementarias entre sí para promover la asociación de las dos subunidades del dominio Fc. Por ejemplo, una modificación que promueve la asociación puede alterar la estructura o carga de una o ambas de las subunidades del dominio Fc para hacer que su asociación sea estérica o electrostáticamente favorable, respectivamente. Por tanto, se produce (hetero)dimerización entre un polipéptido que comprende la primera subunidad del dominio Fc y un polipéptido que comprende la segunda subunidad del dominio Fc, que podrían no ser idénticos en el sentido de que otros componentes fusionados con cada una de las subunidades (por ejemplo, restos de unión a antígeno) no son los mismos. La modificación que promueve asociación comprende una mutación aminoácida en el dominio Fc, específicamente una sustitución aminoácida. La modificación que promueve asociación comprende una mutación aminoácida separada, específicamente una sustitución aminoácida, en cada una de las dos subunidades del dominio Fc.

El término "funciones efectoras" se refiere a las actividades biológicas atribuibles a la región Fc de un anticuerpo, que varían con el isotipo del anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpos incluyen: unión a C1q y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), unión al receptor de Fc, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP), secreción de citocinas, captación de antígenos mediada por el complejo inmunitario por células presentadoras de antígenos, regulación por disminución

de receptores de superficie celular (por ejemplo, receptor de linfocitos B) y activación de linfocitos B.

Como se usa en el presente documento, se considera que los términos "genomanipular, genomanipulado, genomanipulación" incluyen cualquier manipulación del esqueleto peptídico o las modificaciones posteriores a la traducción de un polipéptido natural o recombinante o fragmento del mismo. La genomanipulación incluye modificaciones de la secuencia de aminoácidos, del patrón de glucosilación o del grupo de cadena lateral de aminoácidos individuales, así como combinaciones de estos enfoques.

El término "mutación aminoacídica", como se usa en el presente documento quiere decir que engloba sustituciones, deleciones, inserciones y modificaciones aminoacídicas. Se puede realizar cualquier combinación de sustitución, deleción, inserción y modificación para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas, por ejemplo, unión reducida a un receptor de Fc o asociación incrementada con otro péptido. Las deleciones e inserciones en la secuencia de aminoácidos incluyen deleciones e inserciones de aminoácidos amino y/o carboxiterminales. Las mutaciones aminoacídicas particulares son sustituciones aminoacídicas. Con el propósito de alterar, por ejemplo, las características de unión de una región Fc, son en particular preferentes las sustituciones aminoacídicas no conservadoras, es decir, el reemplazo de un aminoácido por otro aminoácido que tiene propiedades estructurales y/o químicas diferentes. Las sustituciones aminoacídicas incluyen el reemplazo por aminoácidos no naturales o por derivados de aminoácidos naturales de los veinte aminoácidos estándar (por ejemplo, 4-hidroxiprolina, 3-metilhistidina, ornitina, homoserina, 5-hidroxilisina). Se pueden generar mutaciones aminoacídicas usando procedimientos genéticos o químicos bien conocidos en la técnica. Los procedimientos genéticos pueden incluir mutagénesis dirigida a sitio, PCR, síntesis génica y similares. Se contempla que también pueden ser útiles procedimientos de alteración del grupo de cadena lateral de un aminoácido por procedimientos distintos de genomanipulación, tales como modificación química. Se pueden usar diversas designaciones en el presente documento para indicar la misma mutación aminoacídica. Por ejemplo, se puede indicar una sustitución de prolina en la posición 329 del dominio Fc a glicina como 329G, G329, G₃₂₉, P329G o Pro329Gly.

Como se usa en el presente documento, el término "polipéptido" se refiere a una molécula compuesta por monómeros (aminoácidos) enlazados linealmente por enlaces amida (también conocidos como enlaces peptídicos). El término "polipéptido" se refiere a cualquier cadena de dos o más aminoácidos, y no se refiere a una longitud específica del producto. Por tanto, los péptidos, dipéptidos, tripéptidos, oligopéptidos, "proteína", "cadena de aminoácidos" o cualquier otro término usado para referirse a una cadena de dos o más aminoácidos se incluyen dentro de la definición de "polipéptido", y el término "polipéptido" se puede usar en lugar de, o de manera intercambiable con, cualquiera de estos términos. El término "polipéptido" también pretende referirse a los productos de modificaciones posteriores a la expresión del polipéptido, incluyendo sin limitación glucosilación, acetilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos protectores/bloqueadores conocidos, escisión proteolítica o modificación por aminoácidos no naturales. Un polipéptido se puede derivar de una fuente biológica natural o producir por tecnología recombinante, pero no se traduce necesariamente a partir de una secuencia de ácido nucleico designada. Se puede generar de cualquier manera, incluyendo por síntesis química. Un polipéptido de la divulgación puede ser de un tamaño de aproximadamente 3 o más, 5 o más, 10 o más, 20 o más, 25 o más, 50 o más, 75 o más, 100 o más, 200 o más, 500 o más, 1000 o más, o 2000 o más aminoácidos. Los polipéptidos pueden tener una estructura tridimensional definida, aunque no tienen necesariamente dicha estructura. Los polipéptidos con una estructura tridimensional definida se denominan plegados, y los polipéptidos que no poseen una estructura tridimensional definida, sino que pueden adoptar un gran número de conformaciones diferentes, se denominan desplegados.

Por polipéptido "aislado" o variante o derivado del mismo se pretende un polipéptido que no está en su medio natural. No se requiere ningún nivel de purificación particular. Por ejemplo, un polipéptido aislado se puede retirar de su entorno natural. Los polipéptidos y proteínas producidos de forma recombinante expresados en células huésped se consideran aislados para el propósito de la divulgación, ya que son polipéptidos naturales o recombinantes que se han separado, fraccionado o purificado parcial o sustancialmente por cualquier técnica adecuada.

El "porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" con respecto a una secuencia polipeptídica de referencia se define como el porcentaje de residuos aminoacídicos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos aminoacídicos en la secuencia polipeptídica de referencia, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. Se puede lograr la alineación para los propósitos de determinación del porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos de diversas formas que están dentro de la habilidad en la técnica, por ejemplo, usando un programa informático disponible públicamente, tal como el programa informático BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar parámetros apropiados para alinear secuencias, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr la alineación máxima sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan. Sin embargo, para los propósitos en el presente documento, se generan valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos usando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 se creó por Genentech, Inc., y el código fuente se ha presentado con la documentación de

usuario en la Oficina de Derechos de Autor de EE. UU., Washington D.C., 20559, donde se ha registrado con el n.º de registro de derechos de autor de EE. UU. TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible públicamente de Genentech, Inc., South San Francisco, California, o se puede compilar a partir del código fuente. El programa ALIGN-2 se debe compilar para su uso en un sistema operativo UNIX, incluyendo UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias se establecen por el programa ALIGN-2 y no varían. En situaciones donde se emplea ALIGN-2 para las comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos dada A con respecto a, con o frente a una secuencia de aminoácidos dada B (que se puede parafrasear de forma alternativa como una secuencia de aminoácidos dada A que tiene o comprende un determinado % de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a, con o frente a una secuencia de aminoácidos dada B) se calcula como sigue:

100 veces la fracción X/Y

donde X es el número de residuos aminoacídicos puntuados como emparejamientos idénticos por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en esa alineación del programa de A y B, y donde Y es el número total de residuos aminoacídicos en B. Se apreciará que si la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A con respecto a B no igualará el % de identidad de secuencia de aminoácidos de B con respecto a A. A menos que se establezca específicamente de otro modo, todos los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos usados en el presente documento se obtienen como se describe en el párrafo inmediatamente precedente usando el programa informático ALIGN-2.

El término "polinucleótido" se refiere a una molécula o construcción de ácido nucleico aislada, por ejemplo, ARN mensajero (ARNm), ARN derivado de virus o ADN plasmídico (ADNp). Un polinucleótido puede comprender un enlace fosfodiéster convencional o un enlace no convencional (por ejemplo, un enlace amida, tal como se encuentra en los ácidos peptidónucleicos (APN)). El término "molécula de ácido nucleico" se refiere a uno cualquiera o más segmentos de ácido nucleico, por ejemplo, fragmentos de ADN o ARN, presentes en un polinucleótido.

Por molécula de ácido nucleico o polinucleótido "aislado" se pretende una molécula de ácido nucleico, ADN o ARN que se ha retirado de su entorno natural. Por ejemplo, un polinucleótido recombinante que codifica un polipéptido contenido en un vector se considera aislado para los propósitos de la presente divulgación. Otros ejemplos de un polinucleótido aislado incluyen polinucleótidos recombinantes mantenidos en células huésped heterógenas o polinucleótidos (parcial o sustancialmente) purificados en solución. Un polinucleótido aislado incluye una molécula polinucleotídica contenida en células que contienen normalmente la molécula polinucleotídica, pero la molécula polinucleotídica está presente de forma extracromosómica o en una localización cromosómica que es diferente de su localización cromosómica natural. Las moléculas de ARN aislado incluyen transcritos de ARN *in vivo* o *in vitro* de la presente divulgación, así como formas de hebras positivas y negativas y formas bicatenarias. Los polinucleótidos o ácidos nucleicos aislados de acuerdo con la presente divulgación incluyen además dichas moléculas producidas sintéticamente. Además, un polinucleótido o un ácido nucleico puede ser o puede incluir un elemento regulador tal como un promotor, sitio de unión a ribosoma o un finalizador de la transcripción.

Por un ácido nucleico o polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos al menos, por ejemplo, un 95 % "idéntica" a una secuencia de nucleótidos de referencia de la presente divulgación, se pretende que la secuencia de nucleótidos del polinucleótido es idéntica a la secuencia de referencia excepto en que la secuencia polinucleotídica puede incluir hasta cinco mutaciones puntuales por cada 100 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de referencia. En otras palabras, para obtener un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos al menos un 95 % idéntica a una secuencia de nucleótidos de referencia, hasta un 5 % de los nucleótidos en la secuencia de referencia se puede delecionar o sustituir con otro nucleótido, o un número de nucleótidos hasta un 5 % de los nucleótidos totales en la secuencia de referencia se puede insertar en la secuencia de referencia. Estas alteraciones de la secuencia de referencia se pueden producir en las posiciones terminales 5' o 3' de la secuencia de nucleótidos de referencia o en cualquier parte entre esas posiciones terminales, intercaladas individualmente entre residuos en la secuencia de referencia o bien en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia. Como cuestión práctica, se puede determinar convencionalmente que cualquier secuencia polinucleotídica particular es al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a una secuencia de nucleótidos de la presente divulgación, usando programas informáticos conocidos, tales como los analizados anteriormente para polipéptidos (por ejemplo, ALIGN-2).

El término "casete de expresión" se refiere a un polinucleótido generado de forma recombinante o sintética, con una serie de elementos de ácido nucleico especificados que permiten la transcripción de un ácido nucleico particular en una célula diana. El casete de expresión recombinante se puede incorporar en un plásmido, cromosoma, ADN mitocondrial, ADN de plásmido, virus o fragmento de ácido nucleico. Típicamente, la porción de casete de expresión recombinante de un vector de expresión incluye, entre otras secuencias, una secuencia de ácido nucleico que se va a transcribir y un promotor. En determinados aspectos de la divulgación, el casete de expresión comprende secuencias polinucleotídicas que codifican moléculas de unión a antígeno biespecíficas de la invención o fragmentos de las mismas.

El término "vector" o "vector de expresión" es sinónimo de "construcción de expresión" y se refiere a una molécula de ADN que se usa para introducir y dirigir la expresión de un gen específico al que se asocia de forma funcional en una célula diana. El término incluye el vector como una estructura de ácido nucleico autorreplicante así como el vector incorporado en el genoma de una célula huésped en la que se ha introducido. El vector de expresión de la presente divulgación comprende un casete de expresión. Los vectores de expresión permiten la transcripción de grandes cantidades de ARNm estable. Una vez que el vector de expresión está en el interior de la célula diana, la molécula de ácido ribonucleico o proteína que se codifica por el gen se produce por el mecanismo de transcripción y/o traducción celular. En un aspecto de la divulgación, el vector de expresión comprende un casete de expresión que comprende secuencias polinucleotídicas que codifican moléculas de unión a antígeno biespecíficas de la invención o fragmentos de las mismas. Los términos "célula huésped", "línea de células huésped" y "cultivo de células huésped" se usan de manera intercambiable y se refieren a células en las que se ha introducido ácido nucleico exógeno, incluyendo la descendencia de dichas células. Las células huésped incluyen "transformantes" y "células transformadas", que incluyen la célula transformada principal y la descendencia derivada de la misma, independientemente del número de pases. La descendencia puede no ser completamente idéntica en contenido de ácido nucleico a una célula original, sino que puede contener mutaciones. La descendencia mutante que tiene la misma función o actividad biológica que la cribada o seleccionada en la célula transformada originalmente se incluye en el presente documento. Una célula huésped es cualquier tipo de sistema celular que se puede usar para generar las moléculas de unión a antígeno biespecíficas de la presente invención. Las células huésped incluyen células cultivadas, por ejemplo, células cultivadas de mamífero, tales como células CHO, células BHK, células NS0, células SP2/0, células de mieloma YO, células de mieloma de ratón P3X63, células PER, células PER.C6 o células de hibridoma, células de levadura, células de insecto y células vegetales, por nombrar solo unas pocas, pero también células comprendidas dentro de un animal transgénico, planta transgénica o tejido animal o vegetal cultivado.

Un "receptor de Fc activador" es un receptor de Fc que, tras el acoplamiento por un dominio Fc de un anticuerpo, provoca acontecimientos de señalización que estimulan a la célula portadora del receptor para que realice funciones efectoras. Los receptores de Fc activadores humanos incluyen FcγRIIIa (CD16a), FcγRI (CD64), FcγRIIa (CD32) y FcαRI (CD89).

La citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) es un mecanismo inmunitario que da lugar a la lisis de células diana recubiertas de anticuerpo por células efectoras inmunitarias. Las células diana son células a las que se unen específicamente anticuerpos o derivados de los mismos que comprenden una región Fc, en general, por medio de la parte proteica que es N terminal a la región Fc. Como se usa en el presente documento, el término "ADCC reducida" se define como una reducción en el número de células diana que se lisan en un tiempo dado, a una concentración de anticuerpo dada en el medio circundante a las células diana, por el mecanismo de ADCC definido anteriormente, y/o bien un incremento en la concentración de anticuerpo en el medio circundante a las células diana, requerido para lograr la lisis de un número dado de células diana en un tiempo dado, por el mecanismo de ADCC. La reducción en la ADCC es relativa a la ADCC mediada por el mismo anticuerpo producido por el mismo tipo de células huésped, usando los mismos procedimientos de producción, purificación, formulación y almacenamiento estándar (que son conocidos para los expertos en la técnica), pero que no se ha genomanipulado. Por ejemplo, la reducción en ADCC mediada por un anticuerpo que comprende en su dominio Fc una sustitución aminoacídica que reduce la ADCC es relativa a la ADCC mediada por el mismo anticuerpo sin esta sustitución aminoacídica en el dominio Fc. Los ensayos adecuados para medir la ADCC son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la publicación PCT n.º WO 2006/082515 o la publicación PCT n.º WO 2012/130831).

Una "cantidad eficaz" de un agente se refiere a la cantidad que es necesaria para dar como resultado un cambio fisiológico en la célula o tejido al que se administra.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un agente, por ejemplo, una composición farmacéutica, se refiere a una cantidad eficaz, en dosificaciones y durante períodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico o profiláctico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente, por ejemplo, elimina, disminuye, retrasa, minimiza o evita los efectos adversos de una enfermedad.

Un "individuo" o "sujeto" es un mamífero. Los mamíferos incluyen, pero no se limitan a, animales domésticos (por ejemplo, vacas, ovejas, gatos, perros y caballos), primates (por ejemplo, seres humanos y primates no humanos, tales como monos), conejos y roedores (por ejemplo, ratones y ratas). En particular, el individuo o sujeto es un ser humano.

El término "composición farmacéutica" se refiere a una preparación que está en dicha forma que permite que la actividad biológica de un ingrediente activo contenido en la misma sea eficaz, y que no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos para un sujeto al que se le administraría la formulación.

Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un ingrediente en una composición farmacéutica, distinto de un ingrediente activo, que no es tóxico para un sujeto. Un vehículo farmacéuticamente aceptable incluye, pero

no se limita a, un tampón, excipiente, estabilizante o conservante.

Como se usa en el presente documento, "tratamiento" (y variaciones gramaticales del mismo tales como "tratar" o "que trata") se refiere a la intervención clínica en un intento de alterar la evolución natural de una enfermedad en el individuo que se está tratando, y que se puede realizar para la profilaxis o bien durante el transcurso de análisis clínicos. Los efectos deseables del tratamiento incluyen, pero no se limitan a, evitar la aparición o recidiva de la enfermedad, alivio de los síntomas, disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, evitar la metástasis, disminuir la tasa de progresión de la enfermedad, mejora o atenuación del grado de actividad de la enfermedad y remisión o pronóstico mejorado. En algunos aspectos de la invención, las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T de la invención se usan para retrasar la aparición de una enfermedad o para ralentizar el progreso de una enfermedad.

El término "prospecto del envase" se usa para referirse a las instrucciones incluidas habitualmente en los envases comerciales de productos terapéuticos que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosificación, administración, politerapia, contraindicaciones y/o advertencias en relación con el uso de dichos productos terapéuticos.

Descripción detallada de la invención y la divulgación

La invención es como se define en la reivindicación.

La invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T con propiedades favorables para aplicación terapéutica, en particular con producibilidad mejorada (por ejemplo, con respecto a la pureza, el rendimiento). Las sustituciones aminoacídicas en moléculas Fab comprendidas en las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T de la invención son en particular eficaces en la reducción del emparejamiento incorrecto de cadenas ligeras con cadenas pesadas no coincidentes (productos secundarios de tipo Bence-Jones), lo que se puede producir en la producción de moléculas de unión a antígeno bi/multiespecíficas basadas en Fab con un intercambio VH/VL en uno (o más, en el caso de moléculas que comprenden más de dos moléculas Fab de unión a antígeno) de sus brazos de unión (véase también el documento WO2015/150447, en particular los ejemplos en el mismo).

La invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T como se define en la reivindicación, comprendiendo dicha molécula

(a) una primera molécula Fab que se une específicamente a CD20

(b) una segunda molécula Fab que se une específicamente a CD3 épsilon, y en la que los dominios variables VL y VH de la cadena ligera de Fab y la cadena pesada de Fab se reemplazan entre sí,

(c) una tercera molécula Fab que se une específicamente a CD20; y

en la que

(c) en el dominio constante CL de la primera molécula Fab en a) y la tercera molécula Fab en el aminoácido en la posición 124 se sustituye por un aminoácido cargado positivamente (numeración de acuerdo con Kabat), y en la que en el dominio constante CH1 de la primera molécula Fab en a) y la tercera molécula en c) el aminoácido en la posición 147 o el aminoácido en la posición 213 se sustituye por un aminoácido cargado negativamente (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En un aspecto de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de acuerdo con la divulgación, en el dominio constante CL de la primera molécula Fab en a) el aminoácido en la posición 124 se sustituye independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración de acuerdo con Kabat) (en un aspecto preferente, independientemente por lisina (K) o arginina (R)), y en el dominio constante CH1 de la primera molécula Fab en a) el aminoácido en la posición 147 o el aminoácido en la posición 213 se sustituye independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En otro aspecto, en el dominio constante CL de la primera molécula Fab en a) el aminoácido en la posición 124 se sustituye independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración de acuerdo con Kabat), y en el dominio constante CH1 de la primera molécula Fab en a) el aminoácido en la posición 147 se sustituye independientemente por ácido glutámico (E), o ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En un aspecto particular, en el dominio constante CL de la primera molécula Fab en a) el aminoácido en la posición 124 se sustituye independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración de acuerdo con Kabat) (en un aspecto preferente, independientemente por lisina (K) o arginina (R)) y el aminoácido en la posición 123 se

sustituye independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración de acuerdo con Kabat) (en un aspecto preferente, independientemente por lisina (K) o arginina (R)), y en el dominio constante CH1 de la primera molécula Fab en a) el aminoácido en la posición 147 se sustituye independientemente por ácido glutámico (E), o ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye independientemente por ácido glutámico (E), o ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En un aspecto más particular, en el dominio constante CL de la primera molécula Fab en a) el aminoácido en la posición 124 se sustituye por lisina (K) (numeración de acuerdo con Kabat) y el aminoácido en la posición 123 se sustituye por lisina (K) o arginina (R) (numeración de acuerdo con Kabat), y en el dominio constante CH1 de la primera molécula Fab en a) el aminoácido en la posición 147 se sustituye por ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye por ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En el dominio constante CL de la primera molécula Fab en a) el aminoácido en la posición 124 se sustituye por lisina (K) (numeración de acuerdo con Kabat) y el aminoácido en la posición 123 se sustituye por arginina (R) (numeración de acuerdo con Kabat), y en el dominio constante CH1 de la primera molécula Fab en a) el aminoácido en la posición 147 se sustituye por ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye por ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

El dominio constante CL de la primera molécula Fab en a) es de isotipo kappa.

De forma alternativa, las sustituciones aminoacídicas de acuerdo con un aspecto de la divulgación se pueden realizar en el dominio constante CL y el dominio constante CH1 de la segunda molécula Fab en b) en lugar de en el dominio constante CL y el dominio constante CH1 de la primera molécula Fab en a). En dichos aspectos particulares, el dominio constante CL de la segunda molécula Fab en b) es de isotipo kappa.

La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de acuerdo con la invención comprende además una tercera molécula Fab que se une específicamente a CD20. Dicha tercera molécula Fab es idéntica a la primera molécula Fab en a). Las sustituciones aminoacídicas están en el dominio constante CL y el dominio constante CH1 de cada una de la primera molécula Fab y la tercera molécula Fab. De forma alternativa, las sustituciones aminoacídicas de acuerdo con aspectos de la divulgación se pueden realizar en el dominio constante CL y el dominio constante CH1 de la segunda molécula Fab en b), pero no en el dominio constante CL y el dominio constante CH1 de la primera molécula Fab y la tercera molécula Fab.

La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de acuerdo con la invención comprende además un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad que se pueden asociar de forma estable.

Formatos de molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T

Los componentes de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de la divulgación se pueden fusionar entre sí en una variedad de configuraciones. Las configuraciones ejemplares se representan en la figura 1.

La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad que se pueden asociar de forma estable.

La segunda molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la primera subunidad del dominio Fc.

En un aspecto de este tipo de la divulgación, la primera molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab. En un aspecto específico de este tipo, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T consiste esencialmente en la primera y la segunda molécula Fab, el dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad, y opcionalmente uno o más conectores peptídicos, en la que la primera molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab, y la segunda molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la primera o la segunda subunidad del dominio Fc. Una configuración de este tipo se representa esquemáticamente en las figuras 1G y 1K. Opcionalmente, la cadena ligera de Fab de la primera molécula Fab y la cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab se pueden fusionar adicionalmente entre sí.

En otro de dicho aspecto, la primera molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la primera o la segunda subunidad del dominio Fc. En un aspecto de este tipo específico, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T consiste esencialmente en la primera y la segunda

molécula Fab, el dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad, y opcionalmente uno o más conectores peptídicos, en la que la primera y la segunda molécula Fab se fusionan cada una en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de una de las subunidades del dominio Fc. Una configuración de este tipo se representa esquemáticamente en las figuras 1A y 1D. La primera y la segunda molécula Fab se pueden fusionar al dominio Fc directamente o a través de un conector peptídico. En un aspecto particular, la primera y la segunda molécula Fab se fusionan cada una al dominio Fc a través de una región bisagra de inmunoglobulina. En un aspecto específico, la región bisagra de inmunoglobulina es una región bisagra de IgG₁ humana, en particular donde el dominio Fc es un dominio Fc de IgG₁.

En otros aspectos de la descripción, la primera molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la primera o segunda subunidad del dominio Fc.

En un aspecto de este tipo, la segunda molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab. En un aspecto de este tipo específico, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T consiste esencialmente en la primera y la segunda molécula Fab, el dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad, y opcionalmente uno o más conectores peptídicos, en la que la segunda molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab, y la primera molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la primera o la segunda subunidad del dominio Fc. Una configuración de este tipo se representa esquemáticamente en las figuras 1H y 1L. Opcionalmente, la cadena ligera de Fab de la primera molécula Fab y la cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab se pueden fusionar adicionalmente entre sí.

Las moléculas Fab se pueden fusionar al dominio Fc o entre sí directamente o a través de un conector peptídico, que comprende uno o más aminoácidos, típicamente, aproximadamente 2-20 aminoácidos. Los conectores peptídicos son conocidos en la técnica y se describen en el presente documento. Los conectores peptídicos no inmunógenos adecuados incluyen, por ejemplo, los conectores peptídicos (G₄S)_n, (SG₄)_n, (G₄S)_n o G₄(SG₄)_n. En general, "n" es un número entero de 1 a 10, típicamente de 2 a 4. En un aspecto, dicho conector peptídico tiene una longitud de al menos 5 aminoácidos, en un aspecto, una longitud de 5 a 100, en otro aspecto, de 10 a 50 aminoácidos. En un aspecto, dicho conector peptídico es (G_xS)_n o (G_xS)_nG_m con G=glicina, S=serina y (x=3, n= 3, 4, 5 o 6 y m=0, 1, 2 o 3) o (x=4, n=2, 3, 4 o 5 y m= 0, 1, 2 o 3), en un aspecto, x=4 y n=2 o 3, en otro aspecto, x=4 y n=2. En un aspecto, dicho conector peptídico es (G₄S)₂. Un conector peptídico en particular adecuado para fusionar las cadenas ligeras de Fab de la primera y la segunda molécula Fab entre sí es (G₄S)₂. Un conector peptídico ejemplar adecuado para conectar las cadenas pesadas de Fab del primer y el segundo fragmentos Fab comprende la secuencia (D)-(G₄S)₂ (SEQ ID NO 11 y 12). Adicionalmente, los conectores pueden comprender (una porción de) una región bisagra de inmunoglobulina. En particular, cuando una molécula Fab se fusiona al extremo N de una subunidad del dominio Fc, se puede fusionar por medio de una región bisagra de inmunoglobulina o una porción de la misma, con o sin un conector peptídico adicional. Una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T con un único resto de unión a antígeno (tal como una molécula Fab) que se puede unir específicamente a un antígeno de célula diana (por ejemplo, como se muestra en la figura 1A, D, G, H, K, L) es útil, en particular en casos donde se espera internalización del antígeno de célula diana tras la unión de un resto de unión a antígeno de alta afinidad. En dichos casos, la presencia de más de un resto de unión a antígeno específico para el antígeno de célula diana puede potenciar la internalización del antígeno de célula diana, reduciendo de este modo su disponibilidad.

En muchos otros casos, sin embargo, será ventajoso tener una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprenda dos o más restos de unión a antígeno (tales como moléculas Fab) específicos para un antígeno de célula diana (véanse los ejemplos mostrados en la figura 1B, 1C, 1E, 1F, 1I, 1J, 1M o 1N), por ejemplo, para optimizar la selectividad hacia el sitio diana o para permitir la reticulación de los antígenos de células diana.

En consecuencia, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de la invención comprende además una tercera molécula Fab que se une específicamente al primer antígeno. El primer antígeno es el antígeno de célula diana. En un aspecto, la tercera molécula Fab es una molécula Fab convencional. La tercera molécula Fab es idéntica a la primera molécula Fab (es decir, la primera y la tercera molécula Fab comprenden las mismas secuencias de aminoácidos de la cadena pesada y ligera y tienen la misma disposición de dominios (es decir, convencional). La segunda molécula Fab se une específicamente al antígeno activador de linfocitos T CD3, y la primera y tercera molécula Fab se unen específicamente a CD20.

En aspectos alternativos de la divulgación, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de la invención comprende además una tercera molécula Fab que se une específicamente al segundo antígeno. En estos aspectos, el segundo antígeno preferentemente es el antígeno de célula diana. En un aspecto de este tipo, la tercera molécula Fab es una molécula Fab de entrecruzamiento (una molécula Fab en la que los dominios variables VH y VL de las cadenas pesada y ligera de Fab se intercambian/reemplazan entre sí). En un aspecto de este tipo, la tercera molécula Fab es idéntica a la segunda molécula Fab (es decir, la segunda y la tercera molécula Fab comprenden las mismas secuencias de aminoácidos de la cadena pesada y ligera y tienen la misma

disposición de dominios (es decir, convencional o de entrecruzamiento)). En un aspecto de este tipo, la primera molécula Fab se une específicamente a un antígeno activador de linfocitos T, en particular CD3, y la segunda y tercera molécula Fab se unen específicamente a un antígeno de célula diana.

- 5 La tercera molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la primera subunidad del dominio Fc.

La segunda y la tercera molécula Fab se fusionan cada una en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de una de las subunidades del dominio Fc, y la primera molécula Fab se fusiona en el extremo C de la
10 cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab. La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T consiste esencialmente en la primera, la segunda y la tercera molécula Fab, el dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad, y uno o más conectores peptídicos, en la que la primera molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab, y la segunda molécula Fab se fusiona en el extremo
15 C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la primera subunidad del dominio Fc, y en la que la tercera molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la segunda subunidad del dominio Fc. Una configuración de este tipo se representa esquemáticamente en la figura 1B y 1E (la tercera molécula Fab es una molécula Fab convencional e idéntica a la primera molécula Fab), y la figura 1I y 1M (aspectos alternativos, en los que la tercera molécula Fab es una molécula Fab de entrecruzamiento y preferentemente idéntica a la segunda molécula Fab). En un aspecto, la segunda y la tercera molécula Fab se pueden fusionar al dominio Fc directamente o a través de un conector peptídico. De acuerdo con la invención, la segunda y la tercera molécula Fab se fusionan cada una al dominio Fc a través de una región bisagra de inmunoglobulina. De acuerdo con la invención, la región bisagra de inmunoglobulina es una región bisagra de IgG₁ humana, y el dominio Fc es un dominio Fc de IgG₁. En aspectos opcionales de la divulgación, la cadena ligera de Fab de la primera molécula Fab y la cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab, adicionalmente, se pueden fusionar entre sí.
25

En otros aspectos de la divulgación, la primera y la tercera molécula Fab se fusionan cada una en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de una de las subunidades del dominio Fc, y la segunda molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab de la primera
30 molécula Fab. En un aspecto de este tipo específico, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T consiste esencialmente en la primera, la segunda y la tercera molécula Fab, el dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad, y opcionalmente uno o más conectores peptídicos, en la que la segunda molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab, y la primera molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la primera subunidad del dominio Fc, y en la que la tercera molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la segunda subunidad del dominio Fc. Una configuración de este tipo se representa esquemáticamente en la figura 1C y 1F (aspectos particulares, en los que la tercera molécula Fab es una molécula Fab convencional y preferentemente idéntica a la primera molécula Fab) y en la figura 1J y 1N (aspectos alternativos de la divulgación, en los que la tercera molécula Fab es una molécula Fab de entrecruzamiento y preferentemente idéntica a la segunda molécula Fab). La primera y la tercera molécula Fab se
40 pueden fusionar al dominio Fc directamente o a través de un conector peptídico. En un aspecto particular, la primera y la tercera molécula Fab se fusionan cada una al dominio Fc a través de una región bisagra de inmunoglobulina. En un aspecto, la región bisagra de inmunoglobulina es una región bisagra de IgG₁ humana, en particular donde el dominio Fc es un dominio Fc de IgG₁. En un aspecto alternativo de la divulgación, la cadena ligera de Fab de la primera molécula Fab y la cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab, adicionalmente, se pueden fusionar entre sí.
45

En aspectos de la divulgación con configuraciones de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T en la que una molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de cada una de las subunidades del dominio Fc a través de regiones bisagra de inmunoglobulina, las dos moléculas Fab, las regiones bisagra y el dominio Fc forman esencialmente una molécula de inmunoglobulina. En un aspecto particular, la molécula de inmunoglobulina es una inmunoglobulina de la clase IgG. En un aspecto incluso más particular, la inmunoglobulina es una inmunoglobulina de la subclase IgG₁. En otro aspecto, la inmunoglobulina es una inmunoglobulina de la subclase IgG₄. En otro aspecto particular, la inmunoglobulina es una inmunoglobulina humana. En otros aspectos, la inmunoglobulina es una inmunoglobulina quimérica o una inmunoglobulina humanizada.
50
55

En alguna de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de la descripción, la cadena ligera de Fab de la primera molécula Fab y la cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab se fusionan entre sí, opcionalmente por medio de un conector peptídico. Dependiendo de la configuración de la primera y la segunda molécula Fab, la cadena ligera de Fab de la primera molécula Fab se puede fusionar en su extremo C al extremo N de la cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab, o la cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab se puede fusionar en su extremo C al extremo N de la cadena ligera de Fab de la primera molécula Fab. La fusión de las cadenas ligeras de Fab de la primera y la segunda molécula Fab reduce además el emparejamiento incorrecto de cadenas pesada y ligera de Fab no coincidentes, y también reduce el número de plásmidos necesarios para la expresión de algunas de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de
60
65

linfocitos T de la divulgación.

En determinados aspectos, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de acuerdo con la invención comprende un polipéptido en el que la región variable de la cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la región constante de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab (es decir, la segunda molécula Fab comprende una cadena pesada de Fab de entrecruzamiento, en la que la región variable de la cadena pesada se reemplaza por una región variable de la cadena ligera), que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una subunidad del dominio Fc (VL₍₂₎-CH1₍₂₎-CH2-CH3(-CH4)) y un polipéptido en el que la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una subunidad del dominio Fc (VH₍₁₎-CH1₍₁₎-CH2-CH3(-CH4)). En algunos aspectos de la descripción, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende además un polipéptido en el que la región variable de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la región constante de la cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab (VH₍₂₎-CL₍₂₎) y el polipéptido de la cadena ligera de Fab de la primera molécula Fab (VL₍₁₎-CL₍₁₎).

En determinados aspectos, los polipéptidos se enlazan covalentemente, por ejemplo, por un enlace disulfuro.

En algunos aspectos de la divulgación, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende un polipéptido en el que la región variable de la cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la región constante de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab (es decir, la segunda molécula Fab comprende una cadena pesada de Fab de entrecruzamiento, en la que la región variable de la cadena pesada se reemplaza por una región variable de la cadena ligera), que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una subunidad del dominio Fc (VL₍₂₎-CH1₍₂₎-VH₍₁₎-CH1₍₁₎-CH2-CH3(-CH4)). De acuerdo con la invención, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende un polipéptido en el que la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la región variable de la cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la región constante de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab (es decir, la segunda molécula Fab comprende una cadena pesada de Fab de entrecruzamiento, en la que la región variable de la cadena pesada se reemplaza por una región variable de la cadena ligera), que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una subunidad del dominio Fc (VH₍₁₎-CH1₍₁₎-VL₍₂₎-CH1₍₂₎-CH2-CH3(-CH4)).

La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende además un polipéptido de la cadena ligera de Fab de entrecruzamiento de la segunda molécula Fab, en la que la región variable de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab comparte un enlace carboxiterminal con la región constante de la cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab (VH₍₂₎-CL₍₂₎), y el polipéptido de la cadena ligera de Fab de la primera molécula Fab (VL₍₁₎-CL₍₁₎). En otros aspectos de la descripción, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende además un polipéptido en el que la región variable de la cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la región constante de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con el polipéptido de la cadena ligera de Fab de la primera molécula Fab (VL₍₂₎-CH1₍₂₎-VL₍₁₎-CL₍₁₎), o un polipéptido en el que el polipéptido de la cadena ligera de Fab de la primera molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la región variable de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la región constante de la cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab (VL₍₁₎-CL₍₁₎-VH₍₂₎-CL₍₂₎), según sea apropiado.

La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de acuerdo con la invención comprende además un polipéptido en el que la cadena pesada de Fab de una tercera molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una subunidad del dominio Fc (VH₍₃₎-CH1₍₃₎-CH2-CH3(-CH4)) y el polipéptido de la cadena ligera de Fab de una tercera molécula Fab (VL₍₃₎-CL₍₃₎). En determinados aspectos, los polipéptidos se enlazan covalentemente, por ejemplo, por un enlace disulfuro.

En algunos aspectos de la descripción, la primera molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab. En determinados de dichos aspectos, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T no comprende un dominio Fc. En determinados aspectos, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T consiste esencialmente en la primera y la segunda molécula Fab y, opcionalmente, uno o más conectores peptídicos, en la que la primera molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab. Una configuración de este tipo se representa esquemáticamente en las figuras 10 y 1S.

En otros aspectos de la descripción, la segunda molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab. En determinados de dichos aspectos, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T no comprende un dominio Fc. En determinados aspectos, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T consiste

esencialmente en la primera y la segunda molécula Fab y, opcionalmente, uno o más conectores peptídicos, en la que la segunda molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab. Una configuración de este tipo se representa esquemáticamente en las figuras 1P y 1T.

En algunos aspectos de la descripción, la primera molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab, y la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende además una tercera molécula Fab, en la que dicha tercera molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab. En dichos aspectos particulares, dicha tercera molécula Fab es una molécula Fab convencional. En otros de dichos aspectos, dicha tercera molécula Fab es una molécula Fab de entrecruzamiento como se describe en el presente documento, es decir, una molécula Fab en la que los dominios variables VH y VL de las cadenas pesada y ligera de Fab se intercambian/reemplazan entre sí. En determinados de dichos aspectos, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T consiste esencialmente en la primera, la segunda y la tercera molécula Fab y, opcionalmente, uno o más conectores peptídicos, en la que la primera molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab, y la tercera molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab. Una configuración de este tipo se representa esquemáticamente en la figura 1Q y 1U (aspectos particulares, en los que la tercera molécula Fab es una molécula Fab convencional y preferentemente idéntica a la primera molécula Fab).

En algunos aspectos, la primera molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab, y la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende además una tercera molécula Fab, en la que dicha tercera molécula Fab se fusiona en el extremo N de la cadena pesada de Fab al extremo C de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab. En dichos aspectos particulares, dicha tercera molécula Fab es una molécula Fab de entrecruzamiento como se describe en el presente documento, es decir, una molécula Fab en la que los dominios variables VH y VL de las cadenas pesada y ligera de Fab se intercambian/reemplazan entre sí. En otros de dichos aspectos, dicha tercera molécula Fab es una molécula Fab convencional. En determinados de dichos aspectos, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T consiste esencialmente en la primera, la segunda y la tercera molécula Fab y, opcionalmente, uno o más conectores peptídicos, en la que la primera molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab, y la tercera molécula Fab se fusiona en el extremo N de la cadena pesada de Fab al extremo C de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab. Una configuración de este tipo se representa esquemáticamente en la figura 1W y 1Y (aspectos particulares, en los que la tercera molécula Fab es una molécula Fab de entrecruzamiento y preferentemente idéntica a la segunda molécula Fab).

En algunos aspectos, la segunda molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab, y la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende además una tercera molécula Fab, en la que dicha tercera molécula Fab se fusiona en el extremo N de la cadena pesada de Fab al extremo C de la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab. En dichos aspectos particulares, dicha tercera molécula Fab es una molécula Fab convencional. En otros de dichos aspectos, dicha tercera molécula Fab es una molécula Fab de entrecruzamiento como se describe en el presente documento, es decir, una molécula Fab en la que los dominios variables VH y VL de las cadenas pesada y ligera de Fab se intercambian/reemplazan entre sí. En determinados de dichos aspectos, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T consiste esencialmente en la primera, la segunda y la tercera molécula Fab y, opcionalmente, uno o más conectores peptídicos, en la que la segunda molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab, y la tercera molécula Fab se fusiona en el extremo N de la cadena pesada de Fab al extremo C de la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab. Una configuración de este tipo se representa esquemáticamente en la figura 1R y 1V (aspectos particulares, en los que la tercera molécula Fab es una molécula Fab convencional y preferentemente idéntica a la primera molécula Fab).

En algunos aspectos, la segunda molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab, y la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende además una tercera molécula Fab, en la que dicha tercera molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab. En dichos aspectos particulares, dicha tercera molécula Fab es una molécula Fab de entrecruzamiento como se describe en el presente documento, es decir, una molécula Fab en la que los dominios variables VH y VL de las cadenas pesada y ligera de Fab se intercambian/reemplazan entre sí. En otros de dichos aspectos, dicha tercera molécula Fab es una molécula Fab convencional. En determinados de dichos aspectos, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T consiste esencialmente en la primera, la segunda y la tercera molécula Fab y, opcionalmente, uno o más conectores peptídicos, en la que la segunda molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab, y la tercera molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab. Una configuración de este tipo se representa

esquemáticamente en la figura 1X y 1Z (aspectos particulares, en los que la tercera molécula Fab es una molécula Fab de entrecruzamiento y preferentemente idéntica a la primera molécula Fab).

En determinados aspectos, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de acuerdo con la invención comprende un polipéptido en el que la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la región variable de la cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la región constante de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab (es decir, la segunda molécula Fab comprende una cadena pesada de Fab de entrecruzamiento, en la que la región variable de la cadena pesada se reemplaza por una región variable de la cadena ligera) (VH₍₁₎-CH1₍₁₎-VL₍₂₎-CH1₍₂₎). En algunos aspectos, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende además un polipéptido en el que la región variable de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la región constante de la cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab (VH₍₂₎-CL₍₂₎) y el polipéptido de la cadena ligera de Fab de la primera molécula Fab (VL₍₁₎-CL₍₁₎).

En determinados aspectos de la divulgación, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de acuerdo con la invención comprende un polipéptido en el que la región variable de la cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la región constante de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab (es decir, la segunda molécula Fab comprende una cadena pesada de Fab de entrecruzamiento, en la que la región variable de la cadena pesada se reemplaza por una región variable de la cadena ligera), que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab (VL₍₂₎)-CH1₍₂₎-VH₍₁₎-CH1₍₁₎). En algunos aspectos, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende además un polipéptido en el que la región variable de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la región constante de la cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab (VH₍₂₎-CL₍₂₎) y el polipéptido de la cadena ligera de Fab de la primera molécula Fab (VL₍₁₎-CL₍₁₎).

En determinados aspectos, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de acuerdo con la invención comprende un polipéptido en el que la cadena pesada de Fab de una tercera molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la región variable de la cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la región constante de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab (es decir, la segunda molécula Fab comprende una cadena pesada de Fab de entrecruzamiento, en la que la región variable de la cadena pesada se reemplaza por una región variable de la cadena ligera) (VH₍₃₎-CH1₍₃₎-VH₍₁₎-CH1₍₁₎-VL₍₂₎-CH1₍₂₎). En algunos aspectos, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende además un polipéptido en el que la región variable de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la región constante de la cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab (VH₍₂₎-CL₍₂₎) y el polipéptido de la cadena ligera de Fab de la primera molécula Fab (VL₍₁₎-CL₍₁₎). En algunos aspectos, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende además el polipéptido de la cadena ligera de Fab de una tercera molécula Fab (VL₍₃₎-CL₍₃₎). En determinados aspectos de la descripción, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de acuerdo con la invención comprende un polipéptido en el que la región variable de la cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la región constante de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab (es decir, la segunda molécula Fab comprende una cadena pesada de Fab de entrecruzamiento, en la que la región variable de la cadena pesada se reemplaza por una región variable de la cadena ligera), que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la cadena pesada de Fab de una tercera molécula Fab (VL₍₂₎-CH1₍₂₎-VH₍₁₎-CH1₍₁₎-VH₍₃₎-CH1₍₃₎). En algunos aspectos, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende además un polipéptido en el que la región variable de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la región constante de la cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab (VH₍₂₎-CL₍₂₎) y el polipéptido de la cadena ligera de Fab de la primera molécula Fab (VL₍₁₎-CL₍₁₎). En algunos aspectos, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende además el polipéptido de la cadena ligera de Fab de una tercera molécula Fab (VL₍₃₎-CL₍₃₎).

En determinados aspectos de la divulgación, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende un polipéptido en el que la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la región variable de la cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la región constante de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab (es decir, la segunda molécula Fab comprende una cadena pesada de Fab de entrecruzamiento, en la que la región variable de la cadena pesada se reemplaza por una región variable de la cadena ligera), que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la región variable de la cadena ligera de Fab de una tercera molécula Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la región constante de la cadena pesada de Fab de una tercera molécula Fab (es decir, la tercera molécula Fab comprende una cadena pesada de Fab de entrecruzamiento, en la que la región variable de la cadena pesada se reemplaza por una región variable de la cadena ligera) (VH₍₁₎-CH1₍₁₎-VL₍₂₎-CH1₍₂₎-VL₍₃₎-CH1₍₃₎). En algunos

aspectos, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende además un polipéptido en el que la región variable de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la región constante de la cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab (VH₍₂₎-CL₍₂₎) y el polipéptido de la cadena ligera de Fab de la primera molécula Fab (VL₍₁₎-CL₍₁₎). En algunos aspectos, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende además un polipéptido en el que la región variable de la cadena pesada de Fab de una tercera molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la región constante de la cadena ligera de Fab de una tercera molécula Fab (VH₍₃₎-CL₍₃₎).

En determinados aspectos de la divulgación, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende un polipéptido en el que la región variable de la cadena ligera de Fab de una tercera molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la región constante de la cadena pesada de Fab de una tercera molécula Fab (es decir, la tercera molécula Fab comprende una cadena pesada de Fab de entrecruzamiento, en la que la región variable de la cadena pesada se reemplaza por una región variable de la cadena ligera), que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la región variable de la cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la región constante de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab (es decir, la segunda molécula Fab comprende una cadena pesada de Fab de entrecruzamiento, en la que la región variable de la cadena pesada se reemplaza por una región variable de la cadena ligera), que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab (VL₍₃₎-CH1₍₃₎-VL₍₂₎-CH1₍₂₎-VH₍₁₎-CH1₍₁₎). En algunos aspectos, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende además un polipéptido en el que la región variable de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la región constante de la cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab (VH₍₂₎-CL₍₂₎) y el polipéptido de la cadena ligera de Fab de la primera molécula Fab (VL₍₁₎-CL₍₁₎). En algunos aspectos, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende además un polipéptido en el que la región variable de la cadena pesada de Fab de una tercera molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la región constante de la cadena ligera de Fab de una tercera molécula Fab (VH₍₃₎-CL₍₃₎).

De acuerdo con cualquiera de los aspectos de la divulgación, los componentes de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T (por ejemplo, moléculas Fab, dominio Fc) se pueden fusionar directamente o a través de diversos conectores, en particular conectores peptídicos que comprenden uno o más aminoácidos, típicamente aproximadamente 2-20 aminoácidos, que se describen en el presente documento o son conocidos en la técnica. Los conectores peptídicos no inmunógenos adecuados incluyen, por ejemplo, los conectores peptídicos (G₄S)_n, (SG₄)_n, (G₄S)_n o G₄(SG₄)_n, en los que n en general es un número entero de 1 a 10, típicamente de 2 a 4.

Dominio Fc

El dominio Fc de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T consiste en un par de cadenas polipeptídicas que comprenden dominios de la cadena pesada de una molécula de inmunoglobulina. Por ejemplo, el dominio Fc de una molécula de inmunoglobulina G (IgG) es un dímero, del que cada subunidad comprende los dominios constantes de la cadena pesada de IgG CH2 y CH3. Las dos subunidades del dominio Fc se pueden asociar de forma estable entre sí. La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de la invención comprende no más de un dominio Fc.

De acuerdo con la invención, el dominio Fc de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T es un dominio Fc de IgG. El dominio Fc es un dominio Fc de IgG₁. En otro aspecto de la divulgación, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG₄. En un aspecto más específico, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG₄ que comprende una sustitución aminoacídica en la posición S228 (numeración de Kabat), en particular la sustitución aminoacídica S228P. Esta sustitución aminoacídica reduce el intercambio en el brazo Fab *in vivo* de los anticuerpos IgG₄ (véase Stubenrauch *et al.*, Drug Metabolism and Disposition 38, 84-91 (2010)). El dominio Fc es humano. Una secuencia ejemplar de una región Fc de IgG₁ humana se da en SEQ ID NO: 13.

Modificaciones en el dominio Fc que promueven la heterodimerización

Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T de acuerdo con la invención y la divulgación comprenden moléculas Fab diferentes, fusionadas a una o la otra de las dos subunidades del dominio Fc, por tanto, las dos subunidades del dominio Fc están comprendidas típicamente en dos cadenas polipeptídicas no idénticas. La coexpresión recombinante de estos polipéptidos y la posterior dimerización dan lugar a varias combinaciones posibles de los dos polipéptidos. Para mejorar el rendimiento y la pureza de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T en producción recombinante, será ventajoso, por tanto, introducir en el dominio Fc de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T una modificación que promueva la asociación de los polipéptidos deseados.

En consecuencia, el dominio Fc de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de acuerdo con la invención comprende una modificación que promueve la asociación de la primera y la segunda subunidad del dominio Fc. El sitio de interacción proteína-proteína más extensa entre las dos subunidades de un dominio Fc de IgG humana es en el dominio CH3 del dominio Fc. Por tanto, dicha modificación está en el dominio

CH3 del dominio Fc.

Existen varios enfoques para las modificaciones en el dominio CH3 del dominio Fc para garantizar la heterodimerización, que se describen bien, por ejemplo, en los documentos WO 96/27011, WO 98/050431, EP 1870459, WO 2007/110205, WO 2007/147901, WO 2009/089004, WO 2010/129304, WO 2011/90754, WO 2011/143545, WO 2012058768, WO 2013157954, WO 2013096291. Típicamente, en todos de dichos enfoques, el dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc y el dominio CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc se genomanipulan ambos de manera complementaria de modo que cada dominio CH3 (o la cadena pesada que lo comprende) ya no se puede homodimerizar consigo mismo sino que se fuerza a heterodimerizarse con el otro dominio CH3 genomanipulado de forma complementaria (de modo que el primer y segundo dominio CH3 se heterodimerizan y no se forman homodímeros entre los dos primeros o los dos segundos dominios CH3). Estos enfoques diferentes para una heterodimerización de la cadena pesada mejorada se contemplan como alternativas diferentes en combinación con las modificaciones de la cadena pesada-ligera (intercambio/reemplazo de VH y VL en un brazo de unión y la introducción de sustituciones de aminoácidos cargados con cargas opuestas en la interfase CH1/CL) en la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de acuerdo con la divulgación, lo que reduce el emparejamiento incorrecto de la cadena ligera y los productos secundarios de tipo Bence Jones.

De acuerdo con la invención, dicha modificación que promueve la asociación de la primera y la segunda subunidad del dominio Fc es una modificación denominada "botón en ojal", que comprende una modificación de "botón" en una de las dos subunidades del dominio Fc y una modificación de "ojal" en la otra de las dos subunidades del dominio Fc.

La tecnología de botón en ojal se describe, por ejemplo, en el documento US 5.731.168; el documento US 7.695.936; Ridgway *et al.*, Prot Eng 9, 617-621 (1996) y Carter, J Immunol Meth 248, 7-15 (2001). En general, el procedimiento implica introducir una protuberancia ("botón") en la interfase de un primer polipéptido y una cavidad ("ojal") correspondiente en la interfase de un segundo polipéptido, de modo que la protuberancia se puede situar en la cavidad para promover la formación de heterodímeros y dificultar la formación de homodímeros. Las protuberancias se construyen reemplazando cadenas laterales de aminoácidos pequeñas de la interfase del primer polipéptido por cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean cavidades compensadoras de tamaño idéntico o similar a las protuberancias en la interfase del segundo polipéptido reemplazando cadenas laterales de aminoácidos grandes por otras más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina).

En consecuencia, en el dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T se reemplaza un residuo aminoacídico por un residuo aminoacídico que tiene un volumen de cadena lateral más grande, generando de este modo una protuberancia dentro del dominio CH3 de la primera subunidad que se puede situar en una cavidad dentro del dominio CH3 de la segunda subunidad, y en el dominio CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc se reemplaza un residuo aminoacídico por un residuo aminoacídico que tiene un volumen de cadena lateral más pequeño, generando de este modo una cavidad dentro del dominio CH3 de la segunda subunidad dentro de la que se puede situar la protuberancia dentro del dominio CH3 de la primera subunidad.

En un aspecto, dicho residuo aminoacídico que tiene un volumen de cadena lateral más grande se selecciona del grupo que consiste en arginina (R), fenilalanina (F), tirosina (Y) y triptófano (W).

En un aspecto, dicho residuo aminoacídico que tiene un volumen de cadena lateral más pequeño se selecciona del grupo que consiste en alanina (A), serina (S), treonina (T) y valina (V).

La protuberancia y la cavidad se pueden preparar alterando el ácido nucleico que codifica los polipéptidos, por ejemplo, por mutagénesis específica de sitio o por síntesis peptídica.

En el dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc (la subunidad de "botones"), el residuo treonina en la posición 366 se reemplaza por un residuo triptófano (T366W) y en el dominio CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc (la subunidad de "ojal"), el residuo tirosina en la posición 407 se reemplaza por un residuo valina (Y407V). En un aspecto de la divulgación, en la segunda subunidad del dominio Fc, adicionalmente, el residuo treonina en la posición 366 se reemplaza por un residuo serina (T366S) y el residuo leucina en la posición 368 se reemplaza por un residuo alanina (L368A) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En la primera subunidad del dominio Fc, adicionalmente, el residuo serina en la posición 354 se reemplaza por un residuo cisteína (S354C) o el residuo ácido glutámico en la posición 356 se reemplaza por un residuo cisteína (E356C), y en la segunda subunidad del dominio Fc, adicionalmente, el residuo tirosina en la posición 349 se reemplaza por un residuo cisteína (Y349C) (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat). La introducción de estos dos residuos cisteína da como resultado la formación de un puente disulfuro entre las dos subunidades del dominio Fc, estabilizando además el dímero (Carter, J Immunol Methods 248, 7-15 (2001)).

De acuerdo con la divulgación, la primera subunidad del dominio Fc comprende las sustituciones aminoacídicas S354C y T366W, y la segunda subunidad del dominio Fc comprende las sustituciones aminoacídicas Y349C, T366S, L368A e Y407V (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En un aspecto particular, la molécula Fab que se une específicamente a un antígeno activador de linfocitos T se fusiona (opcionalmente por medio de una molécula Fab que se une específicamente a un antígeno de célula diana) a la primera subunidad del dominio Fc (que comprende la modificación "botón"). Sin quedar vinculado a ninguna teoría, la fusión de la molécula Fab que une específicamente un antígeno activador de linfocitos T a la subunidad que contiene botón del dominio Fc minimizará (además) la generación de moléculas de unión a antígeno que comprenden dos moléculas Fab que se unen a un antígeno activador de linfocitos T (impedimento estérico de dos polipéptidos que contienen botón).

Otras técnicas de modificación de CH3 para garantizar la heterodimerización se contemplan como alternativas de acuerdo con la divulgación y se describen por ejemplo, en los documentos WO 96/27011, WO 98/050431, EP 1870459, WO 2007/110205, WO 2007/147901, WO 2009/089004, WO 2010/129304, WO 2011/90754, WO 2011/143545, WO 2012/058768, WO 2013/157954, WO 2013/096291.

En un aspecto, el enfoque de heterodimerización descrito en el documento EP 1870459 A1, se usa de forma alternativa. Este enfoque se basa en la introducción de aminoácidos cargados con cargas opuestas en posiciones de aminoácidos específicas en la interfase CH3/dominio CH3 entre las dos subunidades del dominio Fc.

Un aspecto preferente para la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T son las mutaciones aminoacídicas R409D; K370E en uno de los dos dominios CH3 (del dominio Fc) y las mutaciones aminoacídicas D399K; E357K en el otro de los dominios CH3 del dominio Fc (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En otro aspecto de la descripción, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende la mutación aminoacídica T366W en el dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc y las mutaciones aminoacídicas T366S, L368A, Y407V en el dominio CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc y, adicionalmente, las mutaciones aminoacídicas R409D; K370E en el dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc y las mutaciones aminoacídicas D399K; E357K en el dominio CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En otro aspecto, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende las mutaciones aminoacídicas S354C, T366W en el dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc y las mutaciones aminoacídicas Y349C, T366S, L368A, Y407V en el dominio CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc, o dicha molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende las mutaciones aminoacídicas Y349C, T366W en el dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc y las mutaciones aminoacídicas S354C, T366S, L368A, Y407V en los dominios CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc y, adicionalmente, las mutaciones aminoacídicas R409D; K370E en el dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc y las mutaciones aminoacídicas D399K; E357K en el dominio CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc (todas las numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En un aspecto de la divulgación, el enfoque de heterodimerización descrito en el documento WO 2013/157953 se usa de forma alternativa. En un aspecto, un primer dominio CH3 comprende la mutación aminoacídica T366K y un segundo dominio CH3 comprende la mutación aminoacídica L351D (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat). En otro aspecto, el primer dominio CH3 comprende otra mutación aminoacídica L351K. En otro aspecto, el segundo dominio CH3 comprende otra mutación aminoacídica seleccionada de Y349E, Y349D y L368E (preferentemente L368E) (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En un aspecto, el enfoque de heterodimerización descrito en el documento WO 2012/058768 se usa de forma alternativa. En un aspecto, un primer dominio CH3 comprende las mutaciones aminoacídicas L351Y, Y407A y un segundo dominio CH3 comprende las mutaciones aminoacídicas T366A, K409F. En otro aspecto, el segundo dominio CH3 comprende otra mutación aminoacídica en la posición T411, D399, S400, F405, N390 o K392, por ejemplo, seleccionada de a) T411N, T411R, T411Q, T411K, T411D, T411E o T411W, b) D399R, D399W, D399Y o D399K, c) S400E, S400D, S400R o S400K, d) F405I, F405M, F405T, F405S, F405V o F405W, e) N390R, N390K o N390D, f) K392V, K392M, K392R, K392L, K392F o K392E (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat). En otro aspecto, un primer dominio CH3 comprende las mutaciones aminoacídicas L351Y, Y407A y un segundo dominio CH3 comprende las mutaciones aminoacídicas T366V, K409F. En otro aspecto, un primer dominio CH3 comprende la mutación aminoacídica Y407A y un segundo dominio CH3 comprende las mutaciones aminoacídicas T366A, K409F. En otro aspecto, el segundo dominio CH3 comprende además las mutaciones aminoacídicas K392E, T411E, D399R y S400R (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En un aspecto, el enfoque de heterodimerización descrito en el documento WO 2011/143545 se usa de forma alternativa, por ejemplo, con la modificación aminoacídica en una posición seleccionada del grupo que consiste en 368 y 409 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En un aspecto, el enfoque de heterodimerización descrito en el documento WO 2011/090762, que también usa la tecnología de botones en ojales descrita anteriormente, se usa de forma alternativa. En un aspecto, un primer dominio CH3 comprende la mutación aminoacídica T366W y un segundo dominio CH3 comprende la mutación aminoacídica Y407A. En un aspecto, un primer dominio CH3 comprende la mutación aminoacídica T366Y y un segundo dominio CH3 comprende la mutación aminoacídica Y407T (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En un aspecto, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T o su dominio Fc es de la subclase IgG₂ y el enfoque de heterodimerización descrito en el documento WO 2010/129304 se usa de forma alternativa. En un aspecto alternativo, una modificación que promueve la asociación de la primera y la segunda subunidad del dominio Fc comprende una modificación que media en los efectos de conducción electrostática, por ejemplo, como se describe en la publicación PCT WO 2009/089004. En general, este procedimiento implica el reemplazo de uno o más residuos aminoacídicos en la interfase de las dos subunidades del dominio Fc por residuos aminoacídicos cargados, de modo que la formación de un homodímero se vuelva electrostáticamente desfavorable, pero la heterodimerización electrostáticamente favorable. En un aspecto de este tipo, un primer dominio CH3 comprende la sustitución aminoacídica de K392 o N392 con un aminoácido cargado negativamente (por ejemplo, ácido glutámico (E), o ácido aspártico (D), preferentemente K392D o N392D) y un segundo dominio CH3 comprende la sustitución aminoacídica de D399, E356, D356 o E357 con un aminoácido cargado positivamente (por ejemplo, lisina (K) o arginina (R), preferentemente D399K, E356K, D356K o E357K y más preferentemente D399K y E356K). En otro aspecto, el primer dominio CH3 comprende además la sustitución aminoacídica de K409 o R409 con un aminoácido cargado negativamente (por ejemplo, ácido glutámico (E), o ácido aspártico (D), preferentemente K409D o R409D). En otro aspecto, el primer dominio CH3 comprende además o de forma alternativa la sustitución aminoacídica de K439 y/o K370 con un aminoácido cargado negativamente (por ejemplo, ácido glutámico (E), o ácido aspártico (D)) (todas las numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat).

Aún en otro aspecto, el enfoque de heterodimerización descrito en el documento WO 2007/147901 se usa de forma alternativa. En un aspecto, un primer dominio CH3 comprende las mutaciones aminoacídicas K253E, D282K y K322D y un segundo dominio CH3 comprende las mutaciones aminoacídicas D239K, E240K y K292D (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat).

Todavía en otro aspecto, el enfoque de heterodimerización descrito en el documento WO 2007/110205 se puede usar de forma alternativa.

En un aspecto, la primera subunidad del dominio Fc comprende las sustituciones aminoacídicas K392D y K409D, y la segunda subunidad del dominio Fc comprende las sustituciones aminoacídicas D356K y D399K (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

Modificaciones en el dominio Fc que reducen la unión al receptor de Fc y/o la función efectora

El dominio Fc confiere a la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T propiedades farmacocinéticas favorables, incluyendo una semivida en suero larga que contribuye a una buena acumulación en el tejido diana y una proporción de distribución tejido-sangre favorable. Al mismo tiempo, sin embargo, puede dar lugar a la selectividad indeseable de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T hacia células que expresan receptores de Fc en lugar de a las células portadoras de antígenos preferentes. Además, la coactivación de las vías de señalización del receptor de Fc puede dar lugar a la liberación de citocinas lo que, en combinación con las propiedades activadoras de linfocitos T y la semivida larga de la molécula de unión a antígeno, da como resultado una activación excesiva de receptores de citocinas y efectos secundarios graves tras la administración sistémica. La activación de células inmunitarias (portadoras del receptor de Fc) distintas de linfocitos T incluso puede reducir la eficacia de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T debido a la destrucción potencial de linfocitos T, por ejemplo, por linfocitos NK.

En consecuencia, el dominio Fc de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T de acuerdo con la invención presenta afinidad de unión reducida por un receptor de Fc y/o función efectora reducida, en comparación con un dominio Fc de IgG₁ natural. En un aspecto de este tipo, el dominio Fc (o la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende dicho dominio Fc) presenta menos de un 50 %, preferentemente menos de un 20 %, más preferentemente menos de un 10 % y lo más preferentemente menos de un 5 % de la afinidad de unión por un receptor de Fc, en comparación con un dominio Fc de IgG₁ natural (o una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende un dominio Fc de IgG₁ natural), y/o menos de un 50 %, preferentemente menos de un 20 %, más preferentemente menos de un 10 % y lo más preferentemente menos de un 5 % de la función efectora, en comparación con un dominio del dominio Fc de IgG₁ natural (o una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende un dominio Fc de IgG₁ natural). De acuerdo con la invención, el dominio del dominio Fc (o la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende dicho dominio Fc) no se une sustancialmente a un receptor de Fc y/o induce la función efectora. El receptor de Fc es un receptor de Fcγ. El receptor de Fc es un receptor de Fc humano. El receptor de Fc es un receptor de Fc activador. De acuerdo con la invención, el receptor

de Fc es un receptor de Fc γ humano activador, más específicamente, un receptor Fc γ R111a humano. La función efectora es una o más seleccionada del grupo de CDC, ADCC, ADCP y secreción de citocinas. En un modo de realización particular, la función efectora es ADCC.

En un aspecto, el dominio del dominio Fc presenta afinidad de unión sustancialmente similar por el receptor de Fc neonatal (FcRn), en comparación con un dominio del dominio Fc de IgG₁ natural. Se logra una unión sustancialmente similar a FcRn cuando el dominio Fc (o la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende dicho dominio Fc) presenta más de aproximadamente un 70 %, en particular más de aproximadamente un 80 %, más en particular más de aproximadamente un 90 % de la afinidad de unión de un dominio Fc de IgG₁ natural (o la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende un dominio Fc de IgG₁ natural) por FcRn.

El dominio Fc se genomanipula para tener afinidad de unión reducida por un receptor de Fc y/o función efectora reducida, en comparación con un dominio Fc no genomanipulado. El dominio Fc de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende una o más mutaciones aminoacídicas que reducen la afinidad de unión del dominio Fc por un receptor de Fc y/o la función efectora. Típicamente, las mismas una o más mutaciones aminoacídicas están presentes en cada una de las dos subunidades del dominio Fc. La mutación aminoacídica reduce la afinidad de unión del dominio Fc por un receptor de Fc. En un aspecto, la mutación aminoacídica reduce la afinidad de unión del dominio Fc por un receptor de Fc en al menos 2 veces, al menos 5 veces o al menos 10 veces. En aspectos donde hay más de una mutación aminoacídica que reduce la afinidad de unión del dominio Fc por el receptor de Fc, la combinación de estas mutaciones aminoacídicas puede reducir la afinidad de unión del dominio Fc por el receptor de Fc en al menos 10 veces, al menos 20 veces o incluso al menos 50 veces. En un aspecto, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende un dominio Fc genomanipulado presenta menos de un 20 %, en particular menos de un 10 %, más en particular menos de un 5 % de la afinidad de unión por un receptor Fc en comparación con una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende un dominio Fc no genomanipulado. En un aspecto particular, el receptor de Fc es un receptor de Fc γ . El receptor de Fc es un receptor de Fc humano. El receptor de Fc es un receptor de Fc activador. El receptor de Fc es un receptor de Fc γ humano, más específicamente, Fc γ R111a, Fc γ RI o Fc γ R111a humano, lo más específicamente, Fc γ R111a humano. Preferentemente, se reduce la unión a cada uno de estos receptores. También se reduce la afinidad de unión por un componente de complemento, específicamente la afinidad de unión por C1q. No se reduce la afinidad de unión por el receptor de Fc neonatal (FcRn). La unión sustancialmente similar a FcRn, es decir, la conservación de la afinidad de unión del dominio Fc por dicho receptor, se logra cuando el dominio Fc (o la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende dicho dominio Fc) presenta más de aproximadamente un 70 % de la afinidad de unión de una forma no genomanipulada del dominio Fc (o la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende dicha forma no genomanipulada del dominio Fc) por FcRn. El dominio Fc, o las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T de la divulgación que comprenden dicho dominio Fc, pueden presentar más de aproximadamente un 80 % e incluso más de aproximadamente un 90 % de dicha afinidad. El dominio Fc de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T se genomanipula para que tenga una función efectora reducida, en comparación con un dominio Fc no genomanipulado. La función efectora reducida puede incluir, pero no se limita a, una o más de las siguientes: citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) reducida, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) reducida, fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP) reducida, secreción de citocinas reducida, captación de antígenos mediada por inmunocomplejos por células presentadoras de antígenos reducida, unión a linfocitos NK reducida, unión a macrófagos reducida, unión a monocitos reducida, unión a células polimorfonucleares reducida, señalización directa que induce apoptosis reducida, reticulación de anticuerpos unidos a diana reducida, maduración de células dendríticas reducida o cebado de linfocitos T reducido. En un aspecto, la función efectora reducida es una o más seleccionadas del grupo de CDC reducida, ADCC reducida, ADCP reducida y secreción de citocinas reducida. De acuerdo con la invención, la función efectora reducida es ADCC reducida. En un aspecto, la ADCC reducida es menos de un 20 % de la ADCC inducida por un dominio Fc no genomanipulado (o una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende un dominio Fc no genomanipulado).

En un aspecto, la mutación aminoacídica que reduce la afinidad de unión del dominio Fc por un receptor de Fc y/o función efectora es una sustitución aminoacídica. En un aspecto, el dominio Fc comprende una sustitución aminoacídica en una posición seleccionada del grupo de E233, L234, L235, N297, P331 y P329 (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat). El dominio Fc comprende una sustitución aminoacídica en una posición seleccionada del grupo de L234, L235 y P329 (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat). El dominio Fc comprende las sustituciones aminoacídicas L234A y L235A (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat). En un aspecto de este tipo, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG₁, en particular un dominio Fc de IgG₁ humana. En un modo de realización, el dominio Fc comprende una sustitución aminoacídica en la posición P329. En un aspecto más específico, la sustitución aminoacídica es P329A o P329G, en particular P329G (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat). En un aspecto, el dominio Fc comprende una sustitución aminoacídica en la posición P329 y otra sustitución aminoacídica en una posición seleccionada de E233, L234, L235, N297 y P331 (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat). En un aspecto más específico, la otra sustitución aminoacídica es E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297D o P331S. De acuerdo con la invención, el dominio Fc comprende sustituciones aminoacídicas en las posiciones P329, L234 y L235 (numeraciones de acuerdo con

el índice EU de Kabat). El dominio Fc comprende las mutaciones aminoacídicas L234A, L235A y P329G ("P329G LALA"). El dominio Fc es un dominio Fc de IgG₁, en particular un dominio Fc de IgG₁ humana. La combinación "P329G LALA" de sustituciones aminoacídicas suprime casi completamente la unión al receptor de Fcγ (así como al complemento) de un dominio Fc de IgG₁ humana, como se describe en la publicación PCT n.º WO 2012/130831.

El documento WO 2012/130831 también describe procedimientos de preparación de dichos dominios Fc mutantes y procedimientos para determinar sus propiedades, tales como unión al receptor de Fc o funciones efectoras.

Los anticuerpos IgG₄ presentan afinidad de unión reducida por receptores de Fc y funciones efectoras reducidas en comparación con anticuerpos IgG₁. Por consiguiente, en algunos aspectos de la divulgación, el dominio Fc de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T es un dominio Fc de IgG₄, en particular un dominio Fc de IgG₄ humana. En un aspecto, el dominio Fc de IgG₄ comprende sustituciones aminoacídicas en la posición S228, específicamente la sustitución aminoacídica S228P (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat). Para reducir además su afinidad de unión por un receptor de Fc y/o su función efectora, en un aspecto, el dominio Fc de IgG₄ comprende una sustitución aminoacídica en la posición L235, específicamente la sustitución aminoacídica L235E (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat). En otro aspecto, el dominio Fc de IgG₄ comprende una sustitución aminoacídica en la posición P329, específicamente la sustitución aminoacídica P329G (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat). En un aspecto particular, el dominio Fc de IgG₄ comprende sustituciones aminoacídicas en las posiciones S228, L235 y P329, específicamente las sustituciones aminoacídicas S228P, L235E y P329G (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat). Dichos mutantes del dominio Fc de IgG₄ y sus propiedades de unión al receptor de Fcγ se describen en la publicación PCT n.º WO 2012/130831.

El dominio Fc que presenta afinidad de unión reducida por un receptor de Fc y/o función efectora reducida, en comparación con un dominio Fc de IgG₁ natural, es un dominio Fc de IgG₁ humana que comprende las sustituciones aminoacídicas L234A, L235A y P329G (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat). En determinados aspectos, se ha eliminado la N-glucosilación del dominio Fc. En un aspecto de este tipo, el dominio Fc comprende una mutación aminoacídica en la posición N297, en particular una sustitución aminoacídica que reemplaza asparagina por alanina (N297A) o ácido aspártico (N297D) (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat).

Además de los dominios Fc descritos anteriormente en el presente documento y en la publicación PCT n.º WO 2012/130831, los dominios Fc con unión al receptor de Fc y/o función efectora reducidas de acuerdo con la divulgación también incluyen aquellos con sustitución de uno o más de los residuos del dominio Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 (patente de EE. UU. n.º 6.737.056) (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat). Dichos mutantes de Fc incluyen mutantes de Fc con sustituciones en dos o más de las posiciones de aminoácidos 265, 269, 270, 297 y 327, incluyendo el denominado mutante de Fc "DANA" con sustitución de los residuos 265 y 297 a alanina (patente de EE. UU. n.º 7.332.581).

Se pueden preparar dominios Fc mutantes por delección, sustitución, inserción o modificación de aminoácidos usando procedimientos genéticos o químicos bien conocidos en la técnica. Los procedimientos genéticos pueden incluir mutagénesis específica de sitio de la secuencia de ADN codificante, PCR, síntesis génica y similares. Los cambios de nucleótidos correctos se pueden verificar, por ejemplo, por secuenciación.

La unión a receptores de Fc se puede determinar fácilmente, por ejemplo, por ELISA, o por resonancia de plasmón superficial (RPS) usando instrumentación estándar tal como un instrumento BIAcore (GE Healthcare), y receptores de Fc tales como los que se pueden obtener por expresión recombinante. Un ensayo de unión de este tipo adecuado se describe en el presente documento. De forma alternativa, se puede evaluar la afinidad de unión de los dominios Fc o las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células que comprenden un dominio Fc para los receptores de Fc usando líneas de células conocidas por expresar receptores de Fc particulares, tales como linfocitos NK humanos que expresan el receptor de FcγIIIa.

La función efectora de un dominio Fc, o una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende un dominio Fc, se puede medir por procedimientos conocidos en la técnica. Un ensayo adecuado para medir la ADCC se describe en el presente documento. Otros ejemplos de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés se describen en la patente de EE. UU. n.º 5.500.362; Hellstrom *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 83, 7059-7063 (1986) y Hellstrom *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 82, 1499-1502 (1985); patente de EE. UU. n.º 5.821.337; Bruggemann *et al.*, J Exp Med 166, 1351-1361 (1987). De forma alternativa, se pueden emplear procedimientos de ensayos no radioactivos (véanse, por ejemplo, el ensayo de citotoxicidad no radioactivo ACTI™ para citometría de flujo (CellTechnology, Inc., Mountain View, CA); y el ensayo de citotoxicidad no radioactivo CytoTox 96® (Promega, Madison, WI)). Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen leucocitos mononucleares en la sangre periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos naturales (NK). De forma alternativa, o adicionalmente, se puede evaluar la actividad de ADCC de la molécula de interés *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el divulgado en Clynes *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 95, 652-656 (1998).

Se reduce la unión del dominio Fc a un componente de complemento, específicamente a C1q. En consecuencia, se genomanipula el dominio Fc para que tenga función efectora reducida, dicha función efectora reducida incluye

CDC reducida. Se pueden llevar a cabo ensayos de unión a C1q para determinar si la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T se puede unir a C1q y, por consiguiente, tener actividad de CDC. Véanse, por ejemplo, ELISA de unión a C1q y C3c en los documentos WO 2006/029879 y WO 2005/100402. Para evaluar la activación del complemento se puede realizar un ensayo de CDC (véanse, por ejemplo, Gazzano-Santoro *et al.*, J Immunol Methods 202, 163 (1996); Cragg *et al.*, Blood 101, 1045-1052 (2003); y Cragg y Glennie, Blood 103, 2738-2743 (2004)).

Restos de unión a antígeno

La molécula de unión a antígeno de la invención es biespecífica, es decir, comprende al menos dos restos de unión a antígeno que se pueden unir específicamente a dos determinantes antigénicos distintos. De acuerdo con la invención, los restos de unión a antígeno son moléculas Fab (es decir, dominios de unión a antígeno compuestos por una cadena pesada y una ligera, comprendiendo cada una un dominio variable y uno constante). En un aspecto, dichas moléculas Fab son humanas. De acuerdo con la invención, dichas moléculas Fab son humanizadas. Dichas moléculas Fab comprenden dominios constantes de la cadena pesada y ligera.

Al menos uno de los restos de unión a antígeno es una molécula Fab de entrecruzamiento. Dicha modificación reduce el emparejamiento incorrecto de las cadenas pesada y ligera a partir de diferentes moléculas Fab, mejorando de este modo el rendimiento y la pureza de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de la invención en la producción recombinante. En una molécula Fab de entrecruzamiento particular útil para la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de la invención, se intercambian los dominios variables de la cadena ligera de Fab y la cadena pesada de Fab (VL y VH, respectivamente). Sin embargo, incluso con este intercambio de dominios, la preparación de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T puede comprender determinados productos secundarios debido a la denominada interacción de tipo Bence Jones entre las cadenas pesada y ligera con emparejamiento incorrecto (véase Schaefer *et al.*, PNAS, 108 (2011) 11187-11191). Para reducir además el emparejamiento incorrecto de las cadenas pesada y ligera de diferentes moléculas Fab y, por tanto, incrementar la pureza y el rendimiento de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T deseada, de acuerdo con la presente invención, se introducen aminoácidos cargados con cargas opuestas en posiciones de aminoácidos específicas en los dominios CH1 y CL de la(s) molécula(s) Fab que se une(n) específicamente a un antígeno de célula diana, o bien la molécula Fab que se une específicamente a un antígeno activador de linfocitos T. Las modificaciones de carga de acuerdo con la invención se realizan en la(s) molécula(s) Fab convencional(es) comprendida(s) en la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T (tal como se muestra, por ejemplo, en las figuras 1 A-C, G-J), se divulgan otras modificaciones de carga en la(s) molécula(s) Fab de entrecruzamiento comprendida(s) en la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T (tal como se muestra, por ejemplo, en la figura 1 D-F, K-N) (pero no en ambas). Las modificaciones de carga se realizan en las moléculas Fab convencionales comprendidas en la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T (que se une específicamente al antígeno de célula diana).

De acuerdo con la invención, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T se puede unir simultáneamente a un antígeno de célula diana, en particular a un antígeno de célula tumoral, y a un antígeno activador de linfocitos T, en particular CD3. La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T puede reticular un linfocito T y una célula diana por la unión simultánea a un antígeno de célula diana y a un antígeno activador de linfocitos T. Dicha unión simultánea da como resultado la lisis de la célula diana, en particular una célula tumoral. Dicha unión simultánea da como resultado la activación del linfocito T. Dicha unión simultánea da como resultado una respuesta celular de un linfocito T, en particular un linfocito T citotóxico, seleccionada del grupo de: proliferación, diferenciación, secreción de citocinas, liberación de molécula efectora citotóxica, actividad citotóxica y expresión de marcadores de activación. La unión de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T al antígeno activador de linfocitos T, en particular CD3, sin la unión simultánea al antígeno de célula diana no da como resultado la activación de linfocitos T.

La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T puede redirigir la actividad citotóxica de un linfocito T a una célula diana. Dicho redireccionamiento es independiente de la presentación de antígenos peptídicos mediada por MHC por la célula diana y/o la especificidad del linfocito T.

En particular, un linfocito T de acuerdo con la invención es un linfocito T citotóxico. El linfocito T es un linfocito T CD4⁺ o uno CD8⁺, en particular un linfocito T CD8⁺.

Molécula Fab de unión a antígeno activadora de linfocitos T

La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de la invención comprende una molécula Fab que se une específicamente a un antígeno activador de linfocitos T (también denominado en el presente documento "molécula Fab de unión a antígeno activadora de linfocitos T"). La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende no más de una molécula Fab (u otra molécula Fab) que se puede unir específicamente a un antígeno activador de linfocitos T. La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T proporciona unión monovalente al antígeno activador de linfocitos T.

La molécula Fab que se une específicamente a un antígeno activador de linfocitos T es una molécula Fab de entrecruzamiento como se describe en el presente documento, es decir, una molécula Fab en la que los dominios variables VH y VL de las cadenas pesada y ligera de Fab se intercambian/reemplazan entre sí. Las moléculas Fab que se unen específicamente a un antígeno de célula diana son moléculas Fab convencionales. La molécula Fab que se une específicamente a un antígeno activador de linfocitos T es una molécula Fab de entrecruzamiento y las moléculas Fab que se unen específicamente a un antígeno de célula diana son moléculas Fab convencionales.

En aspectos alternativos de la descripción, la molécula Fab que se une específicamente a un antígeno activador de linfocitos T es una molécula Fab convencional. En dichos aspectos, la(s) molécula(s) Fab que se une(n) específicamente a un antígeno de célula diana es una molécula Fab de entrecruzamiento como se describe en el presente documento, es decir, una molécula Fab en la que los dominios variables VH y VL de las cadenas pesada y ligera de Fab se intercambian/reemplazan entre sí.

El antígeno activador de linfocitos T es CD3, en particular CD3 humano (SEQ ID NO: 1) o CD3 de macaco cangrejero (SEQ ID NO: 2), lo más en particular, CD3 humano. La molécula Fab de unión a antígeno activadora de linfocitos T es reactiva de forma cruzada para (es decir, se une específicamente a) CD3 humano y de macaco cangrejero. El antígeno activador de linfocitos T es la subunidad épsilon de CD3 (CD3 épsilon).

La molécula Fab de unión a antígeno activadora de linfocitos T se une específicamente a CD3, en particular a CD3 épsilon, y comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6 y al menos una CDR de la cadena ligera seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10.

La molécula Fab de unión a CD3 comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la CDR1 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 4, la CDR2 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 5, la CDR3 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 6, y una región variable de la cadena ligera que comprende la CDR1 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 8, la CDR2 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 9 y la CDR3 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 10.

En otro aspecto, la molécula Fab de unión a CD3 comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la CDR1 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 4, la CDR2 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 67, la CDR3 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 6, y una región variable de la cadena ligera que comprende la CDR1 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 68, la CDR2 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 9 y la CDR3 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 10.

En un aspecto, la molécula Fab de unión a CD3 comprende una secuencia de la región variable de la cadena pesada que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEQ ID NO: 3 y una secuencia de la región variable de la cadena ligera que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEQ ID NO: 7.

La molécula Fab de unión a CD3 comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7.

La molécula Fab de unión a CD3 comprende la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 3 y la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 7.

Molécula Fab de unión a antígeno de célula diana

La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de la invención comprende dos moléculas Fab que se unen específicamente a CD20 (también denominado en el presente documento "molécula Fab de unión a antígeno de célula diana"). La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende dos moléculas Fab que se unen específicamente a un antígeno de célula diana. Cada una de estas moléculas Fab se une específicamente al mismo determinante antigénico. Todas estas moléculas Fab son idénticas, es decir, comprenden las mismas secuencias de aminoácidos que incluyen las mismas sustituciones aminoácidas en el dominio CH1 y CL como se describe en el presente documento. La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende una molécula de inmunoglobulina que se une específicamente a un antígeno de célula diana. La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende no más de dos moléculas Fab que se unen específicamente a un antígeno de célula diana.

Las moléculas Fab que se unen específicamente a un antígeno de célula diana son una molécula Fab convencional. La molécula Fab que se une específicamente a un antígeno activador de linfocitos T es una molécula Fab de entrecruzamiento como se describe en el presente documento, es decir, una molécula Fab en la que los dominios variables VH y VL de las cadenas pesada y ligera de Fab se intercambian/reemplazan entre sí.

En aspectos alternativos de la descripción, la(s) molécula(s) Fab que se une(n) específicamente a un antígeno de célula diana es/son una molécula Fab de entrecruzamiento como se describe en el presente documento, es decir, una molécula Fab en la que los dominios variables VH y VL de las cadenas pesada y ligera de Fab se intercambian/reemplazan entre sí. En dichos aspectos, la(s) molécula(s) Fab que se une(n) específicamente a un antígeno activador de linfocitos T es una molécula Fab convencional.

La molécula Fab de unión a antígeno de célula diana se une a un determinante antigénico específico y puede dirigir la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T a un sitio diana, por ejemplo, a un tipo específico de célula tumoral que porta el determinante antigénico.

En determinados aspectos, la molécula Fab de unión a antígeno de célula diana se une específicamente a un antígeno de superficie celular.

En determinados aspectos, la molécula Fab de unión a antígeno de célula diana se dirige a un antígeno asociado con una afección patológica, tal como un antígeno presentado en una célula tumoral o en una célula infectada por virus. Los antígenos de células diana adecuados son antígenos de superficie celular, por ejemplo, pero sin limitarse a, receptores de superficie celular. En aspectos particulares, el antígeno de célula diana es un antígeno humano. Los antígenos de células diana ejemplares incluyen CD20, Her2, Her3, MCSP (proteoglucano de sulfato de condroitina asociado al melanoma, también conocido como proteoglucano de sulfato de condroitina 4) o BCMA (diana de maduración de linfocitos B humana, también conocida como miembro 17 de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (UniProt Q02223)).

El antígeno de célula diana es CD20, en particular CD20 humano. El antígeno de célula diana es CD20 y la molécula Fab que se une específicamente a dicho antígeno de célula diana comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la región determinante de la complementariedad (CDR) 1 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 46, la CDR 2 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 47, y la CDR 3 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 48, y una región variable de la cadena ligera que comprende la CDR 1 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 49, la CDR 2 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 50 y la CDR 3 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 51. En otro aspecto de la divulgación, el antígeno de célula diana es CD20 y la molécula Fab que se une específicamente a dicho antígeno de célula diana comprende una región variable de la cadena pesada que es al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 30, y una región variable de la cadena ligera que es al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 31. El antígeno de célula diana es CD20 y la molécula Fab que se une específicamente a dicho antígeno de célula diana comprende la secuencia de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 30 y la secuencia de la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 31. En un aspecto de la divulgación, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende un polipéptido que es al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico a la secuencia de SEQ ID NO: 18, un polipéptido que es al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico a la secuencia de SEQ ID NO: 19, un polipéptido que es al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico a la secuencia de SEQ ID NO: 20, y un polipéptido que es al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico a la secuencia de SEQ ID NO: 21. La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende una secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 18, una secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 19, dos secuencias polipeptídicas de SEQ ID NO: 20 y una secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 21. En otro aspecto, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende un polipéptido que es al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico a la secuencia de SEQ ID NO: 32, un polipéptido que es al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico a la secuencia de SEQ ID NO: 19, un polipéptido que es al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico a la secuencia de SEQ ID NO: 20 y un polipéptido que es al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico a la secuencia de SEQ ID NO: 21. En otro aspecto, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende una secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 32, una secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 19, una secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 20 y una secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 21. Todavía en otro aspecto, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende un polipéptido que es al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico a la secuencia de SEQ ID NO: 36, un polipéptido que es al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico a la secuencia de SEQ ID NO: 37, un polipéptido que es al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico a la secuencia de SEQ ID NO: 38 y un polipéptido que es al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico a la secuencia de SEQ ID NO: 39. En otro aspecto, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende una secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 36, una secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 37, una secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 38 y una secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 39. En otro aspecto, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende un polipéptido que es al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico a la secuencia de SEQ ID NO: 40, un polipéptido que es al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico a la secuencia de SEQ ID NO: 41, un polipéptido que es al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico a la secuencia de SEQ ID NO: 20 y un polipéptido que es al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico a la secuencia de SEQ ID NO: 21. En otro aspecto, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende una secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 40, una secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 41, una secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 20 y una secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 21.

En otros aspectos de la descripción, el antígeno diana es Her2, en particular Her2 humano. En un aspecto, el antígeno de célula diana es Her2 y la molécula Fab que se une específicamente a dicho antígeno de célula diana comprende una región variable de la cadena pesada que es al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 61, y una región variable de la cadena ligera que es al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 62. En otro aspecto, el antígeno de célula diana es Her2 y la molécula Fab que se une específicamente a dicho antígeno de célula diana comprende la secuencia de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 61 y la secuencia de la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 62. En un aspecto, la molécula de unión a antígeno inespecífica activadora de linfocitos T comprende un polipéptido que es al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico a la secuencia de SEQ ID NO: 21, un polipéptido que es al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico a la secuencia de SEQ ID NO: 52, un polipéptido que es al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico a la secuencia de SEQ ID NO: 53 y un polipéptido que es al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico a la secuencia de SEQ ID NO: 54. En otro aspecto, la molécula de unión a antígeno inespecífica activadora de linfocitos T comprende una secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 21, una secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 52, una secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 53 y una secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 54.

En otros aspectos, el antígeno diana es Her3, en particular Her3 humano. En un aspecto, el antígeno de célula diana es Her3 y la molécula Fab que se une específicamente a dicho antígeno de célula diana comprende una región variable de la cadena pesada que es al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 63 y una región variable de la cadena ligera que es al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 64. En otro aspecto, el antígeno de célula diana es Her3 y la molécula Fab que se une específicamente a dicho antígeno de célula diana comprende la secuencia de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 63 y la secuencia de la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 64. En un aspecto, la molécula de unión a antígeno inespecífica activadora de linfocitos T comprende un polipéptido que es al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico a la secuencia de SEQ ID NO: 21, un polipéptido que es al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico a la secuencia de SEQ ID NO: 55, un polipéptido que es al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico a la secuencia de SEQ ID NO: 56 y un polipéptido que es al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico a la secuencia de SEQ ID NO: 57. En otro aspecto, la molécula de unión a antígeno inespecífica activadora de linfocitos T comprende una secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 21, una secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 55, una secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 56 y una secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 57.

En otros aspectos de la descripción, el antígeno diana es proteoglicano de sulfato de condroitina asociado a melanoma (MCSP), en particular MCSP humano. En un aspecto, el antígeno de célula diana es MCSP y la molécula Fab que se une específicamente a dicho antígeno de célula diana comprende una región variable de la cadena pesada que es al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 65 y una región variable de la cadena ligera que es al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 66. En otro aspecto, el antígeno de célula diana es Her2 y la molécula Fab que se une específicamente a dicho antígeno de célula diana comprende la secuencia de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 65 y la secuencia de la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 66.

En algunos aspectos, el antígeno diana es BCMA. En otros aspectos, el antígeno de célula diana no es BCMA.

Polinucleótidos

La divulgación proporciona además polinucleótidos aislados que codifican una molécula de unión a antígeno inespecífica activadora de linfocitos T como se describe en el presente documento o un fragmento de la misma. En algunos aspectos, dicho fragmento es un fragmento de unión a antígeno.

Los polinucleótidos que codifican moléculas de unión a antígeno inespecíficas activadoras de linfocitos T de la invención se pueden expresar como un único polinucleótido que codifica toda la molécula de unión a antígeno inespecífica activadora de linfocitos T o como múltiples (por ejemplo, dos o más) polinucleótidos que se coexpresan. Los polipéptidos codificados por polinucleótidos que se coexpresan se pueden asociar a través de, por ejemplo, enlaces disulfuro u otros medios para formar una molécula de unión a antígeno inespecífica activadora de linfocitos T funcional. Por ejemplo, la porción de la cadena ligera de una molécula Fab se puede codificar por un polinucleótido separado de la porción de la molécula de unión a antígeno inespecífica activadora de linfocitos T que comprende la porción de la cadena pesada de la molécula Fab, una subunidad del dominio Fc y opcionalmente (parte de) otra molécula Fab. Cuando se coexpresan, los polipéptidos de la cadena pesada se asociarán con los polipéptidos de la cadena ligera para formar la molécula Fab. En otro ejemplo, la porción de la molécula de unión a antígeno inespecífica activadora de linfocitos T que comprende una de las dos subunidades del dominio Fc y opcionalmente (parte de) una o más moléculas Fab se podría codificar por un polinucleótido separado de la porción de la molécula de unión a antígeno inespecífica activadora de linfocitos T que comprende la otra de las dos subunidades del dominio Fc y opcionalmente (parte de) una molécula Fab. Cuando se coexpresen, las subunidades del dominio Fc se asociarán para formar el dominio Fc.

En algunos aspectos, el polinucleótido aislado codifica toda la molécula de unión a antígeno inespecífica activadora

de linfocitos T de acuerdo con la invención como se describe en el presente documento. En otros aspectos, el polinucleótido aislado codifica polipéptidos comprendidos en la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de acuerdo con la invención como se describe en el presente documento.

- 5 En determinados aspectos, el polinucleótido o ácido nucleico es ADN. En otros aspectos, un polinucleótido de la presente divulgación es ARN, por ejemplo, en forma de ARN mensajero (ARNm). El ARN de la presente divulgación puede ser monocatenario o bicatenario.

Procedimientos recombinantes

10 Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T de la invención se pueden obtener, por ejemplo, por síntesis peptídica en estado sólido (por ejemplo, síntesis en fase sólida de Merrifield) o producción recombinante. Para la producción recombinante, uno o más polinucleótidos que codifican la molécula (fragmento) de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T, por ejemplo, como se describe anteriormente, se aíslan e insertan en uno o más vectores para clonación y/o expresión adicional en una célula huésped. Dicho polinucleótido se puede aislar y secuenciar fácilmente usando procedimientos convencionales. En un aspecto de la divulgación, se proporciona un vector, preferentemente un vector de expresión, que comprende uno o más de los polinucleótidos como se describe en el presente documento. Se pueden usar procedimientos que son bien conocidos por los expertos en la técnica para construir vectores de expresión que contienen la secuencia codificante de una molécula (fragmento) de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T junto con señales de control de la transcripción/traducción apropiadas. Estos procedimientos incluyen técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación/recombinación genética *in vivo*. Véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en Maniatis *et al.*, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1989); y Ausubel *et al.*, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989). El vector de expresión puede ser parte de un plásmido, virus, o puede ser un fragmento de ácido nucleico. El vector de expresión incluye un casete de expresión en el que el polinucleótido que codifica la molécula (fragmento) de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T (es decir, la región codificante) se clona en asociación funcional con un promotor y/u otros elementos de control de la transcripción o la traducción. Como se usa en el presente documento, una "región codificante" es una porción de ácido nucleico que consiste en codones traducidos en aminoácidos. Aunque un "codón de terminación" (TAG, TGA o TAA) no se traduce en un aminoácido, se puede considerar que es parte de una región codificante, si está presente, pero cualquier secuencia flanqueante, por ejemplo, promotores, sitios de unión a ribosomas, finalizadores de la transcripción, intrones, regiones no traducidas 5' y 3', y similares, no es parte de una región codificante. Dos o más regiones codificantes pueden estar presentes en una única construcción polinucleotídica, por ejemplo, en un único vector, o en construcciones polinucleotídicas separadas, por ejemplo, en vectores separados (diferentes). Además, cualquier vector puede contener una única región codificante, o puede comprender dos o más regiones codificantes, por ejemplo, un vector como se describe en el presente documento puede codificar uno o más polipéptidos, que se separan posteriormente a o conjuntamente con la traducción en las proteínas finales por medio de escisión proteolítica. Además, un vector, polinucleótido o ácido nucleico como se describe en el presente documento, puede codificar regiones codificantes heterógenas, fusionadas o bien no fusionadas a un polinucleótido que codifica la molécula (fragmento) de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de la invención o variante o derivado de la misma. Las regiones codificantes heterógenas incluyen sin limitación elementos o motivos especializados, tales como un péptido señal secretor o un dominio funcional heterógeno. Una asociación funcional es cuando una región codificante para un producto génico, por ejemplo, un polipéptido, se asocia con una o más secuencias reguladoras de tal forma que dispone la expresión del producto génico bajo la influencia o control de la(s) secuencia(s) reguladora(s). Dos fragmentos de ADN (tales como una región codificante de polipéptido y un promotor asociado con la misma) se "asocian de forma funcional" si la inducción de la función promotora da como resultado la transcripción de ARNm que codifica el producto génico deseado y si la naturaleza del enlace entre los dos fragmentos de ADN no interfiere con la capacidad de las secuencias reguladoras de la expresión para dirigir la expresión del producto génico ni interfiere con la capacidad del molde de ADN para transcribirse. Por tanto, una región promotora se asociará de forma funcional con un ácido nucleico que codifica un polipéptido si el promotor puede efectuar la transcripción de ese ácido nucleico. El promotor puede ser un promotor específico de célula que dirige la transcripción sustancial del ADN solo en células predeterminadas. Otros elementos de control de la transcripción, además de un promotor, por ejemplo, potenciadores, operadores, represores y señales de finalización de la transcripción, se pueden asociar de forma funcional con el polinucleótido para dirigir la transcripción específica de célula. Los promotores adecuados y otras regiones de control de la transcripción se divulgan en el presente documento. Una variedad de regiones de control de la transcripción son conocidas para los expertos en la técnica. Estas incluyen, sin limitación, regiones de control de la transcripción, que funcionan en células de vertebrado, tales como, pero sin limitarse a, segmentos promotores y potenciadores de citomegalovirus (por ejemplo, el promotor temprano inmediato, junto con intrón-A), virus de simio 40 (por ejemplo, el promotor temprano) y retrovirus (tales como, por ejemplo, el virus del sarcoma de Rous). Otras regiones de control de la transcripción incluyen aquellas derivadas de genes de vertebrados tales como actina, proteína de choque térmico, hormona del crecimiento bovina y α -globina de conejo, así como otras secuencias que pueden controlar la expresión génica en células eucariotas. Las regiones de control de la transcripción adecuadas adicionales incluyen promotores y potenciadores específicos de tejido, así como promotores inducibles (por ejemplo, promotores inducibles por tetraciclinas). De forma similar, una variedad de elementos de control de la traducción son conocidos

para los expertos en la técnica. Estos incluyen, pero no se limitan a sitios de unión a ribosomas, codones de iniciación y finalización de la traducción y elementos derivados de sistemas víricos (en particular un sitio de entrada del ribosoma interno o IRES, también denominado secuencia CITE). El casete de expresión también puede incluir otros rasgos característicos tales como un origen de replicación y/o elementos de integración cromosómica tales como repeticiones terminales largas (RTL) retrovíricas o repeticiones terminales invertidas (RTI) víricas adenoasociadas (VAA).

Se pueden asociar las regiones codificantes de polinucleótidos y ácidos nucleicos de la presente divulgación con regiones codificantes adicionales que codifican péptidos secretores o señal, que dirigen la secreción de un polipéptido codificado por un polinucleótido de la presente divulgación. Por ejemplo, si se desea la secreción de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T, se puede disponer el ADN que codifica una secuencia señal hacia 5' del ácido nucleico que codifica una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de la divulgación o un fragmento de la misma. De acuerdo con la hipótesis de señal, las proteínas secretadas por células de mamífero tienen un péptido señal o secuencia líder secretora que se escinde de la proteína madura una vez que se ha iniciado la exportación de la cadena de proteína creciente a través del retículo endoplásmico rugoso. Los expertos en la técnica saben que los polipéptidos secretados por células de vertebrado, en general, tienen un péptido señal fusionado al extremo N del polipéptido, que se escinde del polipéptido traducido para producir una forma secretada o "madura" del polipéptido. En determinados aspectos de la descripción, se usa el péptido señal natural, por ejemplo, un péptido señal de la cadena pesada o la cadena ligera de inmunoglobulina, o un derivado funcional de esa secuencia que conserva la capacidad para dirigir la secreción del polipéptido que se asocia de forma funcional con él. De forma alternativa, se puede usar un péptido señal de mamífero heterólogo, o un derivado funcional del mismo. Por ejemplo, se puede sustituir la secuencia líder natural con la secuencia líder del activador tisular del plasminógeno (TPA) humano o β -glucuronidasa de ratón. El ADN que codifica una secuencia de proteína corta que se podría usar para facilitar la posterior purificación (por ejemplo, una marca histidina) o ayudar a marcar la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T se puede incluir dentro de o en los extremos del polinucleótido que codifica la molécula (fragmento) de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T.

En otro aspecto de la divulgación se proporciona una célula huésped que comprende uno o más polinucleótidos como se describe en el presente documento. En determinados aspectos se proporciona una célula huésped que comprende uno o más vectores como se describe en el presente documento. Los polinucleótidos y vectores pueden incorporar cualquiera de los rasgos característicos, individualmente o en combinación, descritos en el presente documento en relación con polinucleótidos y vectores, respectivamente. En un aspecto de este tipo de la divulgación, una célula huésped comprende (por ejemplo, se ha transformado o transfectado con) un vector que comprende un polinucleótido que codifica (parte de) una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de la invención. Como se usa en el presente documento, el término "célula huésped" se refiere a cualquier tipo de sistema celular que se puede genomanipular para generar las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T de la invención o fragmentos de las mismas. Las células huésped adecuadas para replicación y para sustentar la expresión de moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T son bien conocidas en la técnica. Dichas células se pueden transfectar o traducir según sea apropiado con el vector de expresión particular y se pueden cultivar grandes cantidades de células que contienen vectores para sembrar fermentadores a gran escala para obtener cantidades suficientes de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T para aplicaciones clínicas. Las células huésped adecuadas incluyen microorganismos procariotas, tales como *E. coli*, o diversas células eucariotas, tales como células de ovario de hámster chino (CHO), células de insecto o similares. Por ejemplo, se pueden producir polipéptidos en bacterias, en particular cuando no es necesaria la glucosilación. Después de la expresión, se puede aislar el polipéptido a partir de la pasta de células bacterianas en una fracción soluble y se puede purificar adicionalmente. Además de procariotas, los microbios eucariotas tales como hongos filamentosos o levaduras son huéspedes de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican polipéptidos, incluyendo cepas de hongos y levaduras con vías de glucosilación que se han "humanizado", dando como resultado la producción de un polipéptido con un patrón de glucosilación parcial o completamente humano. Véanse Gerngross, Nat Biotech 22, 1409-1414 (2004) y Li *et al.*, Nat Biotech 24, 210-215 (2006). Las células huésped adecuadas para la expresión de polipéptidos (glucosilados) también se derivan de organismos pluricelulares (invertebrados y vertebrados). Los ejemplos de células de invertebrado incluyen células vegetales y de insecto. Se han identificado numerosas cepas de baculovirus, que se pueden usar junto con células de insecto, en particular, para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*. También se pueden utilizar cultivos de células vegetales como huéspedes. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.ºs 5.959.177, 6.040.498, 6.420.548, 7.125.978 y 6.417.429 (que describen la tecnología PLANTIBODIES™ para producir anticuerpos en plantas transgénicas). También se pueden usar células de vertebrado como huéspedes. Por ejemplo, pueden ser útiles líneas celulares de mamífero que se adaptan para cultivarse en suspensión. Otros ejemplos de líneas de células huésped de mamífero útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7); línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293T como se describe, por ejemplo, en Graham *et al.*, J Gen Virol 36, 59 (1977)), células de riñón de cría de hámster (BHK), células de Sertoli de ratón (células TM4 como se describe, por ejemplo, en Mather, Biol Reprod 23, 243-251 (1980)), células de riñón de mono (CV1), células de riñón de mono verde africano (VERO-76), células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA), células de riñón canino (MDCK), células de hígado de rata búfalo (BRL 3A), células de pulmón humano (W138), células de hígado humano (Hep G2), células de tumor mamario de ratón (MMT

060562), células TRI (como se describe, por ejemplo, en Mather *et al.*, *Annals N.Y. Acad Sci* 383, 44-68 (1982)), células MRC 5 y células FS4. Otras líneas de células huésped de mamífero útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), incluyendo células CHO-dhfr (Urlaub *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 77, 4216 (1980)); y líneas celulares de mieloma tales como YO, NS0, P3X63 y Sp2/0. Para una revisión de determinadas líneas de células huésped de mamífero adecuadas para la producción de proteínas, véase, por ejemplo, Yazaki y Wu, *Methods in Molecular Biology*, vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003). Las células huésped incluyen células cultivadas, por ejemplo, células cultivadas de mamífero, células de levadura, células de insecto, células bacterianas y células vegetales, por nombrar solo unas pocas, pero también células comprendidas en un animal transgénico, planta transgénica o tejido animal o vegetal cultivado. En un aspecto, la célula huésped es una célula eucariota, preferentemente una célula de mamífero, tal como una célula de ovario de hámster chino (CHO), una célula de riñón embrionario humano (HEK) o una célula linfocítica (por ejemplo, célula YO, NS0, Sp20).

Las tecnologías estándar son conocidas en la técnica para expresar genes exógenos en estos sistemas. Las células que expresan un polipéptido que comprende la cadena pesada o bien la ligera de un dominio de unión a antígeno tal como un anticuerpo se pueden genomanipular para expresar también la otra de las cadenas de anticuerpo de modo que el producto expresado es un anticuerpo que tiene tanto una cadena pesada como una ligera.

En un aspecto de la divulgación se proporciona un procedimiento de producción de una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de acuerdo con la invención, en el que el procedimiento comprende cultivar una célula huésped que comprende un polinucleótido que codifica la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T, como se proporciona en el presente documento, en condiciones adecuadas para la expresión de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T, y recuperar la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T a partir de la célula huésped (o medio de cultivo de célula huésped).

Los componentes de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T se fusionan genéticamente entre sí. La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T se puede diseñar de modo que sus componentes se fusionen directamente entre sí o indirectamente a través de una secuencia conectora. La composición y longitud del conector se pueden determinar de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica y se pueden someter a prueba para determinar su eficacia. Los ejemplos de secuencias conectoras entre diferentes componentes de moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T se encuentran en las secuencias proporcionadas en el presente documento. También se pueden incluir secuencias adicionales para incorporar un sitio de escisión para separar los componentes individuales de la fusión si se desea, por ejemplo, una secuencia de reconocimiento de endopeptidasas.

En determinados aspectos, el uno o más restos de unión a antígeno de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T comprenden al menos una región variable de anticuerpo que se puede unir a un determinante antigénico. Las regiones variables pueden formar parte de y derivarse de anticuerpos naturales o no naturales y fragmentos de los mismos. Los procedimientos para producir anticuerpos policlonales y anticuerpos monoclonales son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, "Antibodies, a laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory, 1988). Los anticuerpos no naturales se pueden construir usando síntesis peptídica en fase sólida, se pueden producir de forma recombinante (por ejemplo, como se describe en la patente de EE. UU. n.º 4.186.567) o se pueden obtener, por ejemplo, cribando colecciones combinatorias que comprenden cadenas pesadas variables y cadenas ligeras variables (véase, por ejemplo la patente de EE. UU. n.º 5.969.108 concedida a McCafferty).

Se puede usar cualquier especie de anticuerpo, fragmento de anticuerpo, dominio de unión a antígeno o región variable animal en las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T de la invención. Los anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, dominios de unión a antígeno o regiones variables no limitantes útiles en la presente divulgación pueden ser de origen murino, de primate o humano. Si la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T está destinada para uso humano, se puede usar una forma quimérica de anticuerpo en la que las regiones constantes del anticuerpo son de un ser humano. También se puede preparar una forma humanizada o completamente humana del anticuerpo de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.565.332 concedida a Winter). La humanización se puede lograr por diversos procedimientos incluyendo, pero sin limitarse a (a) injertar las CDR no humanas (por ejemplo, anticuerpo donante) en regiones estructurales y constantes humanas (por ejemplo, anticuerpo receptor) con o sin conservación de los residuos estructurales cruciales (por ejemplo, los que son importantes para conservar buena afinidad de unión a antígeno o funciones de anticuerpo), (b) injertar solo las regiones determinantes de especificidad no humanas (SDR o a-CDR; los residuos cruciales para la interacción anticuerpo-antígeno) en regiones estructurales y constantes humanas, o (c) trasplantar todos los dominios variables no humanos, pero "enmascararlos" con una sección de tipo humana por reemplazo de residuos de superficie. Los anticuerpos humanizados y procedimientos para prepararlos se revisan, por ejemplo, en Almagro y Fransson, *Front Biosci* 13, 1619-1633 (2008), y se describen además, por ejemplo, en Riechmann *et al.*, *Nature* 332, 323-329 (1988); Queen *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 10029-10033 (1989); patentes de EE. UU. n.ºs 5.821.337, 7.527.791, 6.982.321

y 7.087.409; Jones *et al.*, *Nature* 321, 522-525 (1986); Morrison *et al.*, *Proc Natl Acad Sci* 81, 6851-6855 (1984); Morrison y Oi, *Adv Immunol* 44, 65-92 (1988); Verhoeyen *et al.*, *Science* 239, 1534-1536 (1988); Padlan, *Molec Immun* 31(3), 169-217 (1994); Kashmiri *et al.*, *Methods* 36, 25-34 (2005) (que describen un injerto de SDR (a-CDR)); Padlan, *Mol Immunol* 28, 489-498 (1991) (que describe el "rebarnizado"); Dall'Acqua *et al.*, *Methods* 36, 43-60 (2005) (que describen el "reordenamiento de FR"); y Osbourn *et al.*, *Methods* 36, 61-68 (2005) y Klimka *et al.*, *Br J Cancer* 83, 252-260 (2000) (que describen el enfoque de "selección guiada" al reordenamiento de FR). Se pueden producir anticuerpos humanos y regiones variables humanas usando diversas técnicas conocidas en la técnica. Los anticuerpos humanos se describen, en general, en van Dijk y van de Winkel, *Curr Opin Pharmacol* 5, 368-74 (2001) y Lonberg, *Curr Opin Immunol* 20, 450-459 (2008). Las regiones variables humanas pueden formar parte de y derivarse de anticuerpos monoclonales humanos preparados por el procedimiento de hibridoma (véase, por ejemplo, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)). También se pueden preparar anticuerpos humanos y regiones variables humanas administrando un inmunógeno a un animal transgénico que se haya modificado para producir anticuerpos humanos intactos o anticuerpos intactos con regiones variables humanas en respuesta a una exposición antigénica (véase, por ejemplo, Lonberg, *Nat Biotech* 23, 1117-1125 (2005)). También se pueden generar anticuerpos humanos y regiones variables humanas aislando secuencias de regiones variables de clones de Fv seleccionadas de colecciones de presentación en fagos derivadas de humano (véase, por ejemplo, Hoogenboom *et al.*, en *Methods in Molecular Biology* 178, 1-37 (O'Brien *et al.*, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001); y McCafferty *et al.*, *Nature* 348, 552-554; Clackson *et al.*, *Nature* 352, 624-628 (1991)). Típicamente, los fagos presentan fragmentos de anticuerpo, como fragmentos Fv monocatenarios (scFv) o bien como fragmentos Fab.

En determinados aspectos, los restos de unión a antígeno útiles en la presente divulgación se genomanipulan para tener afinidad de unión potenciada de acuerdo con, por ejemplo, los procedimientos divulgados en la pub. de sol. de pat. de EE. UU. n.º 2004/0132066. La capacidad de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de la invención para unirse a un determinante antigénico específico se puede medir a través de un ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA) o bien otras técnicas familiares para un experto en la técnica, por ejemplo, técnica de resonancia de plasmón superficial (analizada en un sistema BIACORE T100) (Liljeblad, *et al.*, *Glyco J* 17, 323-329 (2000)), y ensayos de unión tradicionales (Heeley, *Endocr Res* 28, 217-229 (2002)). Se pueden usar ensayos de competencia para identificar un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, dominio de unión a antígeno o dominio variable que compite con un anticuerpo de referencia por la unión a un antígeno particular, por ejemplo, un anticuerpo que compite con el anticuerpo V9 por la unión a CD3. En determinados aspectos, un anticuerpo competidor de este tipo se une al mismo epítipo (por ejemplo, un epítipo lineal o conformacional) que se une por el anticuerpo de referencia. Se proporcionan procedimientos ejemplares detallados para cartografiar un epítipo al que se une un anticuerpo en Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols", en *Methods in Molecular Biology*, vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ). En un ensayo de competencia ejemplar se incubaba el antígeno inmovilizado (por ejemplo, CD3) en una solución que comprende un primer anticuerpo marcado que se une al antígeno (por ejemplo, el anticuerpo V9, descrito en el documento US 6.054.297) y un segundo anticuerpo no marcado que se somete a prueba para determinar su capacidad para competir con el primer anticuerpo por la unión al antígeno. El segundo anticuerpo puede estar presente en un sobrenadante de hibridoma. Como control, se incubaba el antígeno inmovilizado en una solución que comprende el primer anticuerpo marcado pero no el segundo anticuerpo no marcado. Después de la incubación en condiciones permisivas para la unión del primer anticuerpo al antígeno, se retira el exceso de anticuerpo no unido, y se mide la cantidad de marcador asociado con el antígeno inmovilizado. Si la cantidad de marcador asociado con el antígeno inmovilizado se reduce sustancialmente en la muestra de prueba en relación con la muestra de control, entonces eso indica que el segundo anticuerpo está compitiendo con el primer anticuerpo por la unión al antígeno. Véase Harlow y Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* cap. 14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T preparadas como se describe en el presente documento se pueden purificar por técnicas conocidas en la técnica tales como cromatografía de líquidos de alto rendimiento, cromatografía de intercambio iónico, electroforesis en gel, cromatografía de afinidad, cromatografía de exclusión por tamaño y similares. Las condiciones reales usadas para purificar una proteína particular dependerán, en parte, de factores tales como carga neta, hidrofobia, hidrofilia, etc., y serán evidentes para los expertos en la técnica. Para la purificación por cromatografía de afinidad se puede usar un anticuerpo, ligando, receptor o antígeno al que se une la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T. Por ejemplo, para la purificación por cromatografía de afinidad de moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T de la invención, se puede usar una matriz con proteína A o proteína G. Se pueden usar la cromatografía de afinidad con proteína A o G y la cromatografía de exclusión por tamaño secuenciales para aislar una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T esencialmente como se describe en los ejemplos. Se puede determinar la pureza de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T por cualquiera de una variedad de procedimientos analíticos bien conocidos, incluyendo electroforesis en gel, cromatografía de líquidos de alta presión y similares. Por ejemplo, se demostró que las proteínas de fusión de la cadena pesada expresadas como se describe en los ejemplos estaban intactas y apropiadamente ensambladas como se demostró por SDS-PAGE reductora (véase por ejemplo, la figura 3). Se resolvieron tres bandas a aproximadamente Mr 25.000, Mr 50.000 y Mr 75.000, correspondientes a los pesos moleculares predichos de la proteína de fusión de cadena ligera, cadena pesada y cadena pesada/cadena ligera de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T.

Ensayos

Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T proporcionadas en el presente documento se pueden identificar, cribar o caracterizar para determinar sus propiedades físicas/químicas y/o actividades biológicas por diversos ensayos conocidos en la técnica.

Ensayos de afinidad

La afinidad de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T por un receptor de Fc o un antígeno diana se puede determinar de acuerdo con los procedimientos expuestos en los ejemplos por resonancia de plasmón superficial (SPR), usando instrumentación estándar tal como un instrumento BIAcore (GE Healthcare), y receptores o proteínas diana tales como los que se pueden obtener por expresión recombinante. De forma alternativa, la unión de moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T para diferentes receptores o antígenos diana se puede evaluar usando líneas celulares que expresan el receptor o antígeno diana particular, por ejemplo, por citometría de flujo (FACS). Se describe un aspecto ilustrativo y ejemplar específico para medir la afinidad de unión en lo que sigue y en los ejemplos a continuación.

De acuerdo con un aspecto, se mide K_D por resonancia de plasmón superficial usando una máquina BIACORE® T100 (GE Healthcare) a 25 °C.

Para analizar la interacción entre la porción Fc y los receptores de Fc, se captura el receptor de Fc recombinante con marca His por un anticuerpo anti-Penta-His (Qiagen) inmovilizado en chips CM5 y se usan las construcciones biespecíficas como analitos. En resumen, se activan chips biosensores de dextrano carboximetilado (CM5, GE Healthcare) con clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Se diluye el anticuerpo anti-Penta-His con acetato de sodio 10 mM, pH 5,0, a 40 µg/ml antes de la inyección a un caudal de 5 µl/min para lograr aproximadamente 6500 unidades de respuesta (UR) de proteína acoplada. Tras la inyección del ligando, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos sin reaccionar. Posteriormente, se captura el receptor de Fc durante 60 s a 4 o 10 nM. Para las mediciones cinéticas, se inyectan diluciones sucesivas 1:4 de la construcción biespecífica (intervalo entre 500 nM y 4000 nM) en HBS-EP (GE Healthcare, HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,05 %, pH 7,4) a 25 °C a un caudal de 30 µl/min durante 120 s.

Para determinar la afinidad por el antígeno diana, se capturan las construcciones biespecíficas por un anticuerpo específico anti-Fab humano (GE Healthcare) que se inmoviliza en una superficie de chip de sensor CM5 activado como se describe para el anticuerpo anti-Penta-His. La cantidad final de proteína acoplada es de aproximadamente 12000 UR. Se capturan las construcciones biespecíficas durante 90 s a 300 nM. Se pasan los antígenos diana a través de cubetas de lectura durante 180 s a un intervalo de concentraciones de 250 a 1000 nM con un caudal de 30 µl/min. Se supervisa la disociación durante 180 s.

Se corrigen las diferencias en el índice de refracción aparente restando la respuesta obtenida en la cubeta de lectura de referencia. Se usó la respuesta en situación de equilibrio para derivar la constante de asociación K_d por ajuste de curva no lineal de la isoterma de unión de Langmuir. Se calculan las velocidades de asociación (k_{as}) y velocidades de disociación (k_{dis}) usando un modelo de unión de Langmuir uno a uno simple (programa informático de evaluación BIACORE® T100 versión 1.1.1) ajustando simultáneamente los sensogramas de asociación y disociación. Se calcula la constante de disociación en equilibrio (K_d) como la proporción k_{dis}/k_{as} . Véase, por ejemplo, Chen *et al.*, J Mol Biol 293, 865-881 (1999).

Ensayos de actividad

Se puede medir la actividad biológica de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T de la invención por diversos ensayos como se describe en los ejemplos. Las actividades biológicas pueden incluir, por ejemplo, la inducción de proliferación de linfocitos T, la inducción de señalización en linfocitos T, la inducción de expresión de marcadores de activación en linfocitos T, la inducción de secreción de citocinas por linfocitos T, la inducción de lisis de células diana tales como células tumorales y la inducción de regresión tumoral y/o la mejora de la supervivencia.

Composiciones, formulaciones y vías de administración

En otro aspecto, la divulgación proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T proporcionadas en el presente documento, por ejemplo, para su uso en cualquiera de los procedimientos terapéuticos a continuación. En un aspecto, una composición farmacéutica comprende cualquiera de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T proporcionadas en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otro aspecto, una composición farmacéutica comprende cualquiera de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T proporcionadas en el presente documento y al menos un agente terapéutico adicional,

por ejemplo, como se describe a continuación.

Se describe además en la divulgación un procedimiento de producción de una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de la invención en una forma adecuada para su administración *in vivo*, comprendiendo el procedimiento (a) obtener una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de acuerdo con la invención, y (b) formular la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T con al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable, con lo que se formula una preparación de molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T para su administración *in vivo*.

Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de una o más moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T disueltas o dispersas en un vehículo farmacéuticamente aceptable. La expresión "farmacéutica o farmacológicamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que son en general no tóxicas para los receptores en las dosificaciones y concentraciones empleadas, es decir, no producen una reacción adversa, alérgica u otra reacción indeseable cuando se administran a un animal, tal como, por ejemplo, un ser humano, según sea apropiado. La preparación de una composición farmacéutica que contiene al menos una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T y opcionalmente un ingrediente activo adicional será conocida para los expertos en la técnica en vista de la presente divulgación, como se ejemplifica por Remington's Pharmaceutical Sciences, 18.^a ed. Mack Printing Company, 1990. Además, para administración animal (por ejemplo, humana), se entenderá que las preparaciones deben cumplir las normas de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza como se requiere por la Oficina de normas biológicas de la FDA o las autoridades correspondientes en otros países. Las composiciones preferentes son formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, tampones, medios de dispersión, recubrimientos, tensioactivos, antioxidantes, conservantes (por ejemplo, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos), agentes isotónicos, agentes retardantes de la absorción, sales, conservantes, antioxidantes, proteínas, fármacos, estabilizantes de fármacos, polímeros, geles, aglutinantes, excipientes, agentes disgregantes, lubricantes, agentes edulcorantes, agentes saborizantes, tintes, tales como materiales y combinaciones de los mismos, como será conocido para un experto en la técnica (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18.^a ed. Mack Printing Company, 1990, pp. 1289-1329). Excepto en la medida en que cualquier vehículo convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas o farmacéuticas.

La composición puede comprender diferentes tipos de vehículos dependiendo de si se va a administrar en forma sólida, líquida o aerosol, y si es necesario que sea estéril para dichas vías de administración como inyección. Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T de la presente invención (y cualquier agente terapéutico adicional) se pueden administrar por vía intravenosa, intradérmica, intraarterial, intraperitoneal, intralesional, intracraneal, intraarticular, intraprostática, intraesplénica, intrarrenal, intrapleural, intratraqueal, intranasal, intravítrea, intravaginal, intrarrectal, intratumoral, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, subconjuntiva, intravesicular, mucosal, intrapericárdica, intraumbilical, intraocular, oral, tópica, local, por inhalación (por ejemplo, inhalación por aerosol), inyección, infusión, infusión continua, perfusión localizada con baño de células diana directo, por medio de un catéter, por medio de un lavado, en cremas, en composiciones lipídicas (por ejemplo, liposomas), o por otro procedimiento o cualquier combinación de los anteriores como sería conocido para un experto en la técnica (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18.^a ed. Mack Printing Company, 1990). La administración parenteral, en particular inyección intravenosa, se usa más comúnmente para administrar moléculas polipeptídicas tales como las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T de la invención.

Las composiciones parenterales incluyen las diseñadas para administración por inyección, por ejemplo, inyección subcutánea, intradérmica, intralesional, intravenosa, intraarterial, intramuscular, intratecal o intraperitoneal. Para inyección, las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T de la invención se pueden formular en soluciones acuosas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como solución de Hank, solución de Ringer o solución salina fisiológica. La solución puede contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersión. De forma alternativa, las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T pueden estar en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril sin pirógenos, antes de su uso. Se preparan soluciones inyectables estériles incorporando las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T de la invención en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con diversos de los otros ingredientes enumerados a continuación, según se requiera. La esterilidad se puede lograr fácilmente, por ejemplo, por filtración a través de membranas de filtración estériles. En general, se preparan dispersiones incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y/o los otros ingredientes. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, suspensiones o emulsión, los procedimientos preferentes de preparación son técnicas de secado al vacío o liofilización que proporcionan un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de un medio líquido previamente filtrado estéril del mismo. El medio líquido se debe tamponar adecuadamente si es necesario y el diluyente líquido se debe volver isotónico en primer lugar antes de la inyección con solución salina o glucosa suficiente. La composición debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento, y conservarse frente a la acción

contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. Se apreciará que la contaminación por endotoxinas se debe mantener al mínimo a un nivel seguro, por ejemplo, menos de 0,5 ng/mg de proteína. Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, pero no se limitan a: tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquilparabenos tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; glúcidos tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como polietilenglicol (PEG). Las suspensiones inyectables acuosas pueden contener compuestos que incrementan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol, dextrano o similares. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes o agentes adecuados que incrementan la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas. Adicionalmente, se pueden preparar suspensiones de los compuestos activos como suspensiones inyectables oleosas apropiadas. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleatos de etilo o triglicéridos, o liposomas.

Se pueden atrapar ingredientes activos en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas de administración de fármaco coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se divulgan en Remington's Pharmaceutical Sciences (18.^a ed. Mack Printing Company, 1990). Se pueden preparar preparaciones de liberación mantenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación mantenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el polipéptido, matrices que están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas, o microcápsulas. En aspectos particulares, se puede conseguir una absorción prolongada de una composición inyectable por el uso en las composiciones de agentes retardantes de la absorción, tales como, por ejemplo, monoestearato de aluminio, gelatina o combinaciones de los mismos.

Además de las composiciones descritas previamente, las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T también se pueden formular como preparación de liberación lenta. Dichas formulaciones de acción prolongada se pueden administrar por implantación (por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular) o por inyección intramuscular. Por tanto, por ejemplo, las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T se pueden formular con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados escasamente solubles, por ejemplo, como una sal escasamente soluble.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T de la invención se pueden fabricar por medio de procedimientos de mezclado, disolución, emulsión, encapsulación, atrapamiento o liofilización convencionales. Las composiciones farmacéuticas se pueden formular de manera convencional usando uno o más vehículos, diluyentes, excipientes o coadyuvantes fisiológicamente aceptables que facilitan el procesamiento de las proteínas en preparaciones que se pueden usar farmacéuticamente. La formulación apropiada depende de la vía de administración elegida.

Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T se pueden formular en una composición en forma de ácido o base libre, neutra o salina. Las sales farmacéuticamente aceptables son sales que conservan sustancialmente la actividad biológica del ácido o base libre. Estas incluyen las sales de adición de ácido, por ejemplo, las formadas con los grupos amino libres de una composición proteínica, o que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o dichos ácidos orgánicos como ácido acético, oxálico, tartárico o mandélico. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también se pueden derivar de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férrico; o dichas bases orgánicas como isopropilamina, trimetilamina, histidina o procaina. Las sales farmacéuticas tienden a ser más solubles en disolventes acuosos y otros disolventes próticos que las correspondientes formas de base libre.

Procedimientos y composiciones terapéuticos

Se puede usar cualquiera de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T proporcionadas en el presente documento en procedimientos terapéuticos. Se pueden usar moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T de la divulgación como agentes inmunoterápicos, por ejemplo, en el tratamiento de cánceres.

Para su uso en procedimientos de tratamiento de enfermedades, las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T de la invención, se formularían, dosificarían y administrarían de modo consecuente con

el correcto ejercicio de la medicina. Los factores para su consideración en este contexto incluyen el trastorno particular que se está tratando, el mamífero particular al que se está tratando, el estado clínico del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el procedimiento de administración, la pauta de administración y otros factores conocidos por los médicos.

En un aspecto de la divulgación se proporcionan moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T para su uso como un medicamento. En otros aspectos de la divulgación se proporcionan moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T para su uso en el tratamiento de una enfermedad. En un aspecto, la divulgación proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T como se describe en el presente documento para su uso en el tratamiento de una enfermedad en un individuo que lo necesite. En determinados aspectos de la divulgación, la divulgación proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T para su uso en el tratamiento de un individuo que tiene una enfermedad que comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T. En determinados aspectos, la enfermedad que se va a tratar es un trastorno proliferativo. En un aspecto particular de la divulgación, la enfermedad es cáncer. En determinados aspectos de la divulgación, el uso comprende además administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, un agente antineoplásico si la enfermedad que se va a tratar es cáncer. En otros aspectos, la divulgación proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T como se describe en el presente documento para su uso en la inducción de lisis de una célula diana, en particular una célula tumoral. En determinados aspectos, la divulgación proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T para su uso en la inducción de lisis de una célula diana, en particular una célula tumoral, en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T para inducir la lisis de una célula diana. Un "individuo" de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores es un mamífero, preferentemente un ser humano.

En otro aspecto, la divulgación proporciona el uso de una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de la invención en la fabricación o preparación de un medicamento. En un aspecto, el medicamento es para el tratamiento de una enfermedad en un individuo que lo necesita. En otro aspecto, el medicamento es para su uso en el tratamiento de una enfermedad que comprende administrar a un individuo que tiene la enfermedad una cantidad terapéuticamente eficaz del medicamento. En determinados aspectos, la enfermedad que se va a tratar es un trastorno proliferativo. En un aspecto particular de la divulgación, la enfermedad es cáncer. En un modo de realización, el uso comprende además administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, un agente antineoplásico si la enfermedad que se va a tratar es cáncer. En otro aspecto, el medicamento es para inducir la lisis de una célula diana, en particular una célula tumoral. Todavía en otro aspecto, el medicamento es para su uso en la inducción de lisis de una célula diana, en particular una célula tumoral, en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del medicamento para inducir la lisis de una célula diana. Un "individuo" de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores puede ser un mamífero, preferentemente un ser humano.

En determinados aspectos de la divulgación, la enfermedad que se va a tratar es un trastorno proliferativo, en particular cáncer. Los ejemplos no limitantes de cánceres incluyen cáncer de vejiga, cáncer de cerebro, cáncer de cabeza y cuello, cáncer pancreático, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer ovárico, cáncer uterino, cáncer de cuello uterino, cáncer endometrial, cáncer esofágico, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer rectal, cáncer gástrico, cáncer de próstata, neoplasia hemática, cáncer de piel, carcinoma de células escamosas, cáncer de huesos y cáncer de riñón. Otros trastornos de proliferación celular que se pueden tratar usando una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de la presente invención incluyen, pero no se limitan a neoplasias localizadas en el(los)/la(s): abdomen, hueso, mama, aparato digestivo, hígado, páncreas, peritoneo, glándulas endocrinas (suprarrenal, paratiroidea, pituitaria, testículos, ovario, timo, tiroidea), ojo, cabeza y cuello, sistema nervioso (central y periférico), sistema linfático, aparato genital femenino, piel, tejidos blandos, bazo, región torácica y sistema urogenital. También se incluyen afecciones o lesiones precancerosas y metástasis de cáncer. En determinados aspectos, el cáncer se elige del grupo que consiste en cáncer de células renales, cáncer de piel, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de cerebro, cáncer de cabeza y cuello. Un experto en la técnica reconoce fácilmente que en muchos casos es posible que la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T no proporcione una cura sino que solo proporcione un beneficio parcial. En algunos aspectos, un cambio fisiológico que tiene algo de beneficio también se considera terapéuticamente beneficioso. Por tanto, en algunos aspectos, una cantidad de molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que proporciona un cambio fisiológico se considera una "cantidad eficaz" o una "cantidad terapéuticamente eficaz". El sujeto, paciente o individuo que necesita tratamiento es típicamente un mamífero, más específicamente un ser humano.

En algunos aspectos, una cantidad eficaz de una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de la invención se administra a una célula. En otros aspectos, una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de la invención se administra a un individuo para el tratamiento de una enfermedad.

Para la prevención o tratamiento de una enfermedad, la dosificación apropiada de una molécula de unión a

antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de la invención (cuando se usa sola o en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticos adicionales) dependerá del tipo de la enfermedad que se va a tratar, la vía de administración, el peso corporal del paciente, el tipo de molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T, la gravedad y evolución de la enfermedad, si la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T se administra con propósitos preventivos o terapéuticos, intervenciones terapéuticas previas o coincidentes, la anamnesis y respuesta del paciente a la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T, y el criterio del médico especialista. El profesional responsable para su administración determinará, en cualquier caso, la concentración del/de los ingrediente(s) activo(s) en una composición y la(s) dosis apropiada(s) para el sujeto individual. En el presente documento se contemplan diversas pautas posológicas incluyendo pero sin limitarse a administraciones únicas o múltiples durante diversos puntos temporales, administración por inyección intravenosa rápida e infusión pulsada.

La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T se administra de forma adecuada al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, aproximadamente de 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo, 0,1 mg/kg - 10 mg/kg) de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T puede ser una dosificación candidata inicial para su administración al paciente, ya sea, por ejemplo, por una o más administraciones separadas, o por infusión continua. Una dosificación diaria típica podría variar de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento se mantendría, en general, hasta que se produzca una supresión deseada de los síntomas de enfermedad. Una dosificación ejemplar de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T sería en el intervalo de aproximadamente 0,005 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. En otros ejemplos no limitantes, una dosis también puede comprender de aproximadamente 1 microgramo/kg de peso corporal, aproximadamente 5 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 10 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 50 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 100 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 200 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 350 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 500 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 1 miligramo/kg de peso corporal, aproximadamente 5 miligramos/kg de peso corporal, aproximadamente 10 miligramos/kg de peso corporal, aproximadamente 50 miligramos/kg de peso corporal, aproximadamente 100 miligramos/kg de peso corporal, aproximadamente 200 miligramos/kg de peso corporal, aproximadamente 350 miligramos/kg de peso corporal, aproximadamente 500 miligramos/kg de peso corporal, a aproximadamente 1000 mg/kg de peso corporal o más por administración, y cualquier intervalo derivable en los mismos. En ejemplos no limitantes de un intervalo derivable de los números enumerados en el presente documento, se puede administrar un intervalo de aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 5 microgramos/kg de peso corporal a aproximadamente 500 miligramos/kg de peso corporal, etc., en base a los números descritos anteriormente. Por tanto, se pueden administrar al paciente una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 5,0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas). Dichas dosis se pueden administrar de forma intermitente, por ejemplo, cada semana o cada tres semanas (por ejemplo, de modo que el paciente reciba de aproximadamente dos a aproximadamente veinte, o por ejemplo, aproximadamente seis dosis de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T). Se puede administrar una dosis de carga mayor inicial, seguido de una o más dosis menores. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas posológicas. El curso de este tratamiento se supervisa fácilmente por técnicas y ensayos convencionales.

Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T de la invención se usarán en general en una cantidad eficaz para lograr el propósito pretendido. Para su uso para tratar o evitar un estado de enfermedad, las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T de la invención, o composiciones farmacéuticas de las mismas, se administran o aplican en una cantidad terapéuticamente eficaz. La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz está bien dentro de las capacidades de los expertos en la técnica, en especial en vista de la divulgación detallada proporcionada en el presente documento.

Para la administración sistémica, se puede estimar inicialmente una dosis terapéuticamente eficaz a partir de ensayos *in vitro*, tales como ensayos de cultivo celular. A continuación se puede formular una dosis en modelos animales para lograr un intervalo de concentraciones circulantes que incluye la CI_{50} como se determina en el cultivo celular. Se puede usar dicha información para determinar con más exactitud dosis útiles en seres humanos.

También se pueden estimar dosificaciones iniciales a partir de datos *in vivo*, por ejemplo, modelos animales, usando técnicas que son bien conocidas en la técnica. Un experto en la técnica podría optimizar fácilmente la administración a seres humanos en base a los datos en animales.

La cantidad e intervalo de dosificación se pueden ajustar individualmente para proporcionar niveles plasmáticos de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T que sean suficientes para mantener un efecto terapéutico. Las dosificaciones de paciente habituales para administración por inyección varían de aproximadamente 0,1 a 50 mg/kg/día, típicamente de aproximadamente 0,5 a 1 mg/kg/día. Se pueden lograr niveles plasmáticos terapéuticamente eficaces administrando dosis múltiples cada día. Los niveles en plasma se pueden medir, por ejemplo, por HPLC.

En los casos de administración local o captación selectiva, es posible que la concentración local eficaz de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T no esté relacionada con la concentración plasmática. Un experto en la técnica podrá optimizar dosificaciones locales terapéuticamente eficaces sin experimentación excesiva.

Una dosis terapéuticamente eficaz de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T descritas en el presente documento proporcionará en general un beneficio terapéutico sin provocar toxicidad sustancial. La toxicidad y la eficacia terapéutica de una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T se pueden determinar por procedimientos farmacéuticos estándar en cultivo celular o animales de experimentación. Se pueden usar ensayos de cultivo celular y estudios en animales para determinar la DL_{50} (la dosis letal para un 50 % de una población) y la DE_{50} (la dosis terapéuticamente eficaz en un 50 % de una población). La proporción de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico, que se puede expresar como la proporción DL_{50}/DE_{50} . Son preferentes las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T que presentan índices terapéuticos grandes. En un aspecto, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de acuerdo con la presente invención presenta un índice terapéutico alto. Los datos obtenidos a partir de ensayos de cultivo celular y estudios en animales se pueden usar en la formulación de un intervalo de dosificaciones adecuado para su uso en seres humanos. Preferentemente, la dosificación se encuentra dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la DE_{50} con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de una variedad de factores, por ejemplo, la forma de dosificación empleada, la vía de administración utilizada, la afección del sujeto y similares. La formulación exacta, vía de administración y dosificación se pueden elegir por el médico individual en vista de la afección del paciente (véase, por ejemplo, Fingl *et al.*, 1975, en: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, cap. 1, p. 1).

El médico especialista para pacientes tratados con moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T de la invención sabría cómo y cuándo finalizar, interrumpir o ajustar la administración debido a toxicidad, disfunción orgánica y similares. A la inversa, el médico especialista también sabría ajustar el tratamiento a niveles mayores si la respuesta clínica no fuera adecuada (excluyendo la toxicidad). La magnitud de una dosis administrada en el abordaje del trastorno de interés variará con la gravedad de la afección que se va a tratar, con la vía de administración y similares. La gravedad de la afección, por ejemplo, se puede evaluar, en parte, por procedimientos de evaluación de pronóstico estándar. Además, la dosis y quizás la frecuencia de dosis también variarán de acuerdo con la edad, el peso corporal y la respuesta del paciente individual.

Otros agentes y tratamientos

Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T de la invención se pueden administrar en combinación con uno o más de otros agentes en el tratamiento. Por ejemplo, una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de la invención se puede coadministrar con al menos un agente terapéutico adicional. El término "agente terapéutico" engloba cualquier agente administrado para tratar un síntoma o enfermedad en un individuo que necesita dicho tratamiento. Dicho agente terapéutico adicional puede comprender cualquier ingrediente activo adecuado para la indicación particular que se está tratando, preferentemente aquel con actividades complementarias que no se ven afectadas de forma adversa entre sí. En determinados aspectos, un agente terapéutico adicional es un agente inmunomodulador, un agente citostático, un inhibidor de la adhesión celular, un agente citotóxico, un activador de la apoptosis celular o un agente que incrementa la sensibilidad de las células por los inductores apoptóticos. En un aspecto particular, el agente terapéutico adicional es un agente antineoplásico, por ejemplo, un alterador de los microtúbulos, un antimetabolito, un inhibidor de topoisomerasas, un intercalador de ADN, un agente alquilante, un tratamiento hormonal, un inhibidor de cinasas, un antagonista de receptores, un activador de la apoptosis de células tumorales o un agente antiangiogénico.

Dichos otros agentes están presentes adecuadamente en combinación en cantidades que son eficaces para el propósito pretendido. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T usada, el tipo de trastorno o tratamiento y otros factores analizados anteriormente. Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T se usan en general en las mismas dosificaciones y con vías de administración como se describe en el presente documento, o aproximadamente de un 1 a un 99 % de las dosificaciones descritas en el presente documento, o en cualquier dosificación y por cualquier vía que se determine empírica/clínicamente como apropiada.

Dichas politerapias indicadas anteriormente engloban la administración combinada (donde dos o más agentes terapéuticos se incluyen en la misma o en composiciones separadas), y la administración separada, en este caso se puede producir la administración de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de la invención antes de, simultáneamente con y/o tras la administración del agente terapéutico y/o coadyuvante adicional. También se pueden usar las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T de la invención en combinación con radioterapia.

Artículos de fabricación

En otro aspecto de la divulgación, se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una ficha técnica o prospecto del envase en o asociado con el recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringuillas, bolsas de solución i.v., etc. Los recipientes se pueden formar a partir de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que por sí misma o combinada con otra composición es eficaz para tratar, evitar y/o diagnosticar la afección y puede tener una vía de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de la invención. La ficha técnica o prospecto del envase indica que la composición se usa para tratar la afección de elección. Además, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer recipiente con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de la invención; y (b) un segundo recipiente con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende otro agente citotóxico o de otro modo terapéutico. El artículo de fabricación en este aspecto de la divulgación puede comprender además un prospecto del envase que indica que las composiciones se pueden usar para tratar una afección particular. De forma alternativa, o adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo (o tercer) recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyectables (BWI), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringuillas.

Ejemplos

Los siguientes son ejemplos de procedimientos y composiciones de la invención y la divulgación. Se entiende que se pueden poner en práctica otros modos de realización diversos, dada la descripción general proporcionada anteriormente.

Procedimientos generales

Técnicas de ADN recombinante

Se usaron procedimientos estándar para manipular ADN como se describe en Sambrook *et al.*, Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. Se usaron los reactivos biológicos moleculares de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La información general con respecto a las secuencias de nucleótidos de las cadenas ligera y pesada de inmunoglobulinas humanas se da en: Kabat, E.A. *et al.*, (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a ed., publicación NIH n.º 91-3242.

Secuenciación de ADN

Se determinaron secuencias de ADN por secuenciación de doble hebra.

Síntesis génica

Se generaron segmentos de genes deseados, cuando se requirió, por PCR usando moldes apropiados o bien se sintetizaron por Geneart AG (Ratisbona, Alemania) a partir de oligonucleótidos sintéticos y productos de PCR por síntesis génica automatizada. En casos donde no estaba disponible ninguna secuencia génica exacta, se diseñaron cebadores oligonucleotídicos en base a las secuencias de los homólogos más cercanos y se aislaron los genes por RT-PCR a partir del ARN que se origina del tejido apropiado. Se clonaron los segmentos génicos flanqueados por sitios de escisión de endonucleasas de restricción singulares en vectores de clonación/secuenciación estándar. Se purificó el ADN plasmídico a partir de bacterias transformadas y se determinó la concentración por espectroscopia UV. Se confirmó la secuencia de ADN de los fragmentos génicos subclonados por secuenciación de ADN. Se diseñaron segmentos génicos con sitios de restricción adecuados para permitir la subclonación en los respectivos vectores de expresión. Se diseñaron todas las construcciones con una secuencia de ADN del extremo 5' que codifica un péptido líder que selecciona proteínas para su secreción en células eucariotas.

Ejemplo 1

Preparación de anticuerpos biespecíficos de linfocitos T (TCB) con y sin modificaciones de carga (anti-CD20/anti-CD3)

Se prepararon las siguientes moléculas en este ejemplo, las ilustraciones esquemáticas de las mismas se muestran en la figura 2:

A. "2+1 IgG CrossFab, invertida" sin modificaciones de carga (intercambio CH1/CL en proteína de unión a CD3)

(figura 2A, SEQ ID NO 14-17)

B. "2+1 IgG CrossFab, invertida" con modificaciones de carga (intercambio VH/VL en proteína de unión a CD3, modificación de carga en proteínas de unión a CD20) (figura 2B, SEQ ID NO 18-21)

C. "2+1 IgG CrossFab" con modificaciones de carga (intercambio VH/VL en proteína de unión a CD3, modificación de carga en proteínas de unión a CD20) (figura 2C, SEQ ID NO 32, 19-21)

D. "2+1 IgG CrossFab, invertida" sin modificaciones de carga (intercambio VH/VL en proteína de unión a CD3) (figura 2D, SEQ ID NO 33, 15, 17, 21)

E. "2+1 IgG CrossFab, invertida" sin modificaciones de carga (intercambio VH-CH1/VL-CL en proteína de unión a CD3) (figura 2E, SEQ ID NO 34, 15, 17, 35)

F. "2+1 IgG CrossFab, invertida" con modificaciones de carga (intercambio VH/VL en proteínas de unión a CD20, modificación de carga en proteína de unión a CD3) (figura 2F, SEQ ID NO 36-39)

G. "2+1 IgG CrossFab, invertida" con modificaciones de carga y mutación DDKK en región Fc (intercambio VH/VL en proteína de unión a CD3, modificación de carga en proteínas de unión a CD20) (figura 2G, SEQ ID NO 40, 41, 20, 21)

H. "1+1 CrossMab" con modificaciones de carga (intercambio VH/VL en proteína de unión a CD3, modificación de carga en proteína de unión a CD20) (figura 2H, SEQ ID NO 42, 43, 20, 21)

I. "1+1 CrossMab" con modificaciones de carga (intercambio VH/VL en proteína de unión a CD3, modificación de carga en proteína de unión a CD20, proteína de unión a CD20 diferente) (figura 2I, SEQ ID NO 43-45, 21)

J. "2+1 IgG CrossFab, invertida" con modificaciones de carga 213E, 123R (intercambio VH/VL en proteína de unión a CD3, modificación de carga en proteína de unión a CD20) (figura 2J, SEQ ID NO 69-71, 21)

K. "2+1 IgG CrossFab, invertida" con modificaciones de carga (intercambio VH/VL y modificación de carga en proteína de unión a CD3) (figura 2K, SEQ ID NO 15, 17, 72, 73).

Se subclonaron las secuencias de ADN de la región variable de la cadena pesada y ligera dentro del marco de lectura con la cadena pesada constante o bien la cadena ligera constante preinsertada en el respectivo vector de expresión de mamífero receptor. Se impulsa la expresión de proteínas por un promotor de MPSV y una secuencia señal de poli A sintética está presente en el extremo 3' de la CDS. Además, cada vector contiene una secuencia OriP del VEB.

Se produjeron las moléculas cotransfectando células HEK293-EBNA que estaban cultivadas en suspensión con los vectores de expresión de mamífero usando polietilenimina (PEI). Se transfectaron las células con los correspondientes vectores de expresión en una proporción 1:2:1:1 (A: "vector cadena pesada (VH-CH1-VH-CL-CH2-CH3)": "vector cadena ligera (VL-CL)": "vector cadena pesada (VH-CH1-CH2-CH3)": "vector cadena ligera (VL-CH1)"; B, D, G, J, K: "vector cadena pesada (VH-CH1-VL-CH1-CH2-CH3)": "vector cadena ligera (VL-CL)": "vector cadena pesada (VH-CH1-CH2-CH3)": "vector cadena ligera (VH-CL)"; C: "vector cadena pesada (VL-CH1-VH-CH1-CH2-CH3)": "vector cadena ligera (VL-CL)": "vector cadena pesada (VH-CH1-CH2-CH3)": "vector cadena ligera (VH-CL)"; E: "vector cadena pesada (VH-CH1-VL-CL-CH2-CH3)": "vector cadena ligera (VL-CL)": "vector cadena pesada (VH-CH1-CH2-CH3)": "vector cadena ligera (VH-CH1)"; F: "vector cadena pesada (VL-CH1-VH-CH1-CH2-CH3)": "vector cadena ligera (VH-CL)": "vector cadena pesada (VL-CH1-CH2-CH3)": "vector cadena ligera (VH-CH1)"); o una proporción 1:1:1:1 (H, I: "vector cadena pesada (VL-CH1-CH2-CH3)": "vector cadena ligera (VL-CL)": "vector cadena pesada (VH-CH1-CH2-CH3)": "vector cadena ligera (VH-CL)").

Para la transfección, se cultivaron células HEK293 EBNA en suspensión sin suero en medio de cultivo Excell que contenía L-glutamina 6 mM y 250 mg/l de G418. Para la producción en matraces TubeSpin de 600 ml (volumen de trabajo máx. de 400 ml), se sembraron 600 millones de células HEK293 EBNA 24 horas antes de la transfección. Para la transfección, se centrifugaron las células durante 5 min a 210 x g, y se reemplazó el sobrenadante por 20 ml de medio CD CHO precalentado. Se mezclan vectores de expresión en 20 ml de medio CD CHO hasta una cantidad final de 400 µg de ADN. Después de la adición de 1080 µl de solución PEI (2,7 µg/ml), se agitó en vórtex la mezcla durante 15 s y posteriormente se incubó durante 10 min a temperatura ambiente. Después de esto, se mezclaron las células con la solución de ADN/PEI, se transfirieron a un matraz TubeSpin de 600 ml y se incubaron durante 3 horas a 37 °C en una estufa de incubación con una atmósfera de CO₂ al 5 %. Después de la incubación, se añadieron 360 ml de Excell + L-glutamina 6 mM + 5 g/l de Pepsoy + medio VPA 1,0 mM y se cultivaron las células durante 24 horas. Un día después de la transfección, se añadió un 7 % de Feed 1 (Lonza). Después de 7 días de cultivo, se recogió el sobrenadante para purificación por centrifugación durante 20 - 30 min a 3600 x g (centrífuga Sigma 8K), se filtró de forma estéril la solución (filtro de 0,22 µm) y se añadió acida de sodio en una concentración final de un 0,01 % p/v. Se mantuvo la solución a 4 °C.

Se determinó la concentración de las construcciones en el medio de cultivo por proteína A-HPLC. La base de la separación fue la unión de moléculas que contenían Fc en proteína A a pH 8,0 y una etapa de elución de pH 2,5. Hubo dos fases móviles. Estas fueron los tampones Tris (10 mM) - glicina (50 mM) - NaCl (100 mM), idénticas excepto porque se ajustaron a diferentes pH (8 y 2,5). El cuerpo de columna fue una precolumna Upchurch de 2x20 mm con un volumen interno de ~63 µl rellena con POROS 20A. Se inyectaron 100 µl de cada muestra en material equilibrado con un caudal de 0,5 ml/min. Después de 0,67 minutos, se eluyó la muestra con una etapa de pH a pH 2,5. Se realizó la cuantificación por determinación de la absorbancia a 280 nm y el cálculo usando una curva estándar con un intervalo de concentraciones de IgG1 humana de 16 a 166 mg/l.

Se purificó la proteína secretada de los sobrenadantes de cultivo celular por cromatografía de afinidad usando cromatografía de afinidad con proteína A, seguido de una etapa de cromatografía de exclusión por tamaño.

Para la cromatografía de afinidad, se cargó sobrenadante en una columna de proteína A HiTrap HP (VC=5 ml, GE Healthcare) equilibrada con 25 ml de fosfato de sodio 20 mM, citrato de sodio 20 mM, pH 7,5. Se retiró la proteína no unida lavando con al menos 10 volúmenes de columna de fosfato de sodio 20 mM, citrato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 0,5 M, pH 7,5, seguido de una etapa de lavado adicional usando 6 volúmenes de columna de fosfato de sodio 10 mM, citrato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 0,5 M, pH 5,45. Se lavó la columna posteriormente con 20 ml de MES 10 mM, cloruro de sodio 100 mM, pH 5,0, y se eluyó la proteína diana en 6 volúmenes de columna de citrato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 100 mM, glicina 100 mM, pH 3,0. Se neutralizó la solución de proteína añadiendo 1/10 de fosfato de sodio 0,5 M, pH 8,0. Se concentró la proteína diana y se filtró antes de su carga en una columna HiLoad Superdex 200 (GE Healthcare) equilibrada con histidina 20 mM, cloruro de sodio 140 mM, Tween-20 al 0,01 %, pH 6,0. Se tuvo que purificar la molécula A por una etapa de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) preparativa adicional para lograr un contenido en monómero final de un 100 %. Por lo tanto, se agruparon las fracciones con mayor contenido en monómero de la primera etapa de exclusión por tamaño, se concentró y de nuevo se cargó en una columna HiLoad Superdex 200 (GE Healthcare). Esta etapa de purificación adicional no fue necesaria para las otras moléculas (sin embargo, dependiendo del perfil de producto secundario, el agrupamiento de las fracciones y por lo tanto la recuperación después de la primera cromatografía de exclusión por tamaño fue diferente para estas moléculas).

Se analizó la pureza y el peso molecular de las moléculas después de la primera etapa de purificación (cromatografía de afinidad con proteína A) por SDS-PAGE en ausencia de un agente reductor y tinción con Coomassie (SimpleBlue™ SafeStain, Invitrogen). Se usó el sistema de geles NuPAGE® Pre-Cast (Invitrogen, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (geles tris-acetato al 4-12 % o bis-tris al 4-12 %).

Se determinó la concentración de proteína de las muestras de proteínas purificadas midiendo la densidad óptica (DO) a 280 nm, usando el coeficiente de extinción molar calculado sobre la base de la secuencia de aminoácidos.

Se analizaron la pureza y el peso molecular de las moléculas después de la etapa de purificación final por análisis por CE-SDS en presencia y ausencia de un agente reductor. Se usó el sistema Caliper LabChip GXII (Caliper lifescience) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se usaron 2 µg de muestra para los análisis.

Se analizó el contenido en agregado de las muestras de anticuerpo usando una columna de exclusión por tamaño analítica TSKgel G3000 SW XL (Tosoh) en K₂HPO₄ 25 mM, NaCl 125 mM, monoclóhidrato de L-arginina 200 mM, NaN₃ al 0,02 % (p/v), tampón de migración a pH 6,7 a 25 °C.

Se produjeron todas las moléculas y se purificaron siguiendo el mismo procedimiento (excepto para la molécula A que se ha sometido a una etapa de SEC adicional, como se indica anteriormente).

La molécula A mostró un alto contenido en agregado después de la primera cromatografía de exclusión por tamaño preparativa. El contenido de agregados después de esta etapa de purificación no se pudo determinar puesto que no hubo separación de referencia de impurezas de alto peso molecular y la fracción monómera. Para obtener material monómero al 100 % fue necesaria una etapa de cromatografía de exclusión por tamaño preparativa adicional. La molécula B fue monómera al 100 % después de una cromatografía de exclusión por tamaño preparativa.

La concentración en el sobrenadante fue mayor para la molécula A, pero el rendimiento final fue (debido al alto contenido en agregado) 2,3 veces menor que para la molécula B (tabla 2).

La pureza final mostrada por los análisis por CE-SDS fue mayor para la molécula B que para la molécula A (tabla 3, figura 3A y B). La figura 3M y 3N muestran los cromatogramas de la etapa de purificación por SEC (SEC preparativa) en la que molécula A tiene un pico ancho en comparación con la molécula B, lo que indica que la preparación de la molécula A cargada en la SEC no es homogénea mientras que la preparación de la molécula B es mayoritariamente monómera.

La molécula C se pudo producir con un valor alto pero en comparación con la molécula B la recuperación final fue

menor debido a un alto contenido de productos secundarios que no se pudieron retirar completamente por los procedimientos de cromatografía aplicados (tabla 2; tabla 3; figura 3B y J, y figura 3C y K). Como se muestra en la figura 3B y 3K, el análisis por SDS-PAGE después de la etapa de purificación con proteína A no mostró productos secundarios para la molécula B, mientras que la preparación de la molécula C contiene algunos productos secundarios que aparecen a un peso molecular aparente de 100 kDa.

La molécula D difiere de la molécula B solo en ausencia de los residuos cargados en los Fab anti-CD20. Esta molécula también se pudo producir de forma transitoria con un valor alto pero como ya se describió para la molécula C la calidad final mostrada en la SEC analítica (monómero al 98 % para la molécula D, frente a monómero al 100 % para la molécula B) y la recuperación fue menor que para la molécula B debido a un alto contenido de productos secundarios (tabla 2; tabla 3; figura 3B y J y figura 3D y L). Como se muestra en la figura 3J y 3L, el análisis por SDS-PAGE después de la etapa de purificación con proteína A no mostró productos secundarios para la molécula B, mientras que la preparación de la molécula D contiene algunos productos secundarios que aparecen a un peso molecular aparente de 66 kDa y 40 kDa. La figura 3N y 3O muestran los cromatogramas de la etapa de purificación por SEC (SEC preparativa) en la que molécula D tiene un pico ancho en comparación con la molécula B, lo que indica que la preparación de la molécula D cargada en la SEC no es homogénea mientras que la preparación de la molécula B es mayoritariamente monómera.

Además, el valor de la producción de la molécula E fue alto pero el producto final todavía contenía impurezas de bajo peso molecular como se muestra por SEC analítica y electroforesis capilar (tabla 2; tabla 3; figura 3E).

Por el contrario que para la molécula B, la molécula F tiene el intercambio VH-VL en el Fab del resto de unión a diana tumoral mientras que las modificaciones de carga se han introducido en el Fab anti-CD3. Esta molécula se pudo producir con valores altos también, pero la recuperación final fue baja debido a los productos secundarios. Para el TCB anti-CD20/anti-CD3, el formato con modificaciones de carga en el Fab anti-CD20 es preferente con respecto a la producción y purificación.

La molécula G es una molécula con modificaciones de carga en la región Fc ("DD" = K392D; K409D en una de las subunidades del dominio Fc, "KK" = D356K; D399K en la otra de las subunidades del dominio Fc (numeración EU), reemplazando la mutación "botón en ojal". La generación de moléculas biespecíficas se fomenta por la introducción de dos residuos de ácido aspártico en una cadena pesada y dos residuos de lisina en la segunda cadena pesada (figura 2G). Esta molécula se pudo producir con un valor alto pero el producto final todavía tiene algunas impurezas de alto y bajo peso molecular mostradas por SEC analítica y electroforesis capilar (tabla 2; tabla 3) mientras que los productos secundarios se pudieron retirar completamente para la misma molécula que tiene la mutación "botón en ojal" (molécula B).

La molécula I, que difiere de la molécula H en su proteína de unión a CD20, mostró un contenido en agregado mayor después de la cromatografía de exclusión por tamaño preparativa final en comparación con la molécula H. La pureza final mostrada por los análisis por CE-SDS fue mayor para la molécula H que para la molécula I (tabla 3; figura 3H y I). Además, la recuperación para la molécula H fue un 40 % mayor que para la I (tabla 2). Este resultado muestra que la calidad de la molécula también es dependiente del anticuerpo usado en el formato biespecífico de linfocitos T.

Las producciones de la molécula J y la molécula K tuvieron un buen valor de partida lo que dio lugar a un buen rendimiento. Sin embargo, la recuperación final de alrededor de un 20 % para ambas moléculas estuvo muy por debajo del 48 % logrado con la molécula B (tabla 2). Ambas moléculas son similares en la calidad final con un contenido en monómero de >99 % (tabla 2). La pureza en CE-SDS sin reducción es mejor para la molécula J (que carece de las modificaciones de carga en la posición 124 del dominio CL y posición 147 del dominio CH1) con casi un 99 % en comparación con la molécula K (que tiene modificaciones de carga y un intercambio VL-VH en la proteína de unión a CD3) con un 90 % (tabla 3, figura 3N y 3O). La molécula J mostró algo de precipitación durante la etapa de concentración después de la cromatografía de afinidad. La molécula K tiene modificaciones de carga en CrossFab de unión a CD3 en lugar de en los Fab de unión a CD20. Esto tiene un impacto sobre la calidad final como se muestra por CE-SDS (tabla 3, figura 3O). La diferencia en la calidad es visible en su mayoría después de la primera etapa de purificación en SDS-Page (figura 3P, 3Q). La molécula K contiene más productos secundarios a 150 kDa y 70 kDa (semimoléculas y construcciones a las que probablemente les faltan cadenas ligeras) que la molécula J. Ambas moléculas tienen la misma estabilidad térmica que es similar a la molécula B (tabla 4).

Para el TCB anti-CD20/anti-CD3 la versión "invertida" con modificaciones de carga en el Fab anti-CD20 (molécula B) es el formato que se pudo producir con la mayor recuperación y calidad final.

TABLA 2. Sumario de producción y purificación de moléculas TCB anti-CD20/anti-CD3 con y sin modificaciones de carga.

Molécula	Valor (mg/l)	Recuperación [%]	Rendimiento (mg/l)	SEC analítica (APM/monómero /BPM) [%]	Pureza ap. determinada por CL-EM [%]
A	16,7	7,2	1,2	0/100/0 *	85-90 *
B	5,5	48,2	2,8	0/100/0	93
C	25	12,9	3,24	4/93/3	nd
D	55	9,8	5,42	2/98/0	nd
E	30,5	3,3	0,99	0/96,3/3,7	nd
F	57	11,8	6,43	3,4/96,6/0	nd
G	56	21	11,8	3,75/92,3/3,43	nd
H	29	9,2	2,66	2/98/0	nd
I	52,5	5,8	3,05	2,7/95,3/2	nd
J	77	18	17,4	0,7/99,3/0	nd
K	71,5	21,8	15,5	0/99,7/0,3	Nd
* producto final, después de dos etapas de SEC					

5 TABLA 3. Análisis por CE-SDS (sin reducción) de moléculas TCB anti-CD20/anti-CD3 con y sin modificaciones de carga.

Molécula	N.º pico	Tamaño [kDa]	Pureza [%]
A	1	34,13	0,49
	2	55,10	0,58
	3	58,89	0,97
	4	152,30	1,76
	5	165,95	2,25
	6	177,64	7,75
	7	186,15	14,06
	8	194,17	18,37
	9	201,68	53,77
B	1	160,09	0,57
	2	180,70	1,62
	3	194,42	97,81
C	1	131,12	0,82
	2	141,45	3,45
	3	182,86	2,39
	4	192,1	13,5
	5	198,13	79,84
D	1	207,04	100
E	1	176,36	0,67
	2	196,54	14,36
	3	209,22	84,97
F	1	30,41	0,55
	2	65,04	1,33
	3	198,80	2,05
	4	203,10	7,94
	5	213,93	88,12
G	1	96,50	1,67
	2	208,46	96,77
	3	216,11	1,55
H	1	131,98	1,13
	2	140,64	1,96
	3	153,02	92,24
	4	161,24	4,67
I	1	55,75	1,88
	2	158,62	50,78
	3	178,6	46,14
	4	218,64	1,2
J	1	186,5	1,4
	2	198,2	98,6

Molécula	N.º pico	Tamaño [kDa]	Pureza [%]
K	1	164,7	4
	2	182,4	6
	3	200,1	90

Confirmación de peso molecular por análisis por CL-EM

Desglucosilación

Para confirmar la preparación homogénea de las moléculas, se analizó la solución de proteína final por análisis por CL-EM. Para retirar la heterogeneidad introducida por carbohidratos, se trataron las construcciones con PNGaseF. Para este propósito, se ajustó el pH de la solución de proteína hasta pH 7,0 añadiendo 2 µl de Tris 2 M a 20 µg de proteína con una concentración de 0,5 mg/ml. Se añadieron 0,8 µg de PNGaseF y se incubó durante 12 h a 37 °C.

Análisis por CL-EM: detección directa

Se realizó el procedimiento de CL-EM en una Agilent HPLC 1200 acoplada a un espectrómetro de masas TOF 6441 (Agilent). Se realizó la separación cromatográfica en una columna de poliestireno Macherey Nagel; RP1000-8 (8 µm de tamaño de partícula, 4,6 × 250 mm; n.º cat. 719510). El eluyente A fue acetonitrilo al 5 % y ácido fórmico al 0,05 % (v/v) en agua, el eluyente B fue acetonitrilo al 95 %, agua al 5 % y ácido fórmico al 0,05 %. El caudal fue de 1 ml/min, se realizó la separación a 40 °C y con 6 µg (15 µl) de muestra de proteína obtenida con el tratamiento descrito anteriormente.

Tiempo (min)	% de B
0,5	15
10	60
12,5	100
14,5	100
14,6	15
16	15
16,1	100

Durante los primeros cuatro minutos, se dirigió el eluido al residuo para evitar la contaminación salina del espectrómetro de masas. Se preparó la fuente de ESI con un flujo de gas de secado de 12 l/min, una temperatura de 350 °C y una presión de nebulizador de 60 psi. Se adquirieron los espectros de EM usando un voltaje de fragmentador de 380 V y un intervalo de masas de 700 a 3200 m/z en modo de ion positivo. Se adquirieron los datos de EM por el programa informático del instrumento de 4 a 17 minutos.

La preparación de la molécula A tuvo aproximadamente un 10-15 % de moléculas con cadenas ligeras con emparejamiento incorrecto y pequeñas cantidades de cadenas ligeras libres o enlazadas. La preparación de la molécula B tuvo pequeñas cantidades de moléculas que comprendían dos cadenas ligeras de CD3. No se pudieron detectar impurezas tales como cadena ligera libre o cadena ligera enlazada (tabla 2).

Estabilidad térmica por dispersión de luz estática

Se supervisó la estabilidad térmica por dispersión de luz estática (SLS) y midiendo la fluorescencia de proteína intrínseca en respuesta a la agresión por temperatura aplicada.

Se aplicaron 30 µg de muestra de proteína filtrada con una concentración de proteína de 1 mg/ml por duplicado a Optim 2 (Avacta Analytical Ltd; GB). Se aumentó la temperatura de 25 a 85 °C a 0,1 °C/min, recogiendo el radio y la intensidad de dispersión total. Para la determinación de la fluorescencia de proteína intrínseca, se excitó la muestra a 295 nm y se recogió la emisión entre 266 y 473 nm.

Se determinó la estabilidad térmica para todas las moléculas, los resultados se muestran en la tabla 4. La temperatura de agregación (T_{Ag}) determinada por dispersión de luz dinámica y la temperatura de fusión (T_F) medida por fluorescencia de proteína después de aplicar un gradiente de temperatura fue comparable para todas las moléculas variando T_{Ag} de 54-58 °C y variando T_F de 56-60 °C (tabla 4).

TABLA 4. Estabilidad térmica de moléculas TCB anti-CD20/anti-CD3 con y sin modificaciones de carga.

Molécula	$T_{Agregación}$ [°C]	T_F [°C]
A	54,4	55,9
B	54,3	56,4
C	56	59

Molécula	T _{Agregación} [°C]	T _F [°C]
D	56	59
E	56	60
F	58	60
G	57	59
H	55	56
I	53	57
J	54	55
K	54	55

Unión a CD3 y CD20 de anticuerpos TCB anti-CD3/anti-CD20

Se midió la unión a CD3 de anticuerpos biespecíficos de linfocitos T (TCB) anti-CD3/anti-CD20 con o sin modificaciones de carga (moléculas "A" y "B" anteriores) usando células Jurkat que expresan CD3 humano. Se determinó la unión a CD20 usando células Z-138 que expresan CD20 humano. Se recogieron las células en suspensión, se lavaron una vez con PBS, y se determinó su viabilidad y densidad celular usando Vicell. Se resuspendieron las células en suspensión a 2×10^6 células/ml en tampón FACS. Se sembraron 100 μ l de la suspensión celular en una placa de fondo redondo de 96 pocillos. Se realizó cada etapa a 4 °C. Se centrifugaron las placas a 360 x g durante 5 min y se retiró el sobrenadante. Se prepararon diluciones de anticuerpo en PBS/BSA al 0,1 %. Se añadieron 30 μ l de los anticuerpos TCB anti-CD3/anti-CD20 diluidos o tampón FACS a los pocillos y se incubaron las células durante 30 min a 4 °C. Después de la incubación, se añadieron 120 μ l de tampón FACS por pocillo, se centrifugó la placa durante 5 min a 350 x g, y se retiró el sobrenadante. Se repitió una vez la etapa de lavado. Se añadieron 30 μ l de anticuerpo secundario prediluido por pocillo, como se indica en la disposición de la placa. Se incubaron las placas durante otros 30 min a 4 °C. Después de la incubación, se añadieron 120 μ l de tampón FACS por pocillo, se centrifugaron las placas durante 5 min a 350 x g, y se retiró el sobrenadante. Se repitió la etapa de lavado una vez para todas las placas salvo la placa con células Jurkat, que se fijó directamente después de esta única etapa de lavado. Se fijaron las células usando 100 μ l de tampón de fijación BD por pocillo (n.º BD Biosciences, 554655) a 4 °C durante 20-30 min. Se resuspendieron las células en 80 μ l/pocillo de tampón FACS para la medición de FACS usando un BD FACS Cantoll.

El resultado de este experimento se muestra en la figura 4.

Lisis de células tumorales y activación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ tras la destrucción mediada por linfocitos T de células diana tumorales que expresan CD20 inducida por anticuerpos TCB anti-CD3/anti-CD20

Se evaluó la destrucción mediada por linfocitos T de células diana y la activación de linfocitos T inducida por anticuerpos TCB anti-CD3/anti-CD20 con o sin modificaciones de carga (moléculas "A" y "B" anteriores) en células tumorales Z-138 y Nalm-6. Se usaron PBMC humanos como efectores y se detectaron la destrucción así como la activación de linfocitos T 22 h después de la incubación con el anticuerpo biespecífico. En resumen, se recogieron las células diana, se lavaron y se sembraron en placa a una densidad de 30.000 células/pocillo usando placas de 96 pocillos de fondo redondo. Se prepararon leucocitos mononucleares en la sangre periférica (PBMC) por centrifugación por densidad Histopaque de sangre recién obtenida de donantes humanos sanos. Se diluyó la sangre recién obtenida con PBS estéril y se colocó en capas sobre un gradiente de Histopaque (Sigma, n.º H8889). Después de la centrifugación (450 x g, 30 minutos, temperatura ambiente), se deseó el plasma por encima de la interfase que contenía PBMC y se transfirieron los PBMC en un nuevo tubo Falcon llenado posteriormente con 50 ml de PBS. Se centrifugó la mezcla (400 x g, 10 minutos, temperatura ambiente), se deseó el sobrenadante y se lavó el sedimento de PBMC dos veces con PBS estéril (etapas de centrifugación 350 x g, 10 minutos). Se contó automáticamente (ViCell) la población de PBMC resultante y se mantuvo en medio RPMI1640 que contenía FCS al 10 % y L-alanil-L-glutamina al 1 % (Biochrom, K0302) en una estufa de incubación celular (37 °C, CO₂ al 5 %) hasta su uso posterior (no más de 24 h). Para el ensayo de destrucción, se añadieron los anticuerpos a las concentraciones indicadas (intervalo de 1000 pM - 0,1 pM por triplicado). Se añadieron PBMC a células diana a la proporción E:T final de 6:1. Después de la incubación, se centrifugaron las placas a 420 x g durante 4 min y se transfirieron 50 μ l/pocillo a placas de fondo plano de 96 recién preparadas para la detección de LDH. Se realizó la detección de LDH usando un kit de detección de citotoxicidad (Roche n.º 11644793001) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se lavaron las células restantes con PBS que contenía BSA al 0,1 %. Se realizó la tinción de superficie para CD8 (anti-CD8 humano APCy7, Biolegend n.º 301016), CD4 (anti-CD4 humano FITC, Biolegend n.º 300506), CD69 (anti-CD69 humano BV421 Biolegend n.º 310930) y CD25 (anti-CD25 humano PECy7 Biolegend n.º 302612) de acuerdo con las indicaciones de los proveedores. Después de 30 min a 4 °C, se lavaron las células dos veces con 150 μ l/pocillo de PBS que contenía BSA al 0,1 % y se fijaron usando 100 μ l/pocillo de PFA al 2 %. Se realizó la medición usando un BD FACS Cantoll. El resultado de este experimento se muestra en la figura 5, 6 y 7. Ambas moléculas presentan actividad comparable en términos de lisis de células tumorales y activación de linfocitos T.

Disminución de linfocitos B y activación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ tras la destrucción mediada por

linfocitos T de linfocitos B humanos sanos inducida por anticuerpos TCB anti-CD3/anti-CD20 en sangre completa humana

Se incubó sangre completa humana de un donante sano con anticuerpos TCB anti-CD3/anti-CD20 con o sin modificaciones de carga (moléculas "A" y "B" anteriores) a las concentraciones indicadas (intervalo de 50000 pM - 1 pM por triplicado). Después de 22 h, se mezcló la sangre y se recogieron 35 µl para tinción con 20 µl de mezcla de anticuerpo FACS que contenía CD8 (anti-CD8 humano APCCy7, Biolegend n.º 301016), CD4 (anti-CD4 humano FITC, Biolegend n.º 300506), CD69 (anti-CD69 humano BV421 Biolegend n.º 310930) y CD25 (anti-CD25 humano PECy7, Biolegend n.º 302612), CD22 (anti-CD22 humano APC, Biolegend n.º 302510) y CD45 (anti-CD45 humano PerCPCy5.5, Biolegend n.º 304028). Después de 15 minutos de incubación a temperatura ambiente, se fijó la sangre con solución de lisado de FACS (BD, n.º 349202) y se analizó por citometría de flujo. Se calculó la disminución de linfocitos B en base a la proporción de números de linfocitos B y números de linfocitos T CD4⁺ estableciendo las muestras no tratadas hasta una disminución de linfocitos B de un 0 %.

El resultado de este experimento se muestra en la figura 8 y 9. Ambas moléculas presentan actividad comparable en términos de disminución de linfocitos B en la sangre completa y activación de linfocitos T.

Unión de anticuerpo TCB anti-CD3/anti-CD20 a células diana que expresan CD20 y CD3 humanos

Se sometió a prueba la unión del anticuerpo TCB anti-CD3/anti-CD20 mostrado como la molécula "B" anterior en la línea celular de linfoma difuso de linfocitos B grandes (DLBCL) que expresan CD20 humano (WSU DLCL2, 0,5-1 x 10⁶ sitios de unión a CD20) y línea de linfocitos T inmortalizada que expresan CD3 (Jurkat). En resumen, se recogieron las células, se contaron, se comprobó su viabilidad y se resuspendieron a 1,5 x 10⁶ células/ml en tampón FACS (PBS-BSA al 0,1 %). Se incubaron 100 µl de suspensión celular (que contenía 0,15 x 10⁶ células) en una placa de 96 pocillos de fondo redondo durante 30 min a 4 °C con concentraciones crecientes del TCB-CD20 (50 pM - 200 nM), se lavó dos veces con PBS-BSA al 0,1 % frío, se reincubó durante otros 30 min a 4 °C con anticuerpo secundario fragmento F(ab')₂ AffiniPure conjugado con PE, anti-IgG humana caprina, fragmento Fcg específico diluido (Jackson Immuno Research Lab PE n.º 109-116-170), se lavó dos veces con PBS-BSA al 0,1 % frío, se fijó por adición de PFA al 2 % y se analizó por FACS usando un FACS Cantoll (programa informático FACS Diva) excluyendo las células muertas del análisis por sincronización FSC/SSC.

Los resultados se muestran en la figura 10A (unión a células WSU DLCL2) y figura 10B (unión a células Jurkat). Se calcularon las curvas de unión y los valores de CE50 relacionados con la unión usando GraphPadPrism5. Los valores de CE50 fueron 0,98 nM (unión bivalente a células WSU DLCL2 que expresan CD20) y aproximadamente 12,5 nM (unión monovalente a células Jurkat que expresan CD3).

Unión del anticuerpo TCB anti-CD3/anti-CD20 a células diana que expresan CD20 y CD3 humanos y de macaco cangrejero

Se evaluó la reactividad cruzada del anticuerpo TCB anti-CD3/anti-CD20 mostrado como la molécula "B" anterior evaluando la unión a linfocitos B que expresan CD20 y linfocitos T CD4 y CD8 que expresan CD3 humanos y de macaco cangrejero. En resumen, se usó sangre humana y de macaco cangrejero heparinizada de donantes sanos para aislar PBMC por centrifugación por densidad. Se contaron los PBMC aislados, se comprobó su viabilidad y se resuspendieron a 4 x 10⁶ células/ml en tampón FACS (100 µl de PBS-BSA al 0,1 %). Se sembraron en placa 100 µl de suspensión celular (que contenía 0,4 x 10⁶ células) en una placa de fondo en U de 96 pocillos y se centrifugó (420 x g, 4 min). Después de la retirada de los sobrenadantes, se incubaron los PBMC durante 30 min a 4 °C con concentraciones crecientes de TCB-CD20-AlexaFluor488 (200 pM - 200 nM), se lavaron dos veces con PBS-BSA al 0,1 % frío, se reincubaron durante otros 30 min a 4 °C con anticuerpos de reacción cruzada humanos/de macaco cangrejero: anti-CD19 (interno, clon 8B8)-AlexaFluor647, anti-CD4 (BD, n.º 552838, clon L200)-PerCPCy5.5 y anti-CD8 (BD, n.º 555367, clon RPA-T8)-PE. Después de 30 min, se lavaron los PBMC dos veces con PBS-BSA al 0,1 % frío y se trataron con solución de lisado FACS (BD, n.º 349202) seguido de análisis FACS usando FACS Cantoll (programa informático FACS Diva). Se obtuvieron curvas de unión usando GraphPadPrism5.

Los resultados se muestran en la figura 11A (unión a linfocitos B humanos y de macaco cangrejero), figura 11B (unión a linfocitos T CD4 humanos y de macaco cangrejero) y figura 11C (unión a linfocitos T CD8 humanos y de macaco cangrejero). Los valores de CE50 relacionados con la unión a linfocitos B que expresan CD20, calculados usando GraphPadPrism5, fueron 4,8 nM (linfocitos B humanos) y 3,3 nM (linfocitos B de macaco cangrejero).

Lisis de células tumorales mediada por diferentes formatos de anticuerpos TCB anti-CD20/anti-CD3

Se evaluó la lisis de células tumorales mediada por diferentes formatos de anticuerpos TCB anti-CD20/anti-CD3 (moléculas "B", "A", "C" y "H" mostradas anteriormente) en células Z138 (linfoma de células del manto, 0,06-0,23 x 10⁶ sitios de unión a CD20). Se usaron PBMC humanos como efectores y se detectó la lisis tumoral a las 21-24 h de incubación con los diferentes formatos de anticuerpos bispecíficos. En resumen, se recogieron las células diana, se lavaron y se sembraron en placa a una densidad de 50.000 células/pocillo usando placas de 96 pocillos

de fondo en U. Se prepararon leucocitos monomorfonucleares en la sangre periférica (PBMC) por centrifugación por densidad Histopaque de sangre humana sana. Se diluyó la sangre recién obtenida con PBS estéril y se colocó en capas sobre un gradiente de Histopaque (Sigma, n.º H8889). Después de la centrifugación (450 x g, 30 minutos, temperatura ambiente, sin freno), se desechó el plasma por encima de la interfase que contenía PBMC y se transfirieron los PBMC a un nuevo tubo Falcon llenado posteriormente con 50 ml de PBS. Se centrifugó la mezcla (350 x g, 10 minutos, temperatura ambiente), se desechó el sobrenadante y se lavó el sedimento de PBMC con PBS estéril (300 x g, 10 minutos). Se contó automáticamente (ViCell) la población de PBMC resultante y se almacenó en medio RPMI1640 que contenía FCS al 10 % y L-alanil-L-glutamina al 1 % (Biochrom, K0302) a 37 °C, CO₂ al 5 % en una estufa de incubación celular hasta su uso posterior (no más de 24 h). Para el ensayo de lisis tumoral, se añadieron los anticuerpos a las concentraciones indicadas (intervalo de 0,1 pM - 1 nM por triplicado). Se añadieron PBMC a células diana a una proporción E:T final de 6:1. Se evaluó la lisis de células tumorales después de 21-24 h de incubación a 37 °C, CO₂ al 5 % por cuantificación de LDH liberada en sobrenadantes celulares por células apoptóticas/necróticas (kit de detección de LDH, Roche Applied Science, n.º 11 644 793 001). Se logró la lisis máxima de las células diana (= 100 %) por incubación de células diana con Triton X-100 al 1 %. Lisis mínima (= 0 %) se refiere a células diana coincubadas con células efectoras sin construcción biespecífica.

La figura 12 muestra que los diferentes formatos de anticuerpos TCB-CD20 indujeron una lisis específica de diana y fuerte de células diana CD20⁺. El panel A muestra que "TCB-CD20_2+1_con cargas, invertida" (molécula "B" mostrada anteriormente) presenta actividad comparable a "TCB-CD20_2+1_sin cargas, invertida" (molécula "A" mostrada anteriormente) y que ambas son más potentes que el formato "TCB-CD20_1+1_con cargas" (molécula "H" mostrada anteriormente). El panel B muestra que "TCB-CD20_2+1_con cargas, invertida" (molécula "B" mostrada anteriormente) es más potente que el formato "TCB-CD20_2+1_con cargas, clásica" (molécula "C" mostrada anteriormente). Los valores de CE50 relacionados con los ensayos de destrucción, calculados usando GraphPadPrism5 se dan en la tabla 5.

TABLA 5. Valores de CE50 (pM) de lisis de células tumorales mediada por diferentes formatos de anticuerpos TCB anti-CD20/anti-CD3 evaluados usando células diana tumorales Z138 que expresan CD20.

Panel	Formato de anticuerpo frente a CD20	CE50 [pM]
A	TCB-CD20_2+1_con cargas, invertida (molécula B)	2,18
A	TCB-CD20_2+1_sin cargas, invertida (molécula A)	0,76
A	TCB-CD20_1+1_con cargas (molécula H)	17,54
B	TCB-CD20_2+1_con cargas, invertida (molécula B)	0,96
B	TCB-CD20_2+1_con cargas, clásica (molécula C)	43,34

Lisis de células tumorales y posterior activación de linfocitos T mediada por diferentes formatos de anticuerpos TCB anti-CD20/anti-CD3

Se evaluó además la lisis de células tumorales mediada por diferentes formatos de anticuerpos TCB anti-CD20/anti-CD3 (moléculas "B" y "H" mostradas anteriormente) en células Z138 (linfoma de células del manto) usando PBMC humanos derivados de tres donantes sanos diferentes así como en un panel más amplio de líneas de DLBCL que incluyen las líneas celulares OCI Ly-18 (0,06-0,2 x 10⁶ sitios de unión a CD20), Ramos (0,1-0,4 x 10⁶ sitios de unión a CD20), SU-DHL-5 (0,13-0,21 x 10⁶ sitios de unión a CD20), SU-DHL-8 (sitios de unión a CD20 por debajo del límite de detección del ensayo), Toledo (0,02 x 10⁶ sitios de unión a CD20) y U2932 (0,09-0,4 x 10⁶ sitios de unión a CD20). La recogida de células tumorales, aislamiento de PBMC y condiciones de ensayo fueron idénticos a los descritos en el ejemplo previo. La proporción E:T para los ensayos mostrados en las figuras 13 A-C fue de 6:1, para el ensayo mostrado en la figura 13D fue de 3:1. Se evaluó la lisis de células tumorales después de 21 h de incubación a 37 °C, CO₂ al 5 % por cuantificación de LDH liberada en sobrenadantes celulares por células apoptóticas/necróticas (kit de detección de LDH, Roche Applied Science, n.º 11 644 793 001). Para la evaluación de la activación de linfocitos T que se produce tras la lisis de células tumorales, se transfirieron PBMC a una placa de 96 pocillos de fondo redondo, se centrifugaron a 400 x g durante 5 min y se lavaron dos veces con PBS que contenía BSA al 0,1 %. Se realizó la tinción de superficie para CD8 (anti-CD8 humano APCCy7 Biolegend, n.º 301016), CD4 (anti-CD4 humano FITC, Biolegend n.º 300506) y CD25 (anti-CD25 humano PECy7 Biolegend n.º 302612) de acuerdo con las indicaciones de los proveedores. Se lavaron las células dos veces con 150 µl/pocillo de PBS que contenía BSA al 0,1 % y se fijaron usando PFA al 2 % o solución de lisado FACS (BD, n.º 349202). Se analizaron las muestras en BD FACS Cantoll.

La figura 13 muestra que el formato de anticuerpo "TCB-CD20_2+1_con cargas, invertida" (molécula "B" mostrada anteriormente) es más potente que el formato de anticuerpo "TCB-CD20_1+1" (molécula "H" mostrada anteriormente) como se evalúa por detección tanto de lisis de células tumorales (paneles A, D) como de activación de linfocitos T (panel B, C) usando PBMC de diferentes donantes. Los valores de CE50 relacionados con la lisis tumoral y la activación de linfocitos T de células Z138 se dan en la tabla 6a. Los valores de CE50 relacionados con los ensayos de lisis tumoral de un panel de líneas celulares de DLBCL se dan en la tabla 6b. Se calcularon los valores de CE50 usando GraphPadPrism5.

TABLA 6a. Valores de CE50 (pM) de lisis de células tumorales y activación de linfocitos T mediada por anticuerpos TCB anti-CD20/anti-CD3 usando células tumorales Z138 que expresan CD20.

Formato de anticuerpo frente a CD20	CE50 [pM] 24 h (promedio de 3 donantes)
TCB-CD20_2+1_con cargas, invertida (lisis tumoral) (molécula B)	1,6
TCB-CD20_1+1 (lisis tumoral) (molécula H)	751
TCB-CD20_2+1_con cargas, invertida (activación de linfocitos T CD8) (molécula B)	2,2
TCB-CD20_1+1 (activación de linfocitos T CD8) (molécula H)	174,8
TCB-CD20_2+1_con cargas, invertida (activación de linfocitos T CD4) (molécula B)	1,2
TCB-CD20_1+1 (activación de linfocitos T CD4) (molécula H)	122

5 TABLA 6b. Valores de CE50 (pM) de lisis tumoral de un panel de líneas celulares tumorales de DLBCL mediada por anticuerpos TCB anti-CD20/anti-CD3.

CE50 [pM] 24 h de lisis tumoral	TCB-CD20_2+1_con cargas, invertida (molécula B)	TCB-CD20_1+1 (molécula H)
Ocl-18	0,3	250,4
Ramos	n.d.	n.d.
SU-DHL-5	1,2	69,7
SU-DHL-8	0,5	218,9
Toledo	n.d.	120,2
U2932	0,9	72,7

10 Disminución de linfocitos B en sangre completa humana mediada por diferentes formatos de anticuerpos TCB anti-CD20/anti-CD3

Se evaluó además la disminución de linfocitos B normales por diferentes formatos de anticuerpos TCB anti-CD20/anti-CD3 (moléculas "B" y "H" mostradas anteriormente) y por obinutuzumab usando sangre humana recién obtenida de voluntarios sanos. En resumen, se extrajo sangre recién obtenida en jeringuillas que contenían heparina. Se dispusieron alícuotas de sangre (180 µl/pocillo) en placas de 96 pocillos hondos, complementados con diluciones de TCB o anticuerpo (10 µl/pocillo + 10 µl/pocillo de PBS) y se incubó durante 24 h a 37 °C en CO₂ al 5 % en una estufa de incubación celular humidificada. Después de la incubación, se mezcló la sangre por pipeteo arriba y abajo antes de que se transfirieran 35 µl de alícuotas de sangre a placas de fondo en U de 96 pocillos y se incubó con anti-CD45 (APC, Biolegend, n.º 304037), anti-CD4 (PerCPCy5.5, BD, n.º 552838), anti-CD8 (APCCy7, Biolegend, n.º 301016), anti-CD19 (PE, Biolegend, n.º 302208), anti-CD25 (PECy7, Biolegend, n.º 302612) y anti-CD69 (BV421, Biolegend, n.º 310930) fluorescente en un volumen total de 55 µl para citometría de flujo. Después de 15 min de incubación a temperatura ambiente (en la oscuridad) se añadieron 180 µl/pocillo de solución de lisis FACS (BD Biosciences) para disminuir los eritrocitos y para fijar las células antes de la citometría de flujo.

25 La figura 14 muestra que "TCB-CD20_2+1_con cargas, invertida" (molécula "B" anterior) es más potente en la disminución de los linfocitos B normales que tanto obinutuzumab (Gazyva) como "TCB-CD20_1+1" con cargas (molécula "H" anterior).

30 TABLA 7. Valores de CE50 (pM) de disminución de linfocitos B en sangre completa humana normal mediada por diferentes anticuerpos selectivos hacia CD20.

Anticuerpos selectivos hacia CD20	CE50 [pM] 24 h
TCB-CD20_2+1_con cargas, invertida (molécula B)	13,2
Obinutuzumab (Gazyva®)	79,2
TCB-CD20_1+1 (molécula H)	3753

35 Activación de linfocitos T evaluada por cuantificación de la intensidad de la señalización hacia 3' de CD3 usando el ensayo de indicadores Jurkat-NFAT

Se evaluó la capacidad de diferentes formatos de anticuerpos TCB anti-CD20/anti-CD3 para inducir la reticulación de linfocitos T y posteriormente la activación de linfocitos T usando cocultivos de células diana tumorales que expresan CD20 y células indicadoras Jurkat-NFAT (una línea celular indicadora de leucemia linfocítica aguda humana que expresa CD3 con un promotor NFAT, GloResponse Jurkat NFAT-RE-luc2P, Promega n.º CS176501). Tras la unión simultánea de TCB anti-CD20/anti-CD3 al antígeno CD20 (expresado en células tumorales) y al antígeno CD3 (expresado en células indicadoras Jurkat-NFAT), se activa el promotor NFAT y da lugar a la

expresión de la luciferasa de luciérnaga activa. La intensidad de la señal de luminiscencia (obtenida tras la adición del sustrato de luciferasa) es proporcional a la intensidad de la activación y señalización de CD3. Las células indicadoras Jurkat-NFAT crecen en suspensión y se cultivaron en RPMI1640, 2 g/l de glucosa, 2 g/l de NaHCO₃, FCS al 10 %, HEPES 25 mM, L-glutamina 2 mM, 1 x NEAA, 1 x piruvato de sodio a 0,1 - 0,5 células MiO por ml, 200 µg por ml de higromicina. Para el ensayo, se recogieron células diana tumorales (Z138) y se determinó su viabilidad usando ViCell. Se añadieron 50 µl/pocillo de anticuerpos diluidos o de medio (para los controles) a las células diana. Se sembraron en placa 20.000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos de paredes blancas y fondo plano (n.º 655098, Greiner bio-one). Posteriormente, se recogieron células indicadoras Jurkat-NFAT y se evaluó su viabilidad usando ViCell. Se resuspendieron las células a 2 células MiO/ml en medio de cultivo celular sin higromicina B y se añadieron a células tumorales a 0,1 x 10⁶ células/pocillo (50 µl/pocillo) para obtener una E:T final de 5:1 y un volumen final de 100 µl por pocillo. Se incubaron las células durante 6 h a 37 °C en una estufa de incubación humidificada. Al final del tiempo de incubación, se añadieron 100 µl/pocillo de solución ONE-Glo (volumen 1:1 de ONE-Glo y medio de ensayo por pocillo) a los pocillos y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente en la oscuridad. Se detectó la luminiscencia usando el lector de ELISA WALLAC Victor3 (PerkinElmer2030), 5 s/pocillo como tiempo de detección. La figura 15 muestra que "TCB-CD20_2+1_con cargas, invertida" (molécula "B" anterior) da lugar a una activación de linfocitos T y señalización hacia 3' de CD3 más fuertes que "TCB-CD20_1+1" (molécula "H" anterior).

TABLA 8. Valores de CE50 (pM) de la activación de CD3 detectada usando células indicadoras Jurkat-NFAT.

Formato de anticuerpo frente a CD20	CE50 [pM]
TCB-CD20_2+1_con cargas, invertida (molécula B)	28,98
TCB-CD20_1+1 (molécula H)	1001

FC de dosis única de TCB anti-CD20/anti-CD3 en ratones NOG sanos

Se realizó un estudio farmacocinético de dosis única (SDPK) para evaluar la exposición de la molécula "B" TCB anti-CD20/anti-CD3 (a continuación en el presente documento llamada "TCB-CD20") durante los estudios de eficacia (figura 16). Se administró una administración por inyección intravenosa rápida i.v. de 0,5 mg/kg a ratones NOG y se obtuvieron muestras de sangre en los puntos temporales seleccionados para la evaluación farmacocinética. Se usó un inmunoanálisis genérico para medir las concentraciones totales de TCB-CD20. El intervalo de calibración de la curva estándar para TCB-CD20 fue de 0,78 a 50 ng/ml, donde 15 ng/ml es el límite inferior de cuantificación (LLOQ).

Se observó un descenso bifásico con una semivida beta de 10 días (análisis no compartimental) y aclaramiento de 8 ml/d/kg (modelo bicompartimental). La semivida y el aclaramiento fueron como se esperaba en comparación con una IgG no selectiva normal (tabla 9).

Se usó Phoenix v6.2 de Pharsight Ltd para el análisis FC, modelado y simulación.

TABLA 9. Parámetros farmacocinéticos de una administración por inyección intravenosa rápida i.v. de 0,5 mg/kg de TCB-CD20 en ratones NOG.

Semivida	10 días
Aclaramiento	7,9 ml/d/kg
C _{máx}	9,4 µg/ml
ABC	1554 h*ug/ml

Actividad de disminución de linfocitos B *in vivo* de TCB anti-CD20/anti-CD3

Se sometió a prueba la actividad de disminución de linfocitos B periféricos de TCB-CD20 en ratones NOD/Shi-scid/IL-2Rγ^{null} (NOG) totalmente humanizados.

Se trataron los ratones NOG totalmente humanizados de 14 semanas de edad, que portaban niveles fisiológicos de linfocitos B y T humanos circulantes (Hayakawa J. *et al.* (2009), Stem Cells 27(1), 175-182), con vehículo (n = 7) o bien con TCB-CD20 (n = 6) a la dosis de 0,5 mg/kg administrada por vía intravenosa (i.v.) una vez por semana. Como se muestra en el diseño de estudio en la figura 17, se extrajo sangre a los ratones para el análisis de linfocitos B y linfocitos T uno y tres días después de la primera inyección terapéutica (D1, D3), y tres días después de la segunda (D10), punto temporal en el que finalizó el estudio. En el último punto temporal, también se recogieron los bazoos para el análisis de linfocitos B y linfocitos T. Se cribaron los ratones 4 días antes de la inyección terapéutica (D-4) como referencia inicial para recuentos de linfocitos B y T circulantes. La figura 18 muestra los recuentos de linfocitos B y T analizados por citometría de flujo *ex vivo* en sangre de ratones tratados con vehículo (panel izquierdo) y con TCB-CD20 (panel derecho) a los diferentes puntos temporales. Los resultados demuestran que los linfocitos B circulantes se disminuyeron muy eficazmente ya un día después de la inyección de TCB-CD20, y su número permaneció indetectable para toda la duración del estudio. Por el contrario, el recuento de linfocitos T

circulantes solo descendió de forma transitoria el D1 después de la inyección terapéutica, volvió a los niveles de referencia el D3, y permaneció estable para toda la duración del estudio. También se analizó el estado de activación de linfocitos T en sangre de ratones tratados el D3 y D10 después de la primera inyección terapéutica, por medio de citometría de flujo *ex vivo* usando diferentes marcadores de superficie de linfocitos T y el marcador de proliferación Ki67 (figura 19). Los linfocitos T de ratones tratados con TCB-CD20 mostraron un fenotipo activado el D3 después de la inyección terapéutica (panel superior), con regulación por incremento de los marcadores de activación CD25, 4-1BB, PD-1 y granzima B (GZB) en ambos compartimentos de linfocitos T CD4 y CD8, en comparación con linfocitos T del control de vehículo. Los linfocitos T de ratones tratados también expresaron mayores niveles del marcador de proliferación Ki67. El D10 después de la primera inyección terapéutica, la mayoría de los marcadores de activación de linfocitos T había vuelto a los niveles de referencia con la excepción de GZB y PD-1, que todavía se expresaron a mayores niveles en comparación con el control de vehículo.

La figura 20 muestra los resultados de los análisis de linfocitos B y linfocitos T realizados en bazo de ratones tratados con vehículo y TCB-CD20 en la finalización del estudio (D10). El tratamiento con TCB-CD20 medió en una disminución de linfocitos B muy eficaz también en este órgano linfático secundario (figura 20A), mientras que los recuentos de linfocitos T mostraron niveles comparables al control de vehículo (figura 20B). El estado de activación de linfocitos T (figura 20C) fue similar al observado en sangre, con mayor expresión de GZB y PD-1 en linfocitos T esplénicos de ratones tratados en comparación con el control de vehículo.

En conjunto, estos resultados demuestran que el tratamiento con TCB-CD20 puede mediar en una disminución muy eficaz de linfocitos B periféricos ya un día después de la inyección de tratamiento, permaneciendo los linfocitos B indetectables hasta la finalización del estudio (tres días después de la segunda inyección terapéutica). Los linfocitos B también disminuyen eficazmente en el bazo de ratones tratados. La actividad de disminución de linfocitos B es paralela a la activación de linfocitos T transitoria en sangre de los animales tratados, que vuelve a niveles de referencia tres días después de la inyección terapéutica, con la excepción de los marcadores de activación GZB y PD-1, que permanecen expresados a un mayor nivel en comparación con los controles no tratados.

Actividad antitumoral de TCB anti-CD20/anti-CD3 en el modelo WSU-DLCL2

Se sometió a prueba la actividad antitumoral de TCB-CD20 en ratones NOG que portan la línea celular de linfoma difuso de linfocitos B grandes humana WSU-DLCL2 y se transfirió con leucocitos mononucleares periféricos humanos (PBMC). En resumen, a ratones NOG hembra se les inyectó por vía subcutánea (s.c.) $1,5 \times 10^6$ células WSU-DLCL2 (obtenidas originalmente de la European Collection of Cell Culture). Cuando el volumen tumoral promedio alcanzó 200 mm^3 , los ratones recibieron una inyección intraperitoneal de PBMC humanos (10×10^6 células por ratón) como fuente de linfocitos T humanos. Dos días después, los ratones recibieron tratamiento con TCB-CD20 i.v. a una dosis de 0,5 mg/kg administrada una vez por semana. Como se representa en la figura 21, TCB-CD20 muestra una actividad antitumoral potente, con regresión tumoral casi completa observada en la finalización del estudio (día 34).

Ejemplo 2

El ejemplo 2 no está de acuerdo con la invención y está presente solo para propósitos de ilustración.

Preparación del anticuerpo biespecífico de linfocitos T "2+1 IgG CrossFab, invertida" con y sin modificaciones de carga (anti-BCMA/anti-CD3)

Las ilustraciones esquemáticas de las moléculas preparadas en este ejemplo se muestran en la figura 22. La molécula anti-BCMA/anti-CD3 "2+1 IgG CrossFab, invertida" sin modificaciones de carga (denominada en este ejemplo "83A10-TCB") comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO 22-25, la molécula anti-BCMA/anti-CD3 "2+1 IgG CrossFab, invertida" con modificaciones de carga (denominada en este ejemplo "83A10-TCBcv") comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO 26-29.

Para la generación de vectores de anticuerpo biespecífico BCMAxCD3, las moléculas biespecíficas derivadas de IgG1 consisten al menos en dos restos de unión a antígeno que se pueden unir específicamente a dos determinantes antigénicos distintos CD3 y BCMA. Los restos de unión a antígeno son fragmentos Fab compuestos por una cadena pesada y una ligera, comprendiendo cada una una región variable y una constante. Al menos uno de los fragmentos Fab fue un fragmento "Crossfab", en el que se intercambiaron VH y VL. El intercambio de VH y VL dentro del fragmento Fab garantiza que los fragmentos Fab de diferente especificidad no tienen disposiciones de dominios idénticas. El diseño de molécula biespecífica fue monovalente para CD3 y bivalente para BCMA donde un fragmento Fab se fusionó al extremo N del CrossFab interno (2+1). La molécula biespecífica contenía una parte Fc para que la molécula tuviera una semivida mayor. Se produjeron las moléculas cotransfectando células HEK293 EBNA que crecen en suspensión con los vectores de expresión de mamífero usando polietilenimina (PEI). Para la preparación de las construcciones 2+1 CrossFab-IgG, se transfectaron las células con los correspondientes vectores de expresión en una proporción 1:2:1:1 ("vector Fc(botón)": "vector cadena ligera": "vector cadena ligera CrossFab": "vector cadena pesada-CrossFab").

Para anticuerpos biespecíficos, la introducción de un reemplazo/intercambio en un brazo de unión de "Crossfab" reduce claramente los productos secundarios pero la preparación no está completamente libre de productos secundarios (descrito en detalle en el documento WO2009/080252 y Schaefer, W. *et al*, PNAS, 108 (2011) 11187-1191). Por tanto, para reducir además los productos secundarios provocados por el emparejamiento erróneo de una cadena ligera frente a un primer antígeno con la cadena pesada equivocada frente al segundo antígeno y para mejorar el rendimiento del anticuerpo biespecífico, se aplica un enfoque adicional a la molécula introduciendo sustituciones de aminoácidos cargados con la carga opuesta en posiciones de aminoácidos específicas en los dominios CH1 y CL en el dominio constante CL de la primera cadena ligera en a) el aminoácido en la posición 124 se sustituye independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración de acuerdo con Kabat) (en un modo de realización preferente independientemente por lisina (K), arginina (R)), y en la que en el dominio constante CH1 de la primera cadena pesada en a) el aminoácido en la posición 147 o el aminoácido en la posición 213 se sustituye independientemente por ácido glutámico (E), o ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con Kabat); o ii) en el dominio constante CL de la segunda cadena ligera en b) el aminoácido en la posición 124 se sustituye independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración de acuerdo con Kabat) (en un modo de realización preferente independientemente por lisina (K), arginina (R)), y en la que en el dominio constante CH1 de la segunda cadena pesada en b) el aminoácido en la posición 147 o el aminoácido en la posición 213 se sustituye independientemente por ácido glutámico (E), o ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con Kabat).

Para la producción de los anticuerpos biespecíficos, se expresaron anticuerpos biespecíficos por cotransfección transitoria de los respectivos vectores de expresión de mamífero en células HEK293-EBNA, que se cultivaron en suspensión, usando polietilenimina (PEI). Un día antes de la transfección, se sembraron las células HEK293-EBNA a 1,5 células MiO viables/ml en medio Ex-Cell complementado con 6 mM de L-glutamina. Por cada ml de volumen de producción final, se centrifugaron 2,0 células MiO viables (5 minutos a 210 x g). Se aspiró el sobrenadante y se resuspendieron las células en 100 µl de medio CD CHO. Se preparó el ADN por cada ml de volumen de producción final mezclando 1 µg de ADN (proporción cadena pesada:cadena pesada modificada:cadena ligera:cadena ligera modificada = 1:1:2:1) en 100 µl de medio CD CHO. Después de la adición de 0,27 µl de solución de PEI (1 mg/ml) se agitó en vórtex la mezcla durante 15 segundos y se dejó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Después de 10 minutos, se pusieron juntas las células resuspendidas y la mezcla de ADN/PEI y a continuación se transfirieron a un recipiente apropiado que se dispuso en un dispositivo de agitación (37 °C, CO₂ al 5 %). Después de un tiempo de incubación de 3 horas, se añadieron 800 µl de medio Ex-Cell, complementado con L-glutamina 6 mM, ácido valproico 1,25 mM y Pepsoy al 12,5 % (50 g/l), por cada ml de volumen de producción final. Después de 24 horas, se añadieron 70 µl de Feed (SF40, Lonza) por cada ml de volumen de producción final. Después de 7 días o cuando la viabilidad celular fue igual o menor que un 70 %, se separaron las células del sobrenadante por centrifugación y filtración estéril. Se purificaron los anticuerpos por una etapa de afinidad y una o dos etapas de pulido, que fueron cromatografía de intercambio catiónico y cromatografía de exclusión por tamaño. Cuando se requirió, se usó una etapa de pulido adicional.

Para la etapa de afinidad, se cargó el sobrenadante en una columna con proteína A (HiTrap Protein A FF, 5 ml, GE Healthcare) equilibrada con 6 VC de fosfato de sodio 20 mM, citrato de sodio 20 mM, pH 7,5. Después de una etapa de lavado con el mismo tampón, se eluyó el anticuerpo de la columna por una etapa de elución con fosfato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 100 mM, glicina 100 mM, pH 3,0. Se neutralizaron de inmediato las fracciones con el anticuerpo deseado por fosfato de sodio 0,5 M, pH 8,0 (1:10), se agruparon y se concentró por centrifugación. Se filtró de forma estéril el concentrado y se procesó además por cromatografía de intercambio catiónico y/o cromatografía de exclusión por tamaño.

Para la etapa de cromatografía de intercambio catiónico, se diluyó 1:10 la proteína concentrada con el tampón de elución usado para la etapa de afinidad y se cargó en una columna de intercambio catiónico (Poros 50 HS, Applied Biosystems). Después de dos etapas de lavado con el tampón de equilibrio y un tampón de lavado resp. fosfato de sodio 20 mM, citrato de sodio 20 mM, TRIS 20 mM, pH 5,0 y fosfato de sodio 20 mM, citrato de sodio 20 mM, TRIS 20 mM, cloruro de sodio 100 mM, pH 5,0 se eluyó la proteína con un gradiente usando fosfato de sodio 20 mM, citrato de sodio 20 mM, TRIS 20 mM, cloruro de sodio 100 mM, pH 8,5. Se agruparon las fracciones que contenían el anticuerpo deseado, se concentró por centrifugación, se filtró de forma estéril y se procesó además con una etapa de exclusión por tamaño.

Para la etapa de exclusión por tamaño, se inyectó la proteína concentrada en una columna XK16/60 HiLoad Superdex 200 (GE Healthcare), e histidina 20 mM, cloruro de sodio 140 mM, pH 6,0 con o sin Tween20 como tampón de formulación. Se agruparon las fracciones que contenían los monómeros, se concentró por centrifugación y se filtró de forma estéril en un vial estéril.

Se realizó la determinación de la concentración de anticuerpo por medición de la absorbancia a 280 nm, usando el valor teórico de la absorbancia de una solución al 0,1 % del anticuerpo. Este valor se basó en la secuencia de aminoácidos y se calculó por el programa informático GPMW (Lighthouse data).

Se determinó la pureza y el contenido en monómero de la preparación de proteína final por CE-SDS (sistema Caliper LabChip GXII (Caliper Life Sciences)) resp. HPLC (columna de exclusión por tamaño analítica TSKgel

G3000 SW XL (Tosoh)) en un tampón de fosfato de potasio 25 mM, cloruro de sodio 125 mM, monoclóhidrato de L-arginina 200 mM, acida de sodio al 0,02 % (p/v), pH 6,7.

Para verificar el peso molecular de las preparaciones de proteínas finales y confirmar la preparación homogénea de la solución de proteína final de las moléculas, se usó cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (CL-EM). En primer lugar se realizó una etapa de desglucosilación. Para retirar la heterogeneidad introducida por los carbohidratos, se trataron las construcciones con PNGaseF (ProZyme). Por lo tanto, se ajustó el pH de la solución de proteína hasta pH 7,0 añadiendo 2 µl de Tris 2 M a 20 µg de proteína con una concentración de 0,5 mg/ml. Se añadieron 0,8 µg de PNGaseF y se incubó durante 12 h a 37 °C. A continuación se realizó la detección directa por CL-EM. Se realizó el procedimiento de CL-EM en una Agilent HPLC 1200 acoplada a un espectrómetro de masas TOF 6441 (Agilent). Se realizó la separación cromatográfica en una columna de poliestireno Macherey Nagel; RP1000-8 (8 µm de tamaño de partícula, 4,6 x 250 mm; n.º cat. 719510). El eluyente A fue acetonitrilo al 5 % y ácido fórmico al 0,05 % (v/v) en agua, el eluyente B fue acetonitrilo al 95 %, agua al 5 % y ácido fórmico al 0,05 %. El caudal fue de 1 ml/min, se realizó la separación a 40 °C y se obtuvieron 6 µg (15 µl) de una muestra de proteína con un tratamiento como se describe anteriormente.

Tiempo (min)	% de B
0,5	15
10	60
12,5	100
14,5	100
14,6	15
16	15
16,1	100

Durante los primeros 4 minutos, se dirigió el eluido al residuo para proteger el espectrómetro de masas de contaminación salina. Se preparó la fuente de ESI con un flujo de gas de secado de 12 l/min, una temperatura de 350 °C y una presión de nebulizador de 60 psi. Se adquirieron los espectros de EM usando un voltaje de fragmentador de 380 V y un intervalo de masas de 700 a 3200 m/z usando modo de ion positivo. Se adquirieron los datos de EM por el programa informático del instrumento de 4 a 17 minutos.

La figura 23 representa los gráficos de CE-SDS (sin reducción) de las preparaciones de proteínas finales después de diferentes procedimientos de purificación para los anticuerpos 83A10-TCB y 83A10-TCBcv. Las etapas de purificación por cromatografía de afinidad con proteína A (PA) y cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) aplicadas al anticuerpo 83A10-TCB dieron como resultado una pureza de <30 % y un 82,8 % de contenido en monómero (A). Cuando se aplicaron etapas de purificaciones adicionales incluyendo etapas de cromatografía de intercambio catiónico (cIEX) y una cromatografía de exclusión por tamaño final (re-SEC) a las preparaciones de proteínas finales en (A), se incrementó la pureza a un 93,4 % pero el contenido en monómero permaneció igual y el rendimiento se redujo significativamente a 0,42 mg/l. Sin embargo, cuando se aplicaron modificaciones de carga específicas a CL-CH1 de Fab anti-BCMA 83A10, a saber anticuerpo 83A10-TCBcv, ya se pudo observar un perfil superior de producción/purificación de la molécula TCB, como se demuestra por una pureza de un 95,3 %, contenido en monómero de un 100 % y rendimiento de hasta 3,3 mg/l, incluso cuando se aplicaron las etapas de purificación PA + cIEX + SEC (C) en comparación con (B) con un perfil de producción/purificación que muestra un rendimiento 7,9 veces menor y un contenido en monómero un 17,2 % menor a pesar de incluir una etapa de purificación re-SEC adicional.

A continuación se llevó a cabo un ciclo de producción de comparación directa para comparar el perfil de producción/purificación de los anticuerpos 83A10-TCB frente a 83A10-TCBcv para evaluar además las ventajas de las modificaciones de carga de CL-CH1 aplicadas a los anticuerpos. Como se representa en la figura 24, se midieron las propiedades de los anticuerpos 83A10-TCB y 83A10-TCBcv de forma paralela y se compararon después de cada etapa de purificación 1) cromatografía de afinidad con PA sola (A, B), 2) cromatografía de afinidad con PA, a continuación SEC (C, D) y 3) cromatografía de afinidad con PA, a continuación SEC, a continuación cIEX y re-SEC (E, F). Los gráficos de CE-SDS (sin reducción) de las soluciones de proteínas finales después de los respectivos procedimientos de purificación para los anticuerpos 83A10-TCB y 83A10-TCBcv se demuestran en la figura 24. Como se muestra en las figuras 24A y 24B, las mejoras con la aplicación de las variantes de carga al anticuerpo TCB ya se observaron después de la purificación por cromatografía de afinidad con PA sola. En este estudio comparativo directo, la etapa de purificación de cromatografía de afinidad con PA aplicada al anticuerpo 83A10-TCB dio como resultado una pureza de un 61,3 %, un rendimiento de 26,2 mg/l y un 63,7 % de contenido en monómero (24A). En comparación, cuando se purificó el anticuerpo 83A10-TCBcv por cromatografía de afinidad con PA se mejoraron todas las propiedades con una mejor pureza de un 81,0 %, un mejor rendimiento de 51,5 mg/l y un 68,2 % de contenido en monómero (24B). Cuando se aplicó una etapa de purificaciones SEC adicional a las preparaciones de proteínas finales como se observa en las figuras 24A y 24B, 83A10-TCB alcanzó una pureza de un 69,5 %, un rendimiento de 14,1 mg/l y un 74,7 % de contenido en monómero en comparación con 83A10-TCBcv con pureza y contenido en monómero mejorados de hasta un 91,0 % y un 83,9 % respectivamente, y un rendimiento de 10,3 mg/l. Aunque el rendimiento fue ligeramente menor (es decir, 27 % menor) para 83A10-TCBcv

que para 83A10-TCB en este experimento particular, el porcentaje de molécula correcta fue mucho mejor para 83A10-TCBcv que para 83A10-TCB, respectivamente de un 90 % frente a un 40-60 %, como se mide por CL-EM. En la tercera comparación directa, se agruparon las preparaciones de proteínas finales con 83A10-TCB y 83A10-TCBcv de las figuras 24C y 24D con aproximadamente 1 l (volumen equivalente) de las respectivas preparaciones de proteínas finales de otro lote de purificación (misma producción) tras la etapa de purificación por cromatografía de afinidad con PA sola. A continuación se purificaron además las preparaciones de proteínas agrupadas por procedimientos de purificación cIEX y SEC. Como se representa en las figuras 24E y 24F, se observó de forma coherente una mejora del perfil de producción/purificación del anticuerpo TCB con las variantes de carga en comparación con el anticuerpo TCB sin variante de carga. Después de varias etapas de purificación, se usaron procedimientos (es decir, PA +/- SEC + cIEX + SEC) para purificar el anticuerpo 83A10-TCB, solo se alcanzó una pureza de un 43,1 % y se pudo lograr un 98,3 % de contenido en monómero pero en detrimento del rendimiento que se redujo a 0,43 mg/l. El porcentaje de molécula correcta como se mide por CL-EM todavía fue malo con un 60-70 %. Al final, la calidad de la preparación de proteína final no fue aceptable para su uso *in vitro*. En marcado contraste, cuando se aplicaron las mismas etapas de purificación múltiples con la misma cronología al anticuerpo 83A10-TCBcv, se alcanzaron una pureza de un 96,2 % y un 98,9 % de contenido en monómero así como un 95 % de molécula correcta como se mide por CL-EM. Sin embargo, el rendimiento también se redujo en gran medida a 0,64 mg/l después de la etapa de purificación por cIEX. Los resultados muestran que la mejor pureza, el mayor contenido en monómero, el mayor porcentaje de molécula correcta y el mejor rendimiento se pueden lograr con el anticuerpo 83A10-TCBcv solo después de dos etapas de purificación estándar, es decir, cromatografía de afinidad con PA y SEC (figura 24D) mientras que dichas propiedades no se pudieron lograr con 83A10-TCB incluso cuando se aplicaron etapas de purificación adicionales (figura 24E).

La tabla 10 resume las propiedades de 83A10-TCB en comparación con 83A10-TCVcv tras la etapa de purificación con PA. La tabla 11 resume las propiedades de 83A10-TCB en comparación con 83A10-TCVcv tras las etapas de purificación con PA y SEC. La tabla 12 resume las propiedades de 83A10-TCB en comparación con 83A10-TCVcv tras las etapas de purificación con PA y SEC más PA sola, a continuación cIEX y re-SEC. Para las tablas de 10 a 12, los valores en negrita resaltan la propiedad superior en comparación entre 83A10-TCB frente a 83A10-TCVcv. Con una excepción que puede no ser representativa, todos los parámetros y valores de producción/purificación que resultan de los 3 experimentos de comparación directa fueron superiores para 83A10-TCBcv en comparación con 83A10-TCB. Los resultados globales demuestran claramente que se pudieron lograr las ventajas en los rasgos característicos de producción/purificación al aplicar las modificaciones de carga de CL-CH1 a los anticuerpos TCB y que solo se requirieron dos etapas de purificación (es decir, cromatografía de afinidad con PA y SEC) para lograr preparaciones de proteínas ya de alta calidad con propiedades de capacidad de desarrollo muy buenas.

TABLA 10. Perfil de producción/purificación de anticuerpos biespecíficos de linfocitos T anti-BCMA/anti-CD3 tras la etapa de purificación con cromatografía de afinidad con proteína A.

	83A10-TCB	83A10-TCBcv
Pureza (%)	61,3	81,0
Rendimiento (mg/l)	26,2	51,5
Cantidad (mg)	24,3	50,2
Monómero (%)	63,7	68,2
Molécula correcta por CL-EM (%)	n.d.	n.d

TABLA 11. Perfil de producción/purificación de anticuerpos biespecíficos de linfocitos T anti-BCMA/anti-CD3 tras las etapas de purificación con cromatografía de afinidad con proteína A y cromatografía de exclusión por tamaño.

	83A10-TCB	83A10-TCBcv
Pureza (%)	69,5	91,0
Rendimiento (mg/l)	14,1	10,3
Cantidad (mg)	13,1	10,0
Monómero (%)	74,7	83,9
Molécula correcta por CL-EM (%)	40-60	90

TABLA 12. Perfil de producción/purificación de anticuerpos biespecíficos de linfocitos T anti-BCMA/anti-CD3 tras las etapas de purificación con 1.a) cromatografía de afinidad con proteína A y cromatografía de exclusión por tamaño y 1.b) cromatografía de afinidad con proteína A sola agrupada conjuntamente, a continuación 2) cromatografía de intercambio catiónico y 3) cromatografía de exclusión por tamaño final.

	83A10-TCB	83A10-TCBcv
Pureza (%)	43,1	96,2
Rendimiento (mg/l)	0,43	0,64
Cantidad (mg)	0,73	1,27

	83A10-TCB	83A10-TCBcv
Monómero (%)	98,3	98,9
Molécula correcta por CL-EM (%)	60-70 %	>95 %

Unión de anticuerpos biespecíficos de linfocitos T anti-BCMA/anti-CD3 a líneas celulares de mieloma múltiple positivas para BCMA (citometría de flujo)

Se analizaron los anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3 (83A10-TCB, 13A4-TCBcv) por citometría de flujo para determinar su unión a BCMA humano en células NCI-H929 que expresan BCMA (ATCC® CRL-9068™). Se usó MKN45 (línea celular de adenocarcinoma gástrico humano que no expresa BCMA) como control negativo. En resumen, se recogieron células cultivadas, se contaron y se evaluó la viabilidad celular usando ViCell. A continuación se ajustaron las células viables a 2×10^6 células por ml en tampón de tinción FACS que contenía BSA (BD Biosciences). Se alicuotaron además 100 μ l de esta suspensión celular por pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo redondo y se incubaron con 30 μ l de los anticuerpos anti-BCMA o el correspondiente control de IgG durante 30 min a 4 °C. Se valoraron todos los anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3 (y controles de TCB) y se analizaron en un intervalo de concentraciones finales entre 1 - 300 nM. A continuación se centrifugaron las células (5 min, 350 x g), se lavaron con 120 μ l/pocillo de tampón de tinción FACS (BD Biosciences), se resuspendieron y se incubaron durante 30 min adicionales a 4 °C con fragmento F(ab')₂ AffiniPure conjugado con PE, anti-IgG humana caprina, fragmento Fc específico, conjugado con fluorocromo (Jackson Immuno Research Lab; 109-116-170). A continuación se lavaron las células dos veces con tampón de tinción (BD Biosciences), se fijaron usando 100 μ l de tampón de fijación BD por pocillo (n.º BD Biosciences, 554655) a 4 °C durante 20 min, se resuspendieron en 120 μ l de tampón FACS y se analizaron usando BD FACS Cantoll. Como se representa en la figura 25, se representó la intensidad de fluorescencia media de los anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3 en función de las concentraciones de anticuerpo; (A) 83A10-TCB en células H929 y células MKN45, (B) 83A10-TCBcv en células H929 y células MKN45. Cuando fue aplicable, se calcularon las CE50 usando Prism GraphPad (LaJolla, CA, EE. UU.) y los valores de CE50 que indicaban la concentración de anticuerpo requerida para alcanzar un 50 % de la unión máxima para la unión de 83A10-TCB y 83A10-TCBcv a células H929 se resumen en la tabla 13. La figura 25C muestra que 83A10-TCB y 83A10-TCBcv se unen a células H929 de manera dependiente de la concentración y con potencia similar. Dichos resultados se esperan puesto que las moléculas con 83A10-TCB y 83A10-TCBcv comparten secuencias de CDR idénticas en los respectivos dominios variables VL y VH. El anticuerpo de control DP47-TCB no se unió a células de mieloma H929 positivas para BCMA como se mide por una falta de incremento en la mediana de la intensidad de fluorescencia. En un segundo experimento de comparación directa, se evaluaron 83A10-TCB y 83A10-TCBcv para determinar su unión a células H929 positivas para BCMA y la falta de unión a células MKN45 negativas para BCMA/CD3. Como se representa en la figura 25D, 83A10-TCB y 83A10-TCBcv se unen a células H929 positivas para BCMA de manera dependiente de la concentración y con potencia similar. Los valores de CE50 para la unión de 83A10-TCB y 83A10-TCBcv a células H929 para este segundo experimento se resumen en la tabla 14.

TABLA 13. Valores de CE50 para la unión de anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3 a células H929 (experimento 1).

Moléculas TCB anti-BCMA/anti-CD3	CE50 (nM)	CE50 (μ g/ml)
83A10-TCB	9,8	1,9
83A10-TCBcv	14,5	2,8

TABLA 14. Valores de CE50 para la unión de anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3 a células H929 (experimento 2).

Moléculas TCB anti-BCMA/anti-CD3	CE50 (nM)	CE50 (μ g/ml)
83A10-TCB	16,9	3,25
83A10-TCBcv	14,5	2,8

Citotoxicidad de linfocitos T redirigidos de células de mieloma H929 que expresan alta BCMA inducida por anticuerpos biespecíficos de linfocitos T anti-BCMA/anti-CD3 (ensayo de liberación de LDH)

También se analizaron anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3 para determinar su potencial para inducir la apoptosis mediada por linfocitos T en células de mieloma que expresan alta BCMA tras la reticulación de la construcción por medio de la unión de los restos de unión a antígeno a BCMA en células. En resumen, se recogieron células diana de mieloma múltiple H929 que expresan BCMA humano con tampón de disociación celular, se lavaron y se resuspendieron en RPMI complementado con suero fetal bovino al 10 % (Invitrogen). Se sembraron en placa aproximadamente 30.000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo redondo y se añadió la respectiva dilución de la construcción de anticuerpo para obtener una concentración final deseada (por triplicado); variando las concentraciones finales de 0,1 pM a 10 nM. Para una comparación apropiada, se ajustaron todas las construcciones de TCB y los controles a la misma molaridad. Se añadieron linfocitos T totales humanos (efectores)

en los pocillos para obtener una proporción efector : diana (E:T) final de 5:1. Cuando se usaron PBMC humanos como células efectoras, se usó una proporción E:T final de 10:1. Se representaron los grupos de control negativo solo por células efectoras o diana. Como control positivo para la activación de pan linfocitos T humanos, se usó 1 µg/ml de PHA-M (Sigma n.º L8902). Para la normalización, se determinó la lisis máxima de las células diana H929 MM (= 100 %) por incubación de las células diana con una concentración final de Triton X-100 al 1 %, que indujo la muerte celular. Se representó la lisis mínima (= 0 %) por células diana coincubadas solo con células efectoras, es decir, sin ningún anticuerpo biespecífico de linfocitos T. Después de 20-24 h de incubación a 37 °C, CO₂ al 5 %, a continuación se midió la liberación de LDH de las células diana de mieloma apoptóticas/necróticas en el sobrenadante con el kit de detección de LDH (Roche Applied Science), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se representó el porcentaje de liberación de LDH frente a las concentraciones de anticuerpos biespecíficos de linfocitos T anti-BCMA/anti-CD3 en curvas de concentración-respuesta. Cuando fue aplicable, se midieron los valores de CE50 usando el programa informático Prism (GraphPad) y se determinaron como la concentración de anticuerpo TCB que da como resultado un 50 % de liberación de LDH máxima. Como se muestra en la figura 26, los anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3 ((A,B) 83A10-TCB, (C,D) 83A10-TCBcv) indujeron una destrucción dependiente de la concentración de las células de mieloma H929 positivas para BCMA como se mide por la liberación de LDH. La destrucción de las células H929 fue específica puesto que el anticuerpo de control DP47-TCB que no se une a las células diana positivas para BCMA no indujo la liberación de LDH, incluso en la mayor concentración de 1 nM (A). Aunque los valores de CE50 no fueron medibles con el uso del programa informático estadístico Prism (GraphPad) para 83A10-TCB (A, B) y 83A10-TCBcv (C, experimento 1), la magnitud de los valores de CE50 se pudo estimar aproximadamente a una potencia de intervalo picomolar bajo para las moléculas TCB tanto no cargadas como cargadas. En un segundo experimento, se evaluó el efecto de 83A10-TCBcv en el ensayo de destrucción de linfocitos T redirigidos y se pudo medir un valor de CE50 a 1,5 pM. Los autores no pudieron excluir que el valor de CE50 ligeramente menor (potencia ligeramente mejor) se pudo deber a la variabilidad de donantes de sangre. Sin embargo, la magnitud de la potencia para destruir las células H929 estuvo definitivamente en el intervalo picomolar bajo. Los resultados globales sugieren que 83A10-TCB (sin variante de carga) frente a 83A10-TCBcv (con variante de carga) muestra propiedades biológicas similares en ensayos basados en células.

TABLA 15. Valores de CE50 y estimaciones para la destrucción de linfocitos T redirigidos de células H929 inducida por anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3.

Moléculas TCB anti-BCMA/anti-CD3	CE50 (pM)	CE50 (µg/ml)
83A10-TCB (experimento 1)	Intervalo pM bajo (aprox. <20)	Un solo dígito
83A10-TCB (experimento 2)	Intervalo pM bajo (aprox. <20)	Un solo dígito
83A10-TCBcv (experimento 1)	Intervalo pM bajo (aprox. <20)	Un solo dígito
83A10-TCBcv (experimento 2)	1,5	0,3

Ejemplo 3

El ejemplo 3 no está de acuerdo con la invención y está presente solo para propósitos de ilustración.

Preparación del anticuerpo biespecífico de linfocitos T "2+1 IgG CrossFab, invertida" con modificaciones de carga (anti-Her2/anti-CD3) y anticuerpo biespecífico de linfocitos T "2+1 IgG CrossFab" con modificaciones de carga (anti-Her3/anti-CD3)

Una ilustración esquemática de las moléculas preparadas en este ejemplo se muestra en la figura 27. La molécula anti-Her2/anti-CD3 "2+1 IgG CrossFab, invertida" con modificaciones de carga (denominada en este ejemplo "TCB-Her2") comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO 21, 52, 53 y 54. La molécula anti-Her3/anti-CD3 "2+1 IgG CrossFab" con modificaciones de carga (denominada en este ejemplo "TCB-Her3") comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO 21, 55, 56 y 57.

Se prepararon las moléculas, se purificaron y se analizaron como se describe en el ejemplo 1 anteriormente (con una única etapa de SEC preparativa).

Ambas moléculas se pudieron purificar con una calidad final alta mostrada por cromatografía de exclusión por tamaño analítica y CE-SDS (tabla 16, 17). Aunque la recuperación de TCB-Her2 en esta preparación fue menor en comparación con TCB-Her3, la proteína fue casi pura después de dos etapas de purificación (proteína A y SEC). El análisis por CE-SDS muestra solo un 1,18 % de impureza de bajo peso molecular a aproximadamente 164 kDa (tabla 17). La especie detectada a 187,28 kDa corresponde a la molécula diana sin glucosilación enlazada a N en el dominio Fc (esta especie se detecta comúnmente por CE-SDS para IgG1 humana después de la producción en células eucariotas).

Se pudo purificar TCB-Her3 con una buena recuperación. La calidad final fue superior a la de TCB-Her2 en

comparación con el contenido en monómero final. Además, la CE-SDS muestra un 100 % de proteína diana, asumiendo que el pico detectado a 192,05 kDa corresponde a la especie Fc no glucosilada.

Para ambas preparaciones no se han detectado impurezas de bajo peso molecular relacionadas con el producto tales como cadenas ligeras libres (peso molecular esperado a 25 kDa), cadenas ligeras dimerizadas como se puede producir introduciendo solo un intercambio CH1-CL en una cadena ligera (peso molecular esperado a 50 kDa) o moléculas con cadenas ligeras faltantes o no enlazadas covalentemente (peso molecular esperado a 125 kDa, 150 kDa o 175 kDa) por CE-SDS o cromatografía de exclusión por tamaño analítica.

TABLA 16. Sumario de producción y purificación de moléculas TCB anti-Her2/anti-CD3 y anti-Her3/anti-CD3 con modificaciones de carga.

Molécula	Valor [mg/l]	Recuperación [%]	Rendimiento [mg/l]	SEC analítica (APM/monómero/BPM) [%]
TCB-Her2	45	1,8	1	3,3/96,7/0
TCB-Her3	72	12,7	11,42	0/100/0

TABLA 17. Análisis por CE-SDS (sin reducción) de moléculas TCB anti-Her2/anti-CD3 y anti-Her3/anti-CD3 con modificaciones de carga.

Molécula	N.º pico	Tamaño [kDa]	Pureza [%]
TCB-Her2	1	163,99	1,18
	2	187,28	1,30
	3	200,81	97,52
TCB-Her3	1	192,05	19,36
	2	198,57	80,64

Unión de TCB-Her2 y TCB-Her3 a células

Se recogieron células en suspensión Jurkat, se lavaron con tampón FACS (PBS + BSA al 0,1 %) una vez y se determinó su viabilidad por ViCell.

Se recogieron células tumorales KPL-4 adherentes (proporcionadas amablemente por J. Kurebayashi, Kawasaki Medical School, Japón) con tampón de disociación celular (Gibco Invitrogen) y se lavaron con tampón FACS una vez, antes de que se determinara su viabilidad por ViCell.

Se sembraron en placas 0,2 millones de células por pocillo de una placa de 96 pocillos de fondo redondo y se centrifugaron las placas durante 4 min a 400 g. A continuación, se añadieron 25 µl por pocillo de las diluciones de TCB en tampón FACS a las células. Se incubaron las células durante 30 min en el frigorífico. Después de esto, se lavaron las células dos veces con 150 µl de tampón FACS por pocillo.

Se añadieron 25 µl de anticuerpo secundario apropiadamente diluido (fragmento F(ab')₂ AffiniPure conjugado con FITC, anti-IgG humana caprina, fragmento F(ab')₂ específico, Jackson ImmunoResearch) por pocillo y se tiñeron las placas durante otros 30 min a 4 °C en la oscuridad.

Se lavaron las placas dos veces con 150 µl de tampón FACS por pocillo y se resuspendieron en 150 µl de tampón FACS. Se realizó el análisis usando un BD FACS Cantoll, equipado con el programa informático FACS Diva. Se representaron los valores de la mediana de fluorescencia (MFI) frente a la concentración de las moléculas TCB.

Como se muestra en la figura 29, ambos TCB muestran una buena unión dependiente de la concentración a sus respectivos antígenos diana en las células.

Activación de linfocitos T efectores CD8⁺ humanos, después de la lisis mediada por linfocitos T de células tumorales humanas, inducida por TCB-Her3

Se evaluaron linfocitos T efectores CD8⁺ de un experimento de lisis de células tumorales clásico (como se describe a continuación) con TCB-Her3 usando una proporción de efector con respecto a diana (E:T) de 10:1 y un tiempo de incubación de 48 h para determinar el porcentaje de células positivas para CD69.

En resumen, después de la incubación, se transfirieron PBMC a una placa de 96 pocillos de fondo redondo, se centrifugó a 350 x g durante 5 min y se lavó dos veces con PBS que contenía BSA al 0,1 %. Se realizó la tinción de superficie para CD8 (BioLegend n.º 300908) y CD69 (BioLegend n.º 310904) de acuerdo con las indicaciones de los proveedores. Se lavaron las células dos veces con 150 µl/pocillo de PBS que contenía BSA al 0,1 % y se fijaron durante 20 min a 4 °C usando 100 µl/pocillo de PFA al 1 %. Después de la centrifugación, se resuspendieron las muestras en 200 µl/pocillo de PBS-BSA al 0,1 % y se analizó en FACS Cantoll (programa informático FACS

Diva).

Como se muestra en la figura 30, TCB-Her3 induce la reticulación de linfocitos T y células tumorales (KPL-4) por medio de sus respectivos restos selectivos e induce la activación de linfocitos T de manera dependiente de la concentración.

Ensayo de activación de Jurkat-NFAT

Se evaluó la capacidad de TCB-Her2 y TCB-Her3 para inducir la reticulación de linfocitos T y posteriormente la activación de linfocitos T, usando cocultivos de células diana positivas para antígenos tumorales (KPL-4) y células indicadoras Jurkat-NFAT (una línea celular indicadora de leucemia linfocítica aguda humana que expresa CD3 con un promotor NFAT, GloResponse Jurkat NFAT-RE-luc2P, Promega n.º CS176501). Tras la unión simultánea de la molécula TCB al antígeno Her2 humano, respectivamente Her3 humano, (expresado en células tumorales) y al antígeno CD3 (expresado en células indicadoras Jurkat-NFAT), se activa el promotor NFAT y da lugar a la expresión de la luciferasa de luciérnaga activa. La intensidad de la señal de luminiscencia (obtenida tras la adición del sustrato de luciferasa) es proporcional a la intensidad de la activación y señalización de CD3.

Para el ensayo, se recogieron células tumorales humanas KPL-4 con tampón de disociación celular (Gibco Invitrogen) y se determinó su viabilidad usando ViCell. Se sembraron en placa 20.000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos de paredes blancas y fondo plano (Greiner bio-one) y se añadieron los TCB diluidos o el medio (para controles). Posteriormente, se recogieron células indicadoras Jurkat-NFAT y se evaluó su viabilidad usando ViCell. Se resuspendieron las células en medio de cultivo celular y se añadieron a células tumorales para obtener una E:T final de 2,5:1 (para TCB-Her2) o de 5:1 (para TCB-Her3) como se indica, y un volumen final de 100 µl por pocillo. Se incubaron las células durante 5 h a 37 °C en una estufa de incubación humidificada. Al final del tiempo de incubación, se añadieron 100 µl/pocillo de solución ONE-Glo (Promega, n.º E6120) (volumen 1:1 de ONE-Glo y medio de ensayo por pocillo) a los pocillos y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente en la oscuridad. Se detectó la luminiscencia usando el lector de ELISA WALLAC Victor3 (PerkinElmer2030), 5 s/pocillo como tiempo de detección.

Como se representa en la figura 31, ambas moléculas TCB inducen la reticulación de linfocitos T por medio de CD3 y posteriormente la activación de linfocitos T. TCB-Her3 es ligeramente más potente en células KPL-4, lo que se podría explicar por un mayor nivel de Her3 sobre Her2 en estas células diana.

Lisis de células tumorales inducida por TCB-Her2 y TCB-Her3

Se evaluó la lisis de células tumorales de células diana tumorales que expresan Her2 o Her3 inducida por las respectivas moléculas TCB, usando leucocitos mononucleares en la sangre periférica (PBMC) humanos como efectores en una E:T de 10:1. Se determinó la lisis de células tumorales por medición de LDH liberada en los sobrenadantes después de 24 h y 48 h tras incubación con los TCB, como se indica.

Se aislaron PBMC humanos de sangre recién obtenida o de una capa leucocítica. En resumen, se diluyó la sangre 2:1 (sangre recién obtenida) o 3:1 (capa leucocítica) con PBS. Se colocaron en capas aproximadamente 30 ml de la mezcla sangre/PBS en 15 ml de Histopaque (Sigma) y se centrifugó durante 30 min a 450 x g sin freno a TA. Se recogieron los linfocitos con una pipeta de 10 ml en tubos de 50 ml que contenían PBS. Se llenaron los tubos hasta 50 ml con PBS y se centrifugaron 10 min a 350 g. Se desechó el sobrenadante, se resuspendió el sedimento en 50 ml de PBS y se centrifugó durante 10 min a 300 x g. Se repitió la etapa de lavado una vez. Se resuspendieron las células en RPMI que contenía FCS al 10 % y GlutaMax al 1 % (Life Technologies) y se almacenaron a 37 °C, CO₂ al 5 % en la estufa de incubación hasta el inicio del ensayo (no más de 24 h). Se recogieron células diana con tripsina/EDTA, se lavaron y se sembraron en placas a una densidad de 30.000 células/pocillo usando placas de 96 pocillos de fondo plano. Se dejó que las células se adhieran durante la noche en una estufa de incubación humidificada. El día del ensayo, se centrifugaron las placas de ensayo a 350 x g durante 5 min y se aspiró el medio. Se añadieron 100 µl por pocillo de medio de ensayo.

Se añadieron los TCB a las concentraciones indicadas (intervalo de 0,001 pM - 1 nM para TCB-Her3 y 0,01 pM - 100 nM para TCB-Her2, por triplicado). Se añadieron PBMC a células diana a la proporción E:T final de 10:1. Se evaluó la destrucción de células diana después de 24 h y 48 h de incubación por cuantificación de LDH (lactato deshidrogenasa) liberada en sobrenadantes celulares por células apoptóticas/necróticas (kit de detección de LDH, Roche Applied Science, n.º 11 644 793 001). Se logró la lisis máxima de las células diana (= 100 %) por incubación de células diana con Triton X-100 al 1 %. Lisis mínima (= 0 %) se refiere a células diana coincubadas con células efectoras sin anticuerpo biespecífico. Se calcularon los valores de CE50 usando GraphPadPrism5.

En otro experimento, se determinó la lisis de células tumorales por actividad caspasa 3/7 después de 6,5 h midiendo la luminiscencia en un lector de microplacas (5 s de tiempo de lectura por pocillos).

Para la determinación de la actividad caspasa 3/7, se recogieron células diana KPL-4-caspasa-3/7 GloSensor (células KPL-4 transfectadas de forma estable con plásmido GloSensor) como se describe anteriormente. Después

de un lavado con PBS, se ajustó la concentración a $0,3 \times 10^6$ células/ml en el medio de ensayo (RPMI1640, FCS al 2 %, Glutamax al 1 %) y se mezcló con reactivo GloSensor cAMP al 2 % v/v (Promega). Se transfirieron 100 μ l (= 30.000 células) de esta suspensión de células diana a cada pocillo de una placa de fondo plano de 96 con paredes blancas.

Se prepararon leucocitos monomorfonucleares en la sangre periférica (PBMC) por centrifugación por densidad Histopaque de preparaciones de linfocitos enriquecidas (capas leucocíticas) obtenidas de donantes humanos sanos, como se describe anteriormente. Se realizó el ensayo de lisis de células tumorales esencialmente como se describe anteriormente.

Los resultados representados en la figura 32C y figura 33 ilustran que la molécula TCB-Her3 induce la apoptosis y la lisis potentes y dependientes de la concentración de células tumorales KPL-4.

Lo mismo es cierto para TCB-Her2 que se representa en la figura 32A y B y muestra lisis significativa, dependiente de la concentración de células tumorales con el tiempo. De este modo, la CE50 de destrucción parece depender del nivel de expresión de Her2 en la respectiva célula diana. Cuanto mayor es el nivel de expresión, mejor es la destrucción de células tumorales por TCB-Her2.

Ejemplo 4

El ejemplo 4 no está de acuerdo con la invención y está presente solo para propósitos de ilustración.

Preparación de anticuerpos biespecíficos de linfocitos T "(Fab)₂-CrossFab" con y sin modificaciones de carga (anti-MCSP/anti-CD3)

Una ilustración esquemática de las moléculas preparadas en este ejemplo se muestra en la figura 34. La molécula anti-MCSP/anti-CD3 "(Fab)₂-CrossFab" con modificaciones de carga en las proteínas de unión a MCSP (denominada "(Fab)₂-XFab-LC007cv" en este ejemplo) comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO 58, 59 y 60. La molécula anti-MCSP/anti-CD3 "(Fab)₂-CrossFab" sin modificaciones de carga (denominada "(Fab)₂-XFab" en este ejemplo) comprende las correspondientes secuencias de aminoácidos sin las modificaciones de carga.

Se prepararon las moléculas, se purificaron y se analizaron esencialmente como se describe en el ejemplo 1 anteriormente, con las siguientes adaptaciones.

Para la producción de estas moléculas, se transfectaron las células HEK293-EBNA con los correspondientes vectores de expresión en una proporción 1:2:1 ("vector cadena pesada" : "vector cadena ligera Fab anti-MCSP" : "vector cadena ligera Fab anti-CD3").

Se determinó la concentración de las construcciones en el medio de cultivo por proteína A-HPLC, en base a la unión de partes del dominio CH1 a la proteína A a pH 8,0 y una etapa de elución de pH 2,5 como se describe en el ejemplo 1.

Se purificaron las proteínas secretadas de los sobrenadantes de cultivo celular por cromatografía de afinidad usando la unión por cromatografía de afinidad a CH1, seguido de una etapa de cromatografía de exclusión por tamaño. Para la cromatografía de afinidad, se cargó el sobrenadante en una columna HiTrap KappaSelect (VC=5 ml, GE Healthcare) equilibrada con 5 ml de Tris 50 mM, glicina 100 mM, NaCl 150 mM, pH 8,0. Se retiró la proteína no unida lavando con al menos 10 volúmenes de columna de Tris 50 mM, glicina 100 mM, NaCl 150 mM, pH 8,0. Se eluyó la proteína diana en un gradiente de 10 volúmenes de columna para Tris 50 mM, glicina 100 mM, NaCl 150 mM, pH 2,0. Se neutralizó la solución de proteína añadiendo 1/40 de Tris 2 M, pH 8,0. Se concentra la proteína diana y se filtra antes de su carga en una columna HiLoad Superdex 200 (GE Healthcare) equilibrada con histidina 20 mM, cloruro de sodio 140 mM, Tween-20 al 0,01 %, pH 6,0.

Se produjeron ambas moléculas y se purificaron siguiendo el mismo procedimiento. En comparación con la molécula sin modificaciones de carga ("(Fab)₂-XFab") el valor de la molécula con cargas fue 10 veces menor. No obstante, la recuperación final fue aproximadamente dos veces mayor para la molécula con las modificaciones de carga en los dos Fab anti-MCSP ("(Fab)₂-XFab-LC007cv") (tabla 18). Se pudo purificar la molécula (Fab)₂-XFab-LC007cv hasta un contenido en monómero final de un 95,8 % mostrado por cromatografía de exclusión por tamaño y una pureza final comprobada por análisis por CE-SDS de un 94,33 %.

TABLA 18. Sumario de producción y purificación de moléculas TCB anti-MCSP/anti-CD3 con y sin modificaciones de carga.

Molécula	Valor [mg/l]	Recuperación [%]	Rendimiento [mg/l]	SEC analítica (APM/monómero/BPM) [%]
(Fab)2-XFab	25	6,24	7,8	0/100/0
(Fab)2-XFab-LC007cv	2,32	10,5	0,24	3,2/95,8/1

5 TABLA 19. Análisis por CE-SDS (sin reducción) de la molécula TCB anti-MCSP/anti-CD3 con modificaciones de carga.

Molécula	N.º pico	Tamaño [kDa]	Pureza [%]
(Fab)2-XFab-LC007cv	1	162,67	94,33
	2	170,59	5,67

10 Unión celular de anticuerpos biespecíficos de linfocitos T "(Fab)2-CrossFab" con y sin modificaciones de carga (anti-MCSP/anti-CD3)

Se recogieron células en suspensión Jurkat-NFAT, se lavaron con tampón FACS (PBS + BSA al 0,1 %) una vez y se determinó su viabilidad por ViCell.

15 Se recogieron células tumorales MV-3 adherentes con tampón de disociación celular (Gibco Invitrogen) y se lavaron con tampón FACS una vez, antes de que se determinara su viabilidad por ViCell.

20 Se sembraron en placas 0,2 millones de células por pocillo de una placa de 96 pocillos de fondo redondo y se centrifugaron las placas durante 4 min a 400 x g. A continuación, se añadieron 25 µl por pocillo de las diluciones de anticuerpos primarios en tampón FACS a las células. Se incubaron las células durante 30 min en el frigorífico. Después de esto, se lavaron las células dos veces con 150 µl de tampón FACS por pocillo.

25 Se añadieron 25 µl del anticuerpo secundario diluido (fragmento F(ab')₂ AffiniPure conjugado con FITC, anti-IgG humana caprina, fragmento F(ab')₂ específico, Jackson ImmunoResearch) por pocillo y se tiñeron las placas durante otros 30 min a 4 °C en la oscuridad.

30 Se lavaron las placas dos veces con 150 µl de tampón FACS por pocillo y se resuspendieron en 150 µl de tampón FACS. Se realizó el análisis usando un BD FACS Cantoll, equipado con el programa informático FACS Diva. Se representaron los valores de la mediana de fluorescencia (MFI) frente a la concentración de las moléculas TCB para MCSP.

35 Como se muestra en la figura 36, la molécula (Fab)2-XFab-LC007cv muestra una unión dependiente de la concentración a MCSP humano en MV-3 y a CD3 humano en células Jurkat. La molécula (Fab)2-XFab sin modificaciones de carga muestra una unión comparable a MCSP humano como (Fab)2-XFab-LC007cv (unión CE50 de 2,3 nM para (Fab)2-XFab-LC007cv frente a CE50 de 1,5 nM para (Fab)2-XFab).

Lisis de células tumorales mediada por anticuerpos biespecíficos de linfocitos T "(Fab)2-CrossFab" con y sin modificaciones de carga (anti-MCSP/anti-CD3)

40 Se evaluó la lisis de células tumorales de células diana tumorales MV-3 que expresan MCSP inducida por las moléculas TCB para MCSP usando PBMC humanos como efectores, a una E:T de 10:1. Se determinó la lisis de células tumorales por medición de LDH liberada en los sobrenadantes después de 24 h y 48 h tras incubación con los TCB.

45 En resumen, se recogieron células diana con tripsina/EDTA, se lavaron y se sembraron a una densidad de 25.000 células/pocillo usando placas de 96 pocillos de fondo plano. Se dejó que las células se adhirieran durante la noche en una estufa de incubación humidificada. El día del ensayo, se centrifugaron las placas de ensayo a 350 x g durante 5 min y se aspiró el medio. Se añadieron 100 µl por pocillo de medio de ensayo.

50 Se aislaron leucocitos mononucleares en la sangre periférica (PBMC) de sangre recién obtenida. En resumen, se diluyó la sangre 2:1 con PBS. Se colocaron en capas aproximadamente 30 ml de la mezcla sangre/PBS en 15 ml de Histopaque (Sigma) y se centrifugó durante 30 min a 450 x g sin freno. Se recogieron los linfocitos con una pipeta de 10 ml en tubos de 50 ml que contenían PBS. Se llenaron los tubos hasta 50 ml con PBS y se centrifugaron 10 min a 350 x g. Se desechó el sobrenadante, se resuspendió el sedimento en 50 ml de PBS y se centrifugó durante 10 min a 300 x g. Se repitió una vez la etapa de lavado. Se resuspendieron las células en RPMI que contenía FCS al 10 % y GlutaMax al 1 % (Life Technologies) y se almacenaron a 37 °C, CO₂ al 5 % en la estufa de incubación hasta el inicio del ensayo (no más de 24 h).

- 5 Para el ensayo de destrucción, se añadieron las moléculas TCB a las concentraciones indicadas (intervalo de 0,04 pM - 10 nM por triplicado). Se añadieron PBMC a células diana a la proporción E:T final de 10:1. Se evaluó la destrucción de células diana después de 24 h y 48 h de incubación por cuantificación de LDH (lactato deshidrogenasa) liberada en sobrenadantes celulares por células apoptóticas/necróticas (kit de detección de LDH, Roche Applied Science, n.º 11 644 793 001). Se logró la lisis máxima de las células diana (= 100 %) por incubación de células diana con Triton X-100 al 1 %. Lisis mínima (= 0 %) se refiere a células diana coincubadas con células efectoras sin anticuerpo biespecífico. Se calcularon los valores de CE50 usando GraphPadPrism5.
- 10 Como se representa en la figura 37, ambas moléculas muestran lisis dependiente de la concentración de células diana que expresan hMCSP. La potencia de la molécula (Fab)2-XFab-LC007cv (CE50 2,8 pM después de 24 h, y 8,6 pM después de 48 h) es comparable a la potencia de la molécula (Fab)2-XFab sin modificaciones de carga (CE50 5,9 pM después de 24 h, y 4,8 pM después de 48 h).

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T, en la que la molécula comprende una cadena pesada de SEQ ID NO: 18, una cadena pesada de SEQ ID NO: 19, dos cadenas ligeras de SEQ ID NO: 20 y una cadena ligera de SEQ ID NO: 21; y en la que las cadenas pesadas y ligeras se ensamblan para formar una primera molécula Fab que se une específicamente a CD20, una segunda molécula Fab que se une específicamente a CD3 y una tercera molécula Fab que se une específicamente a CD20, y un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad que se pueden asociar de forma estable.
- 5

Figura 1

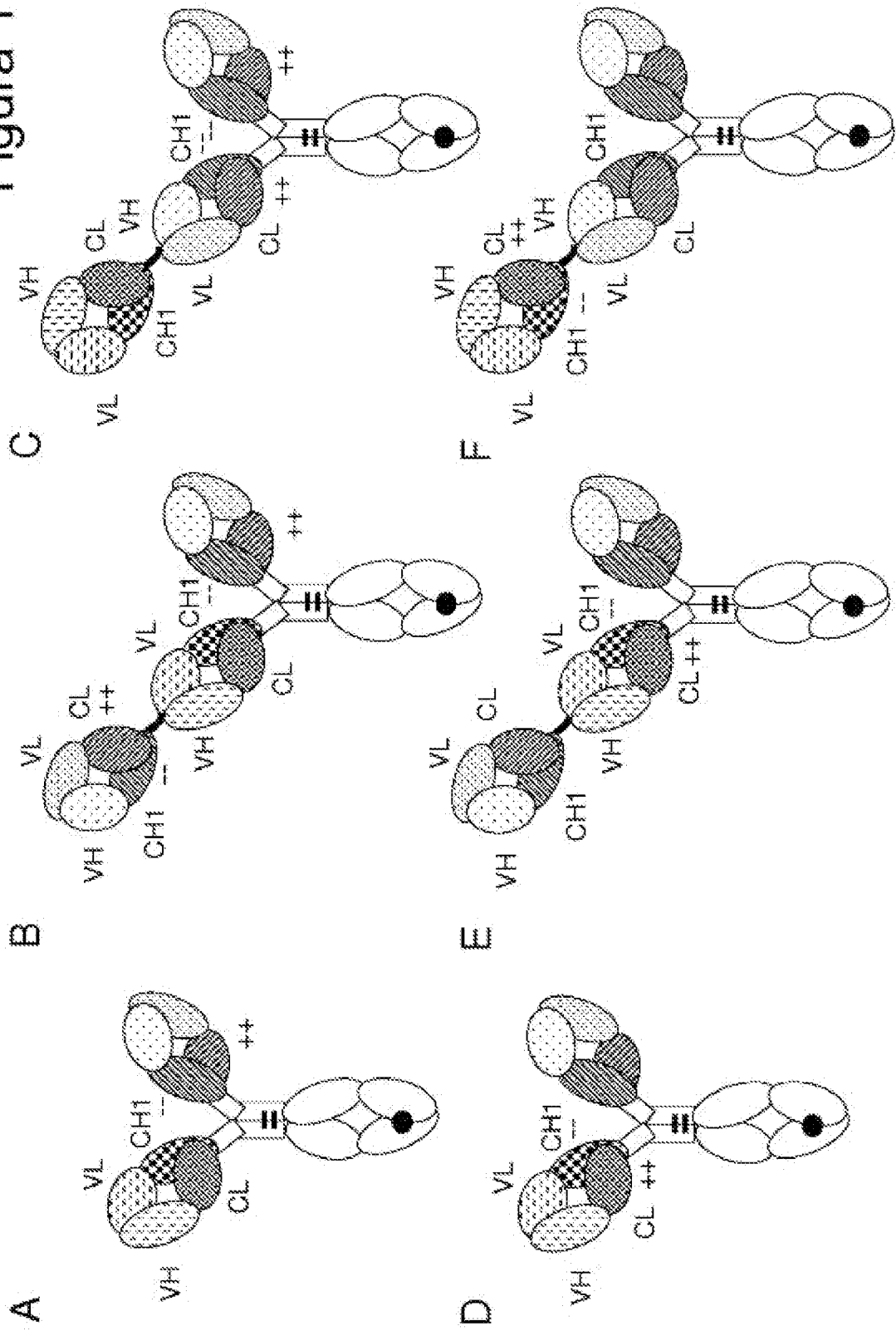


Figura 1

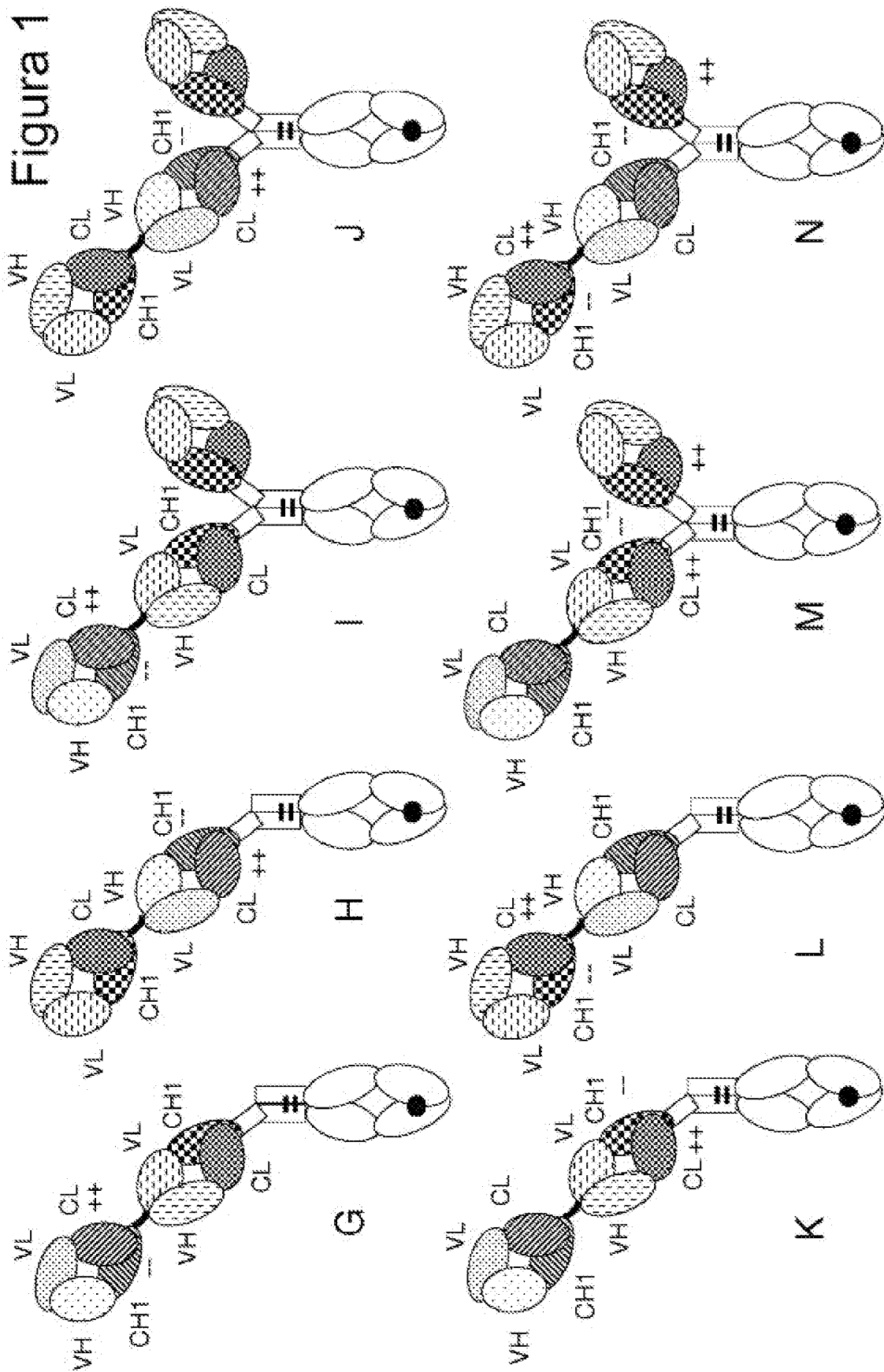


Figura 1

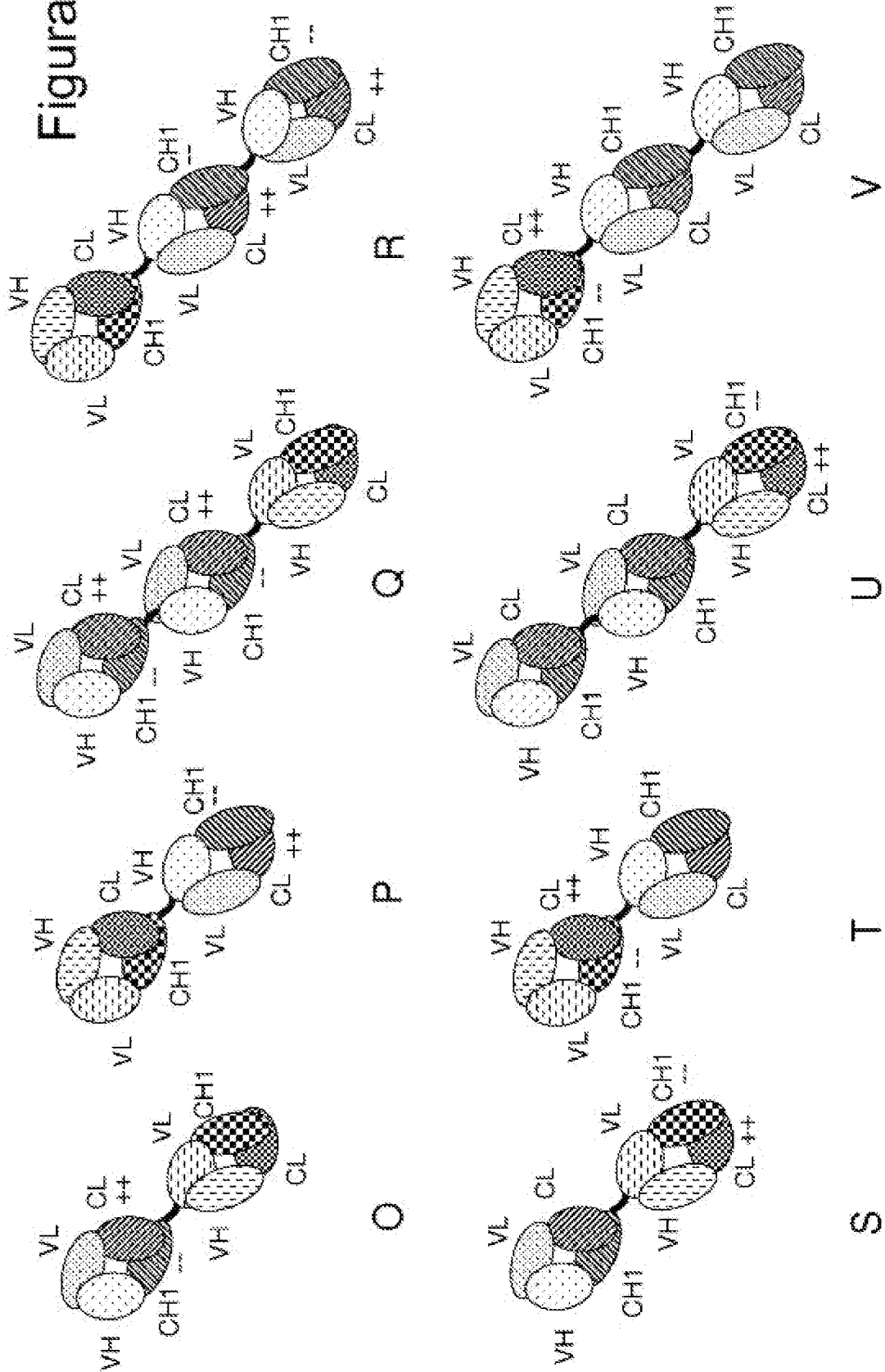
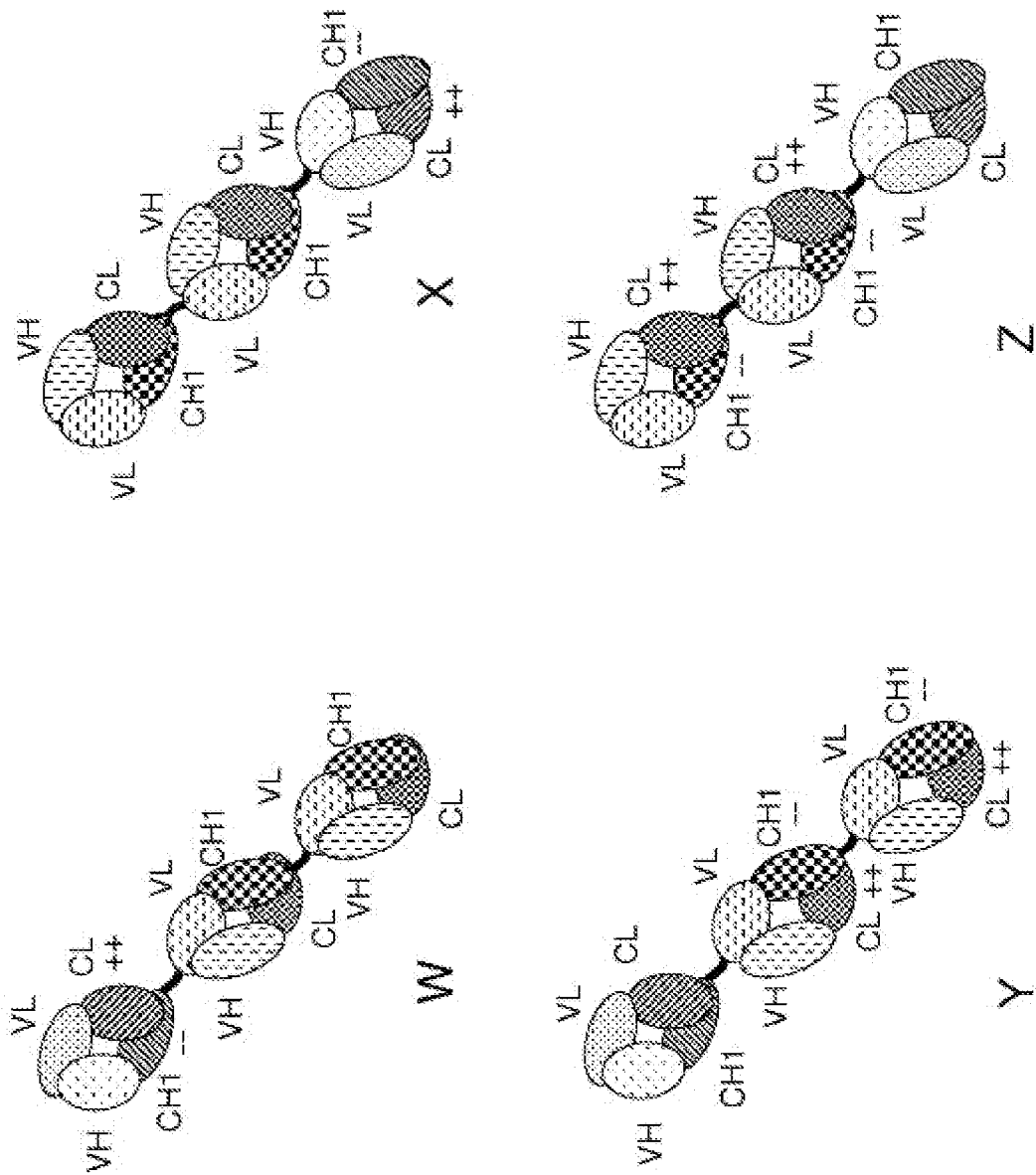


Figura 1



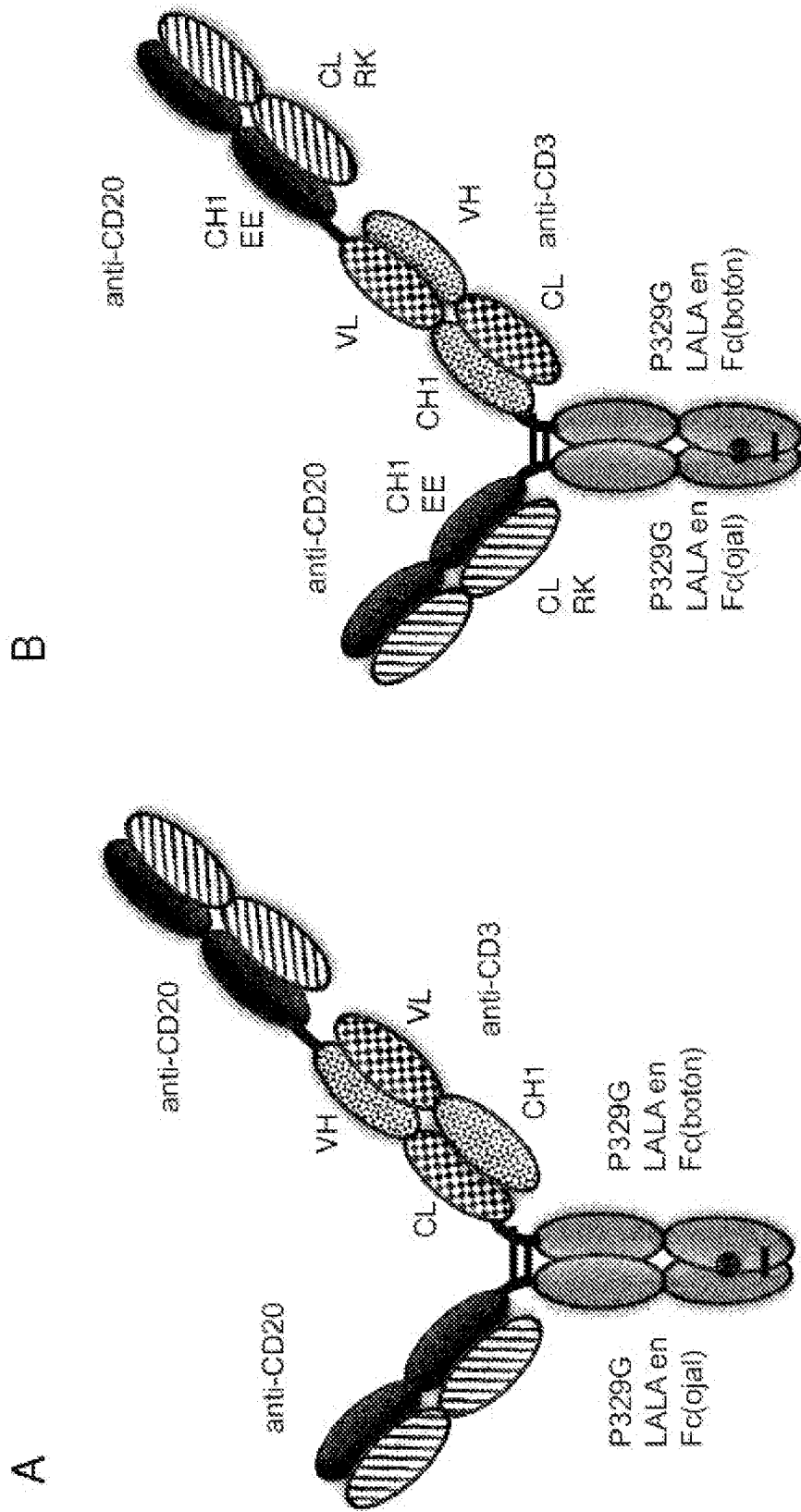


Figura 2

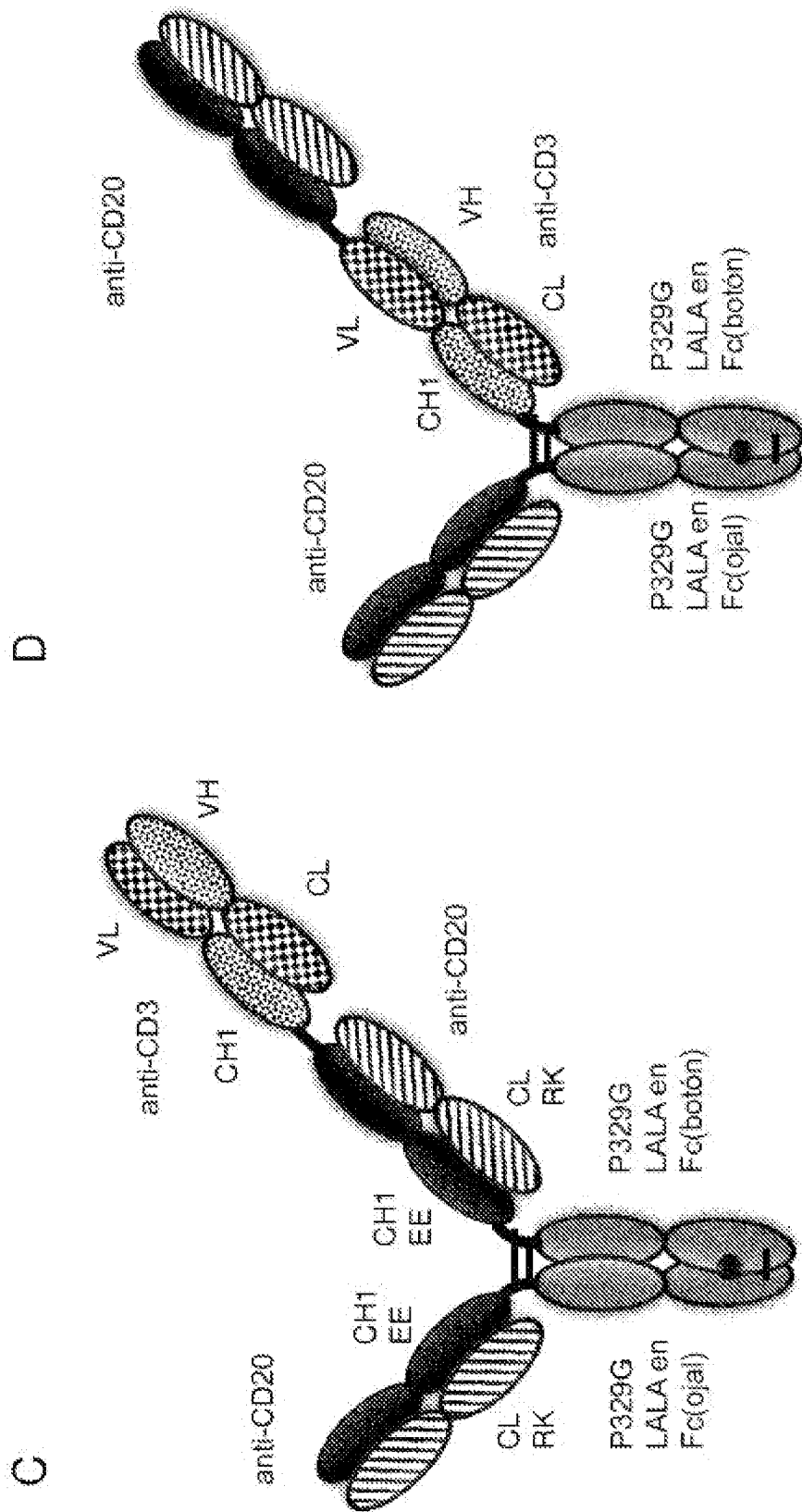


Figura 2

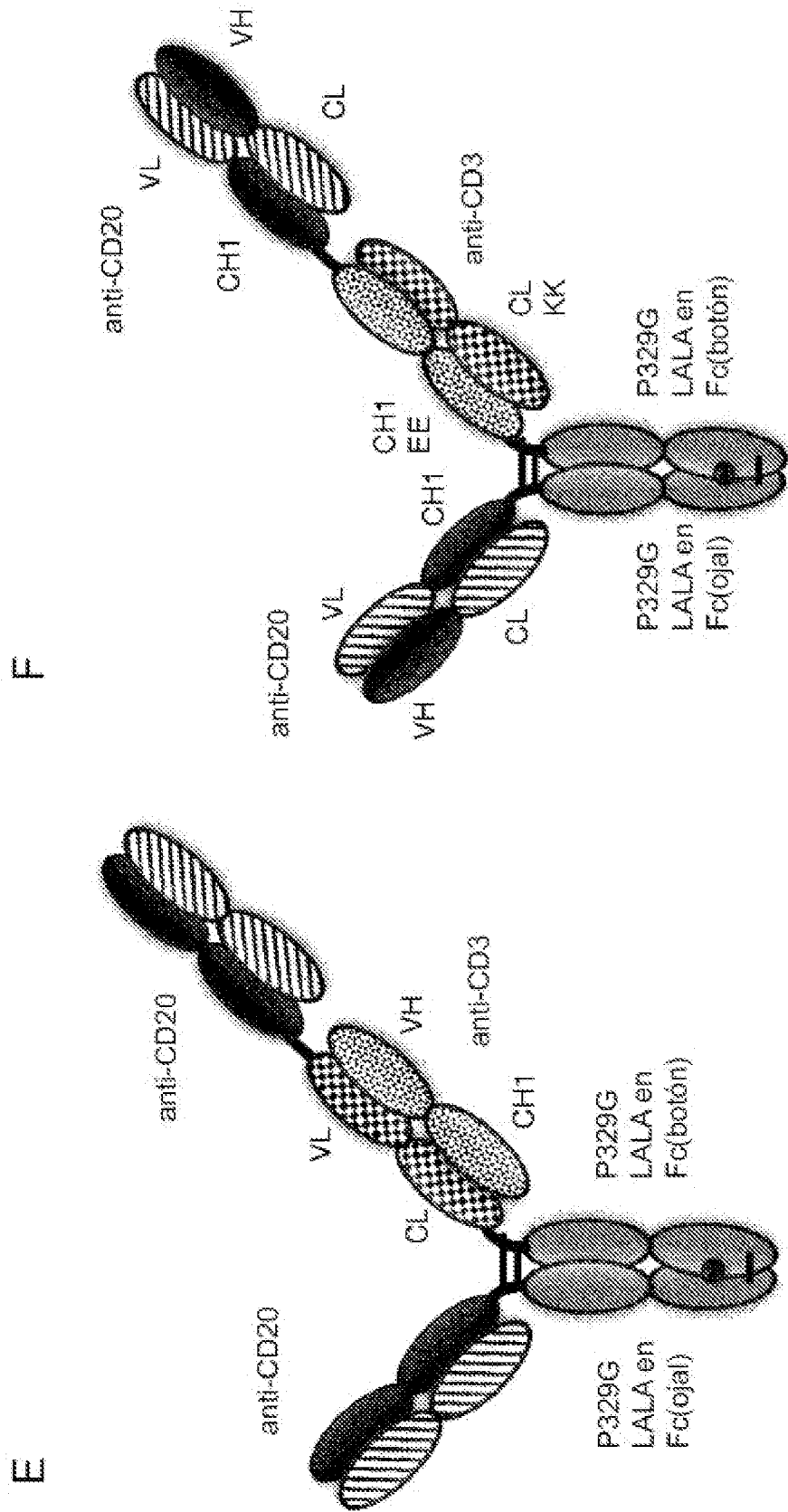


Figura 2

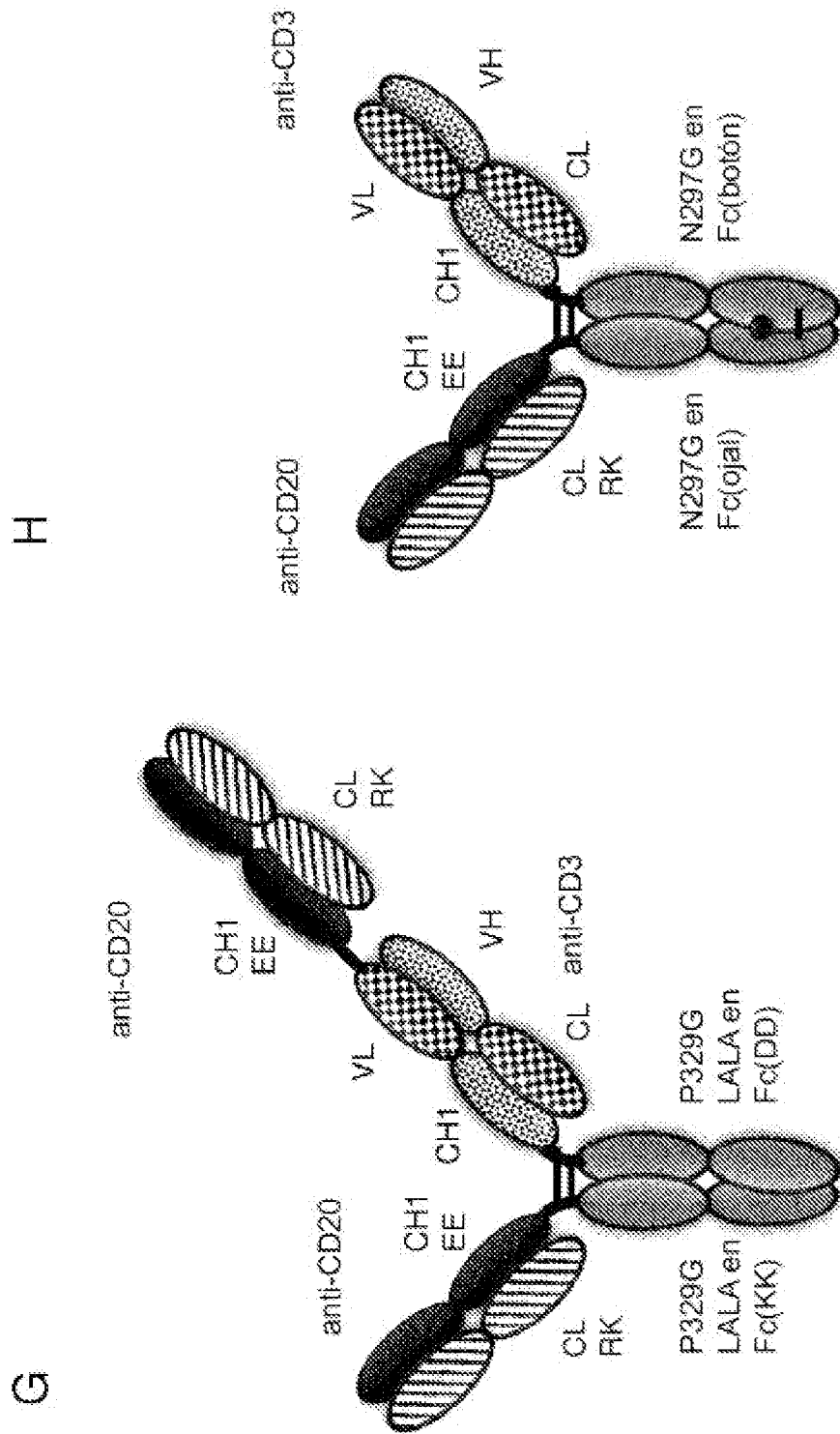


Figura 2

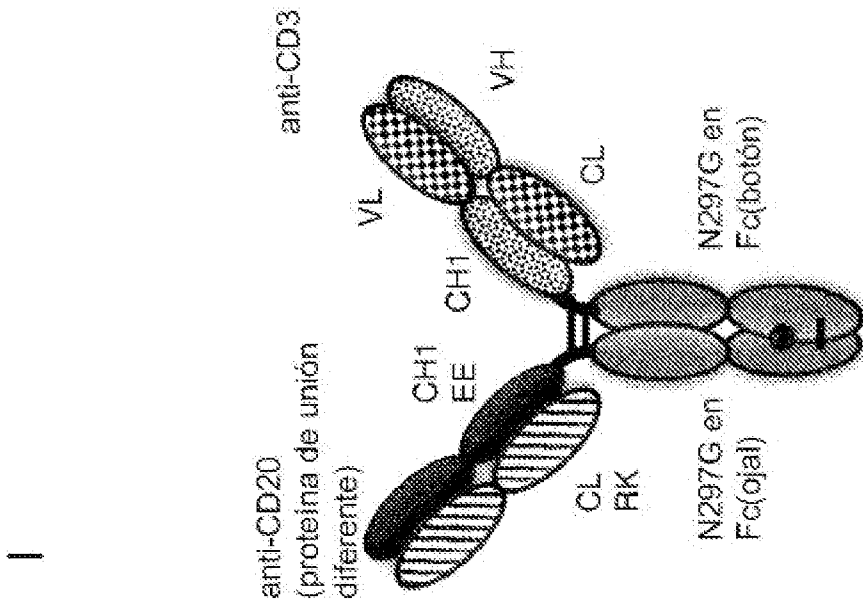


Figura 2

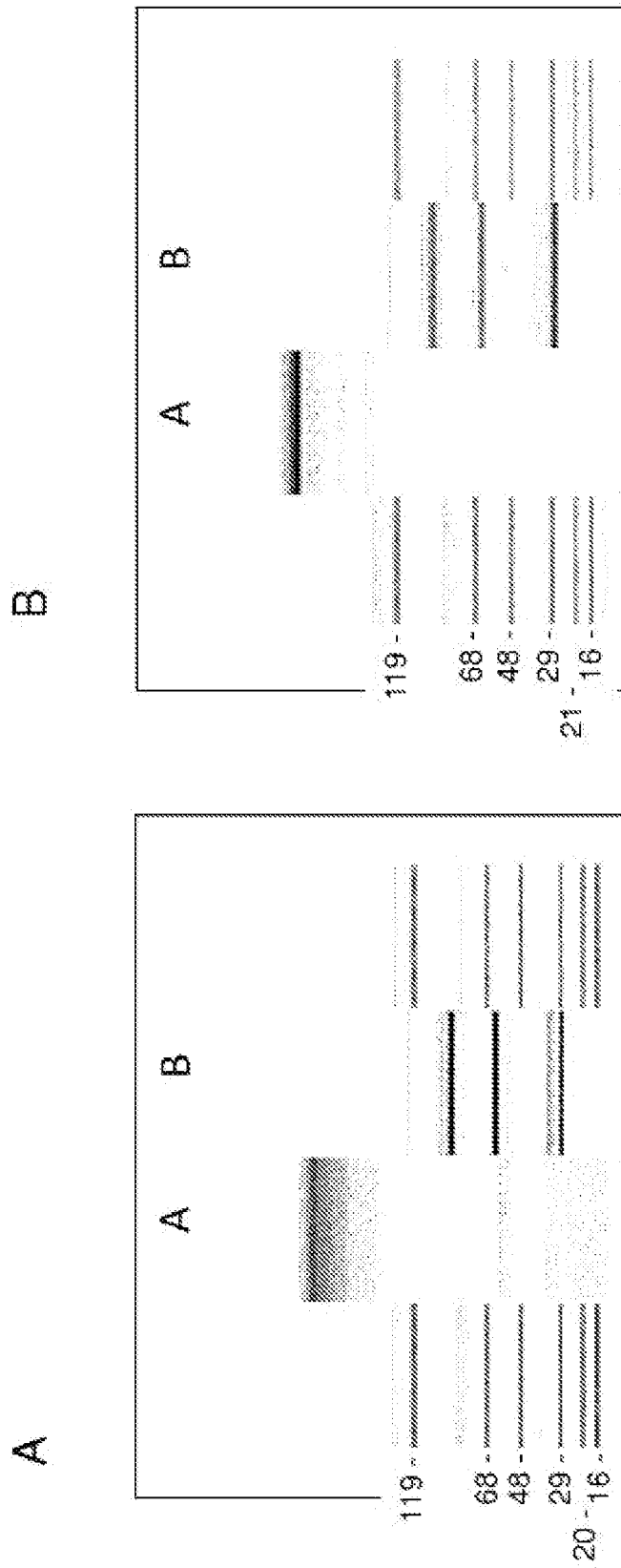


Figura 3

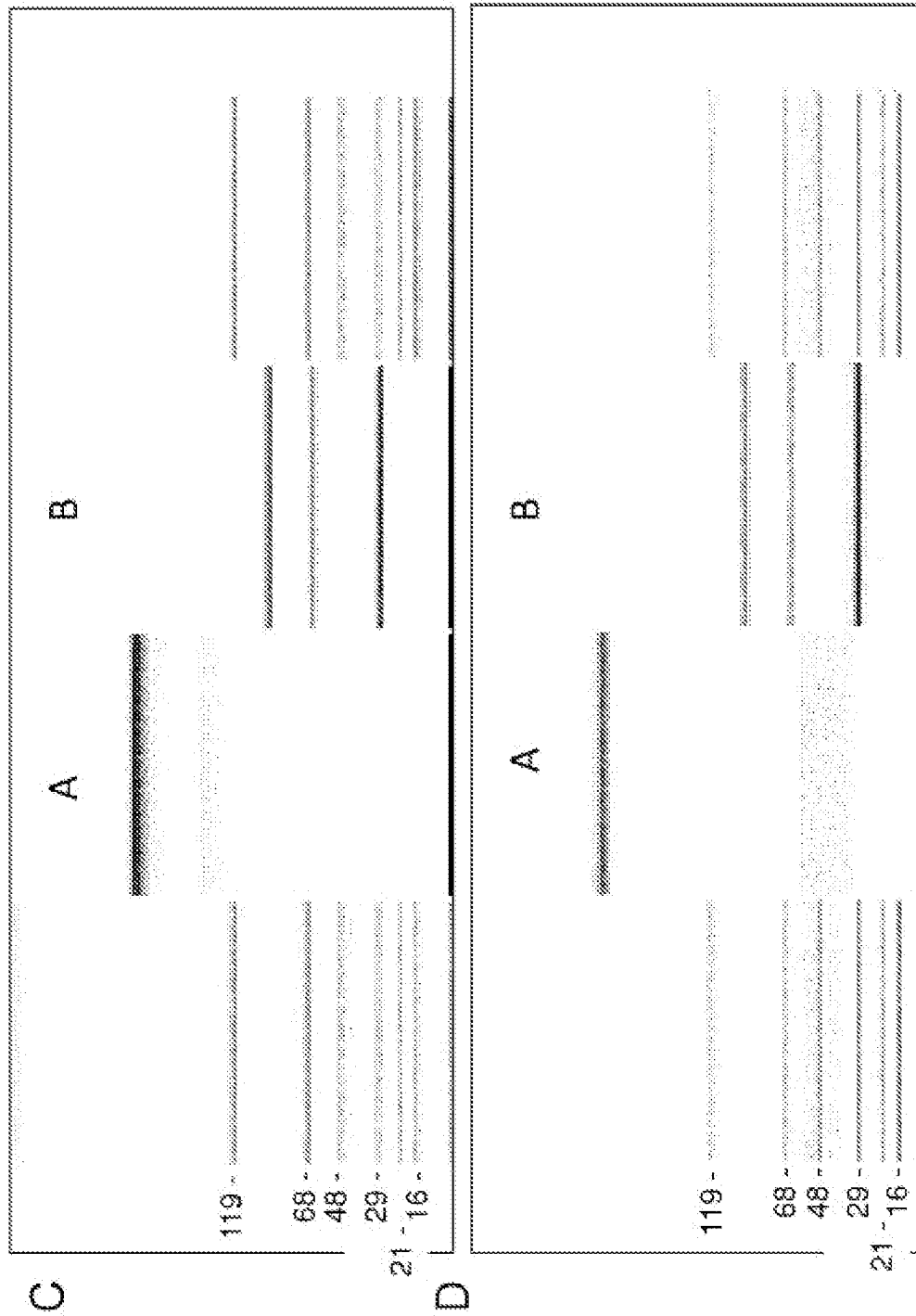


Figura 3

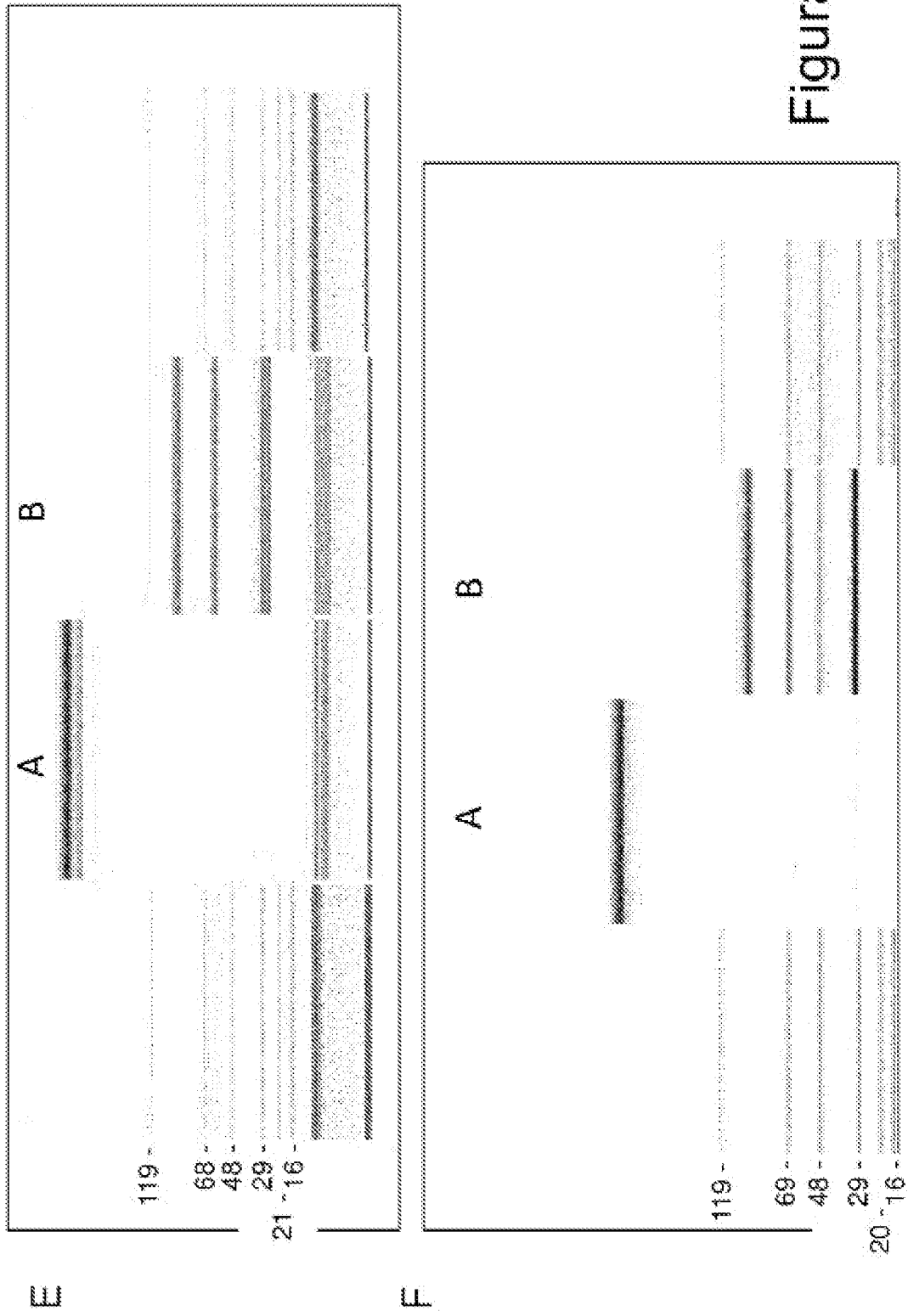


Figura 3

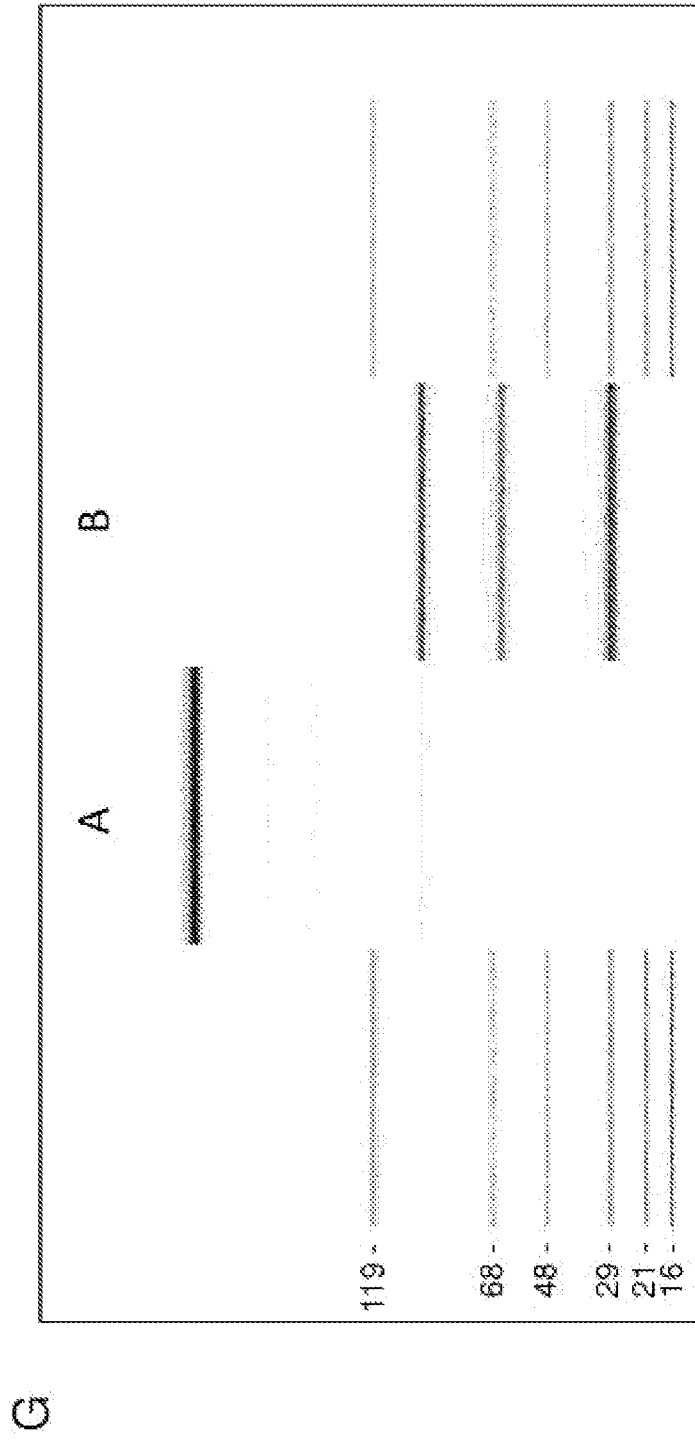


Figura 3

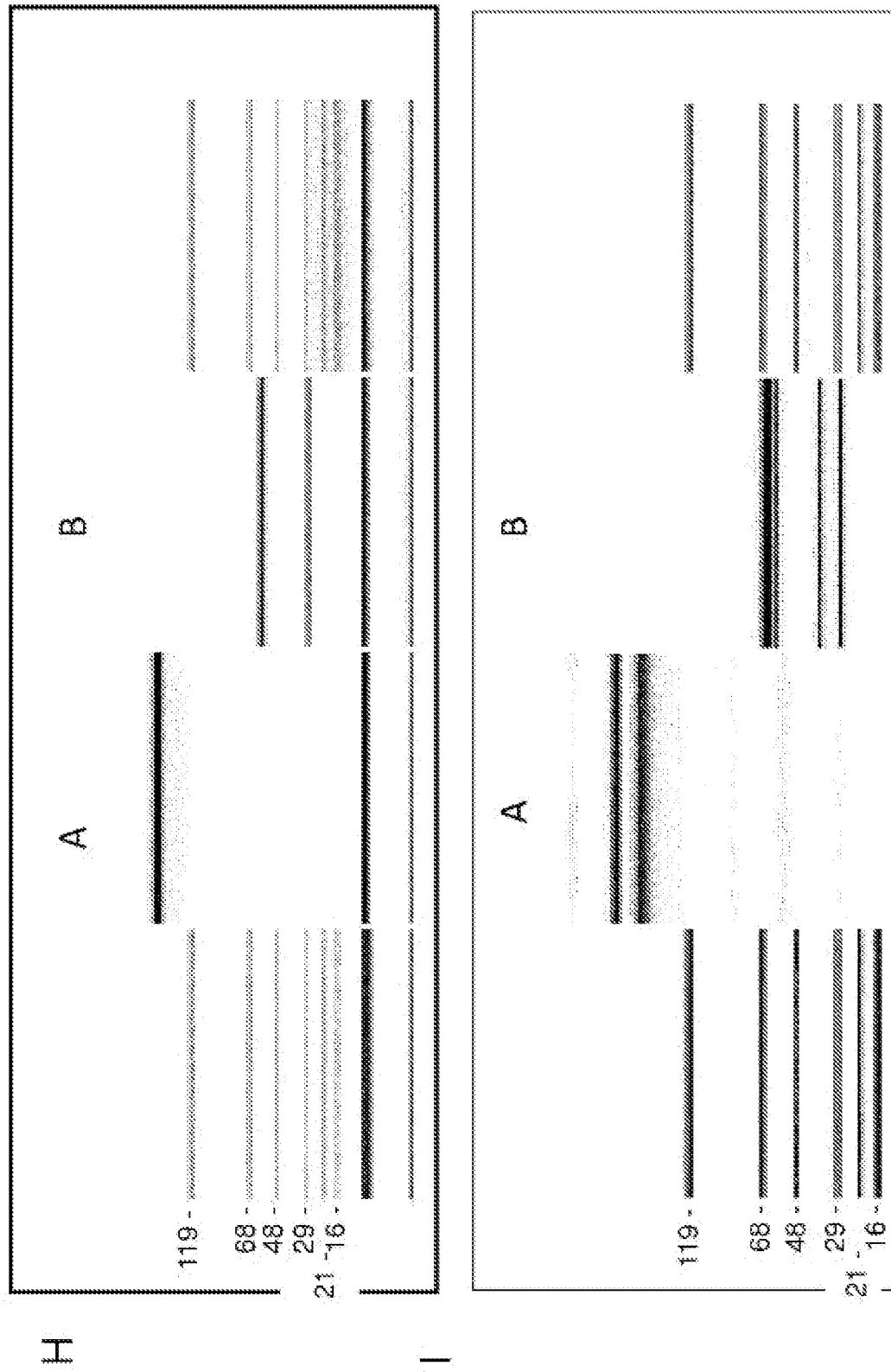


Figura 3

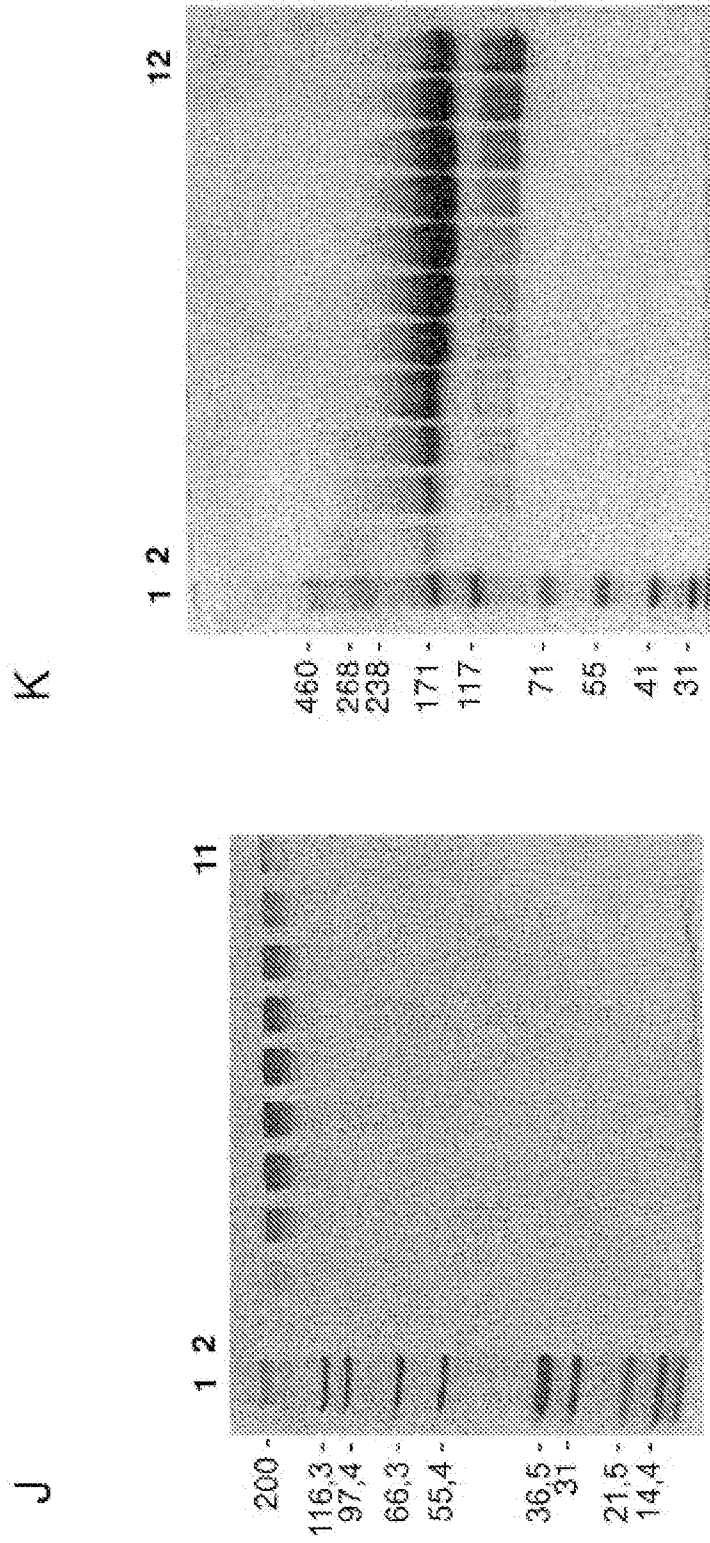


Figura 3

L

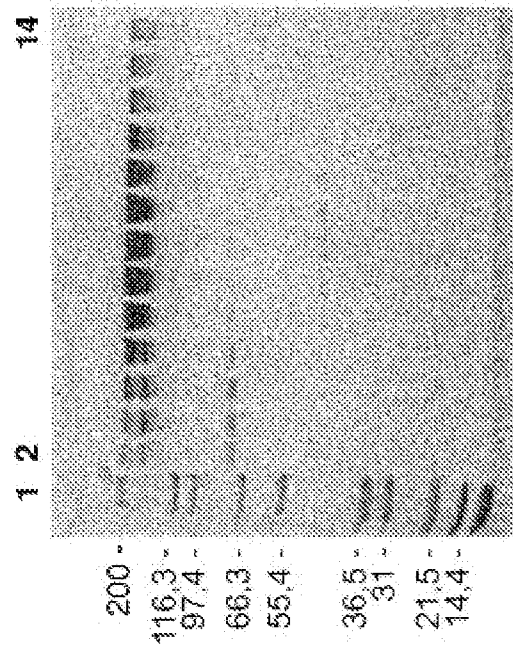


Figura 3

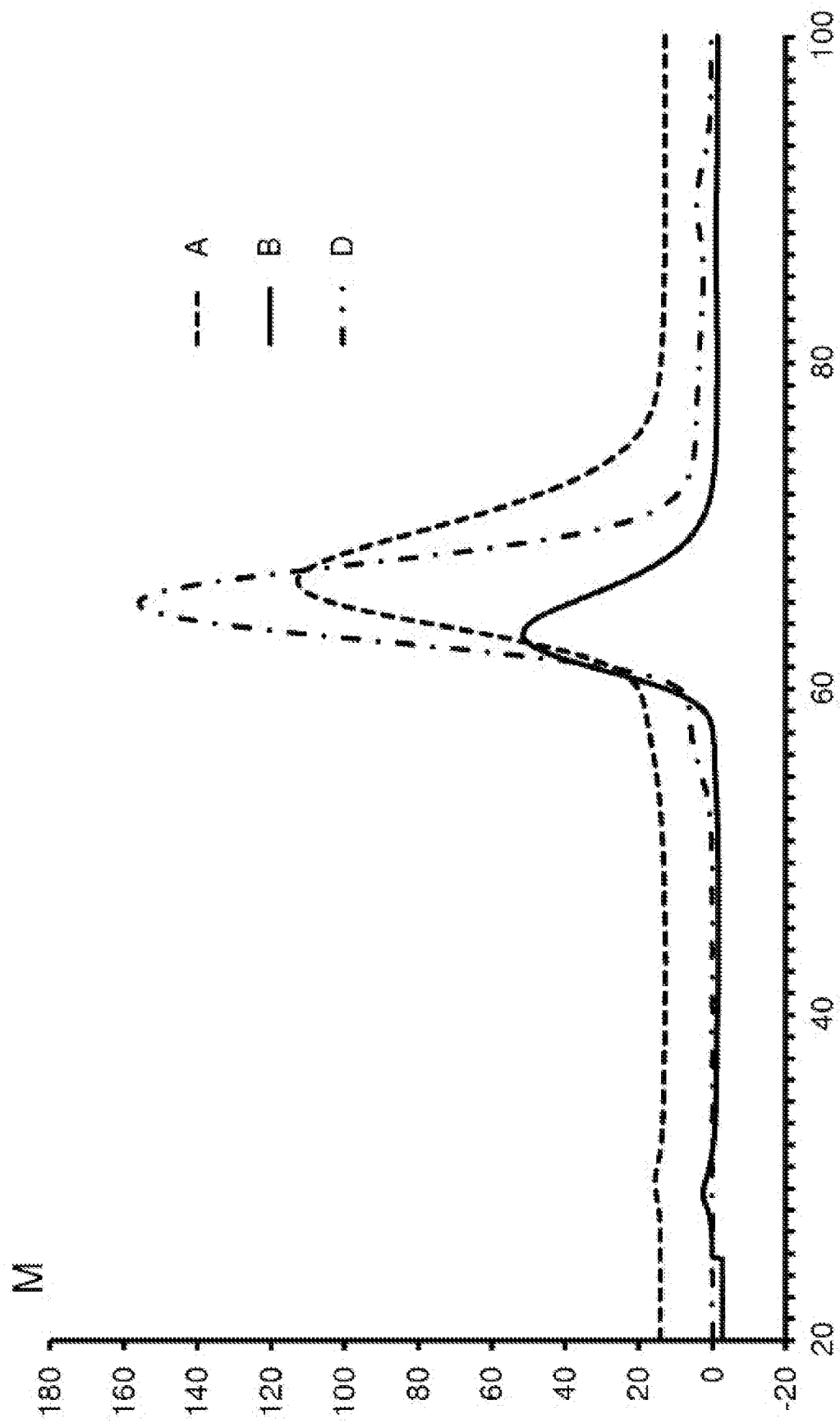


Figura 3

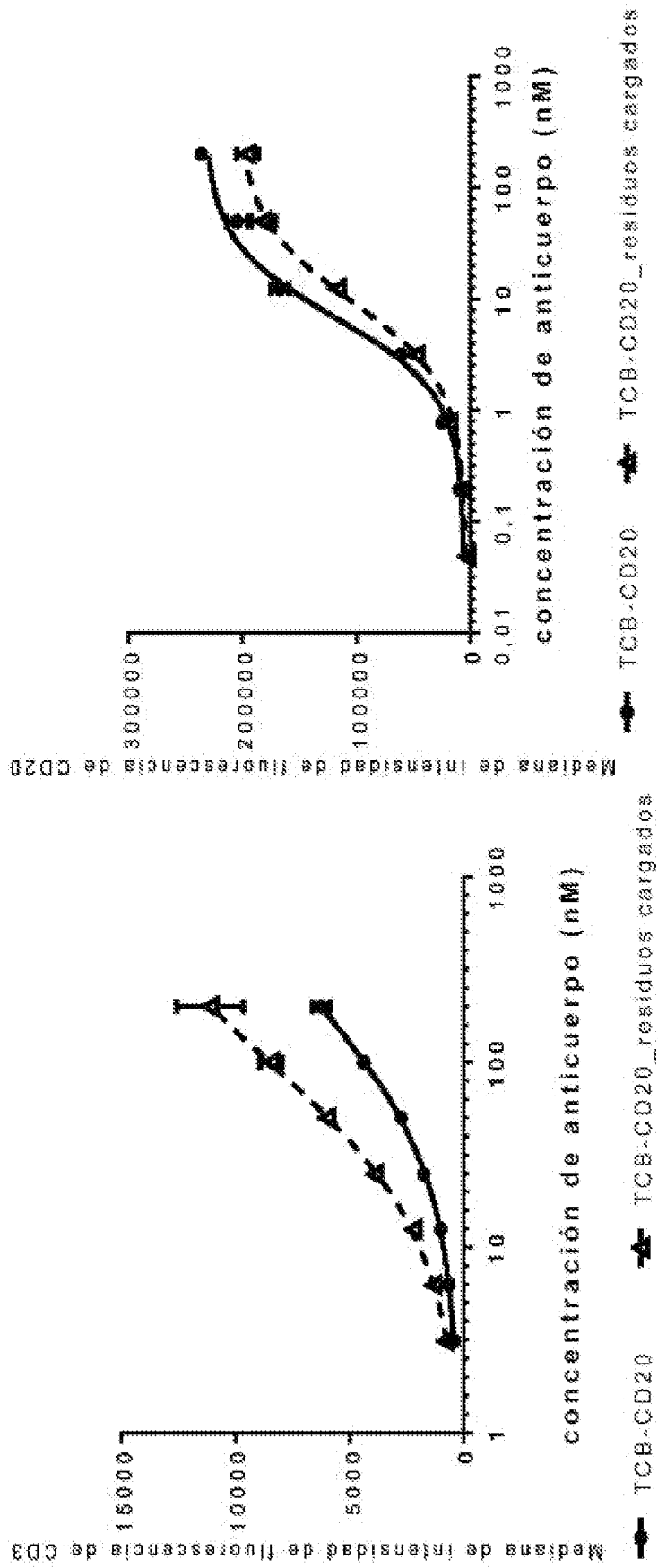


Figura 4

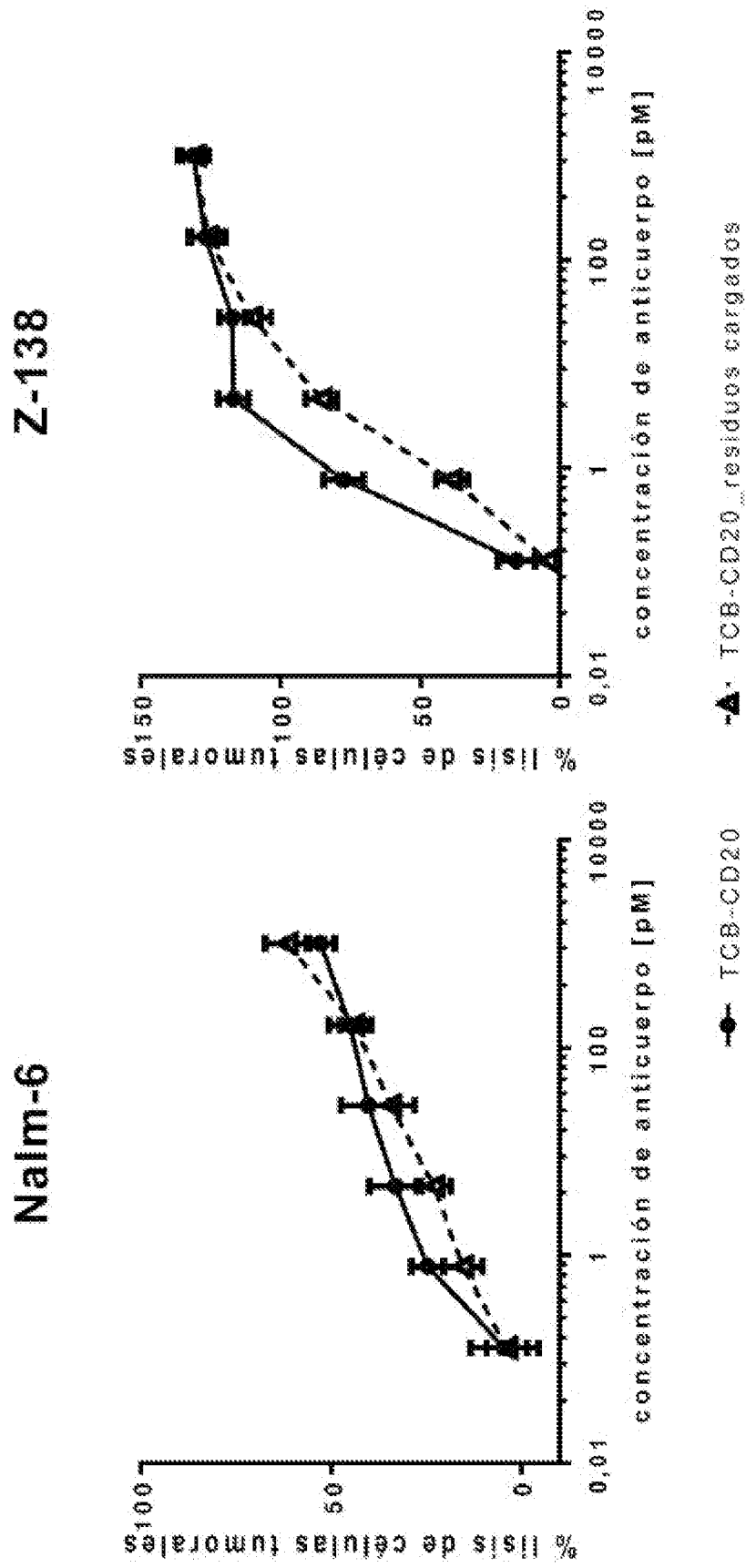
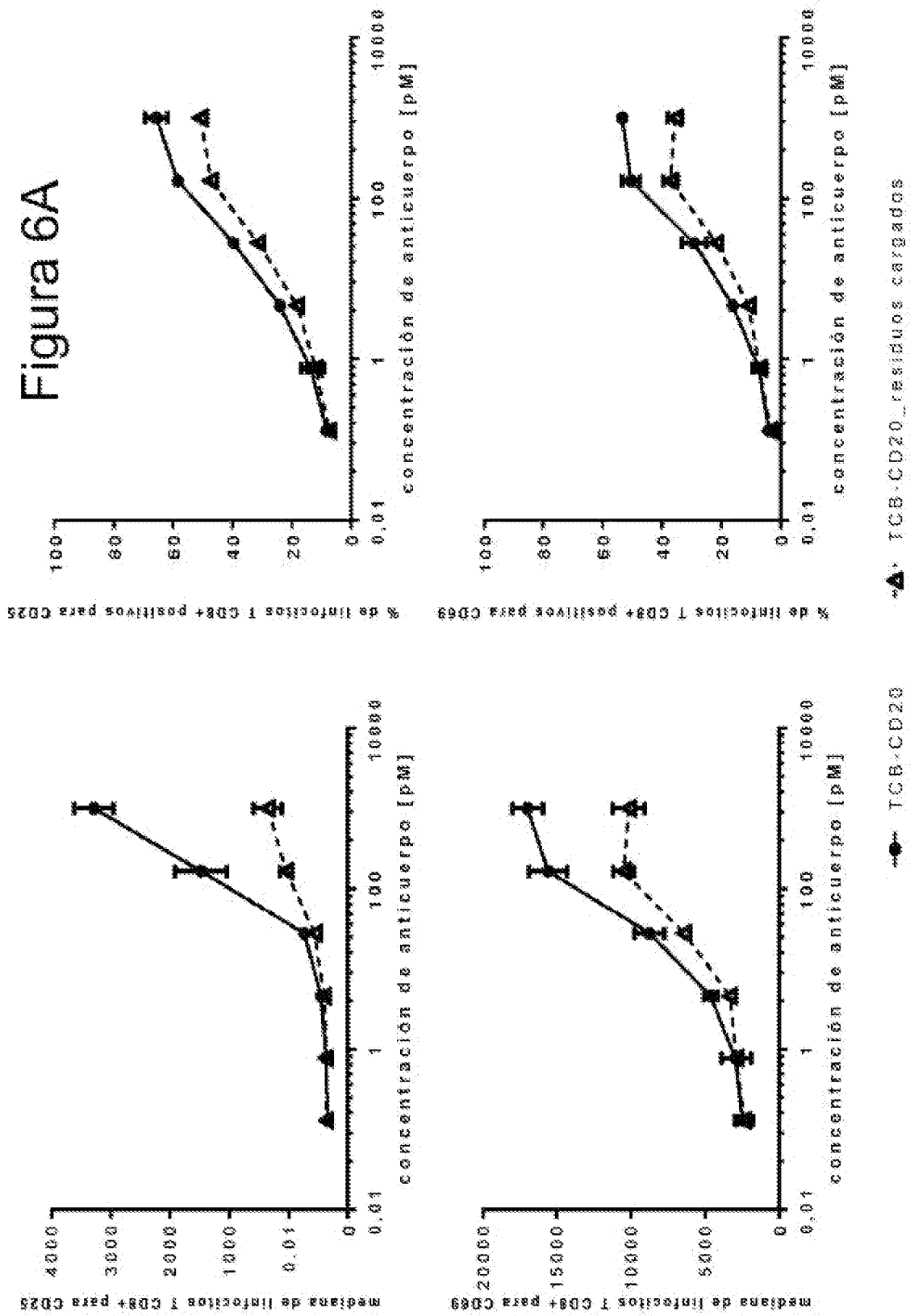
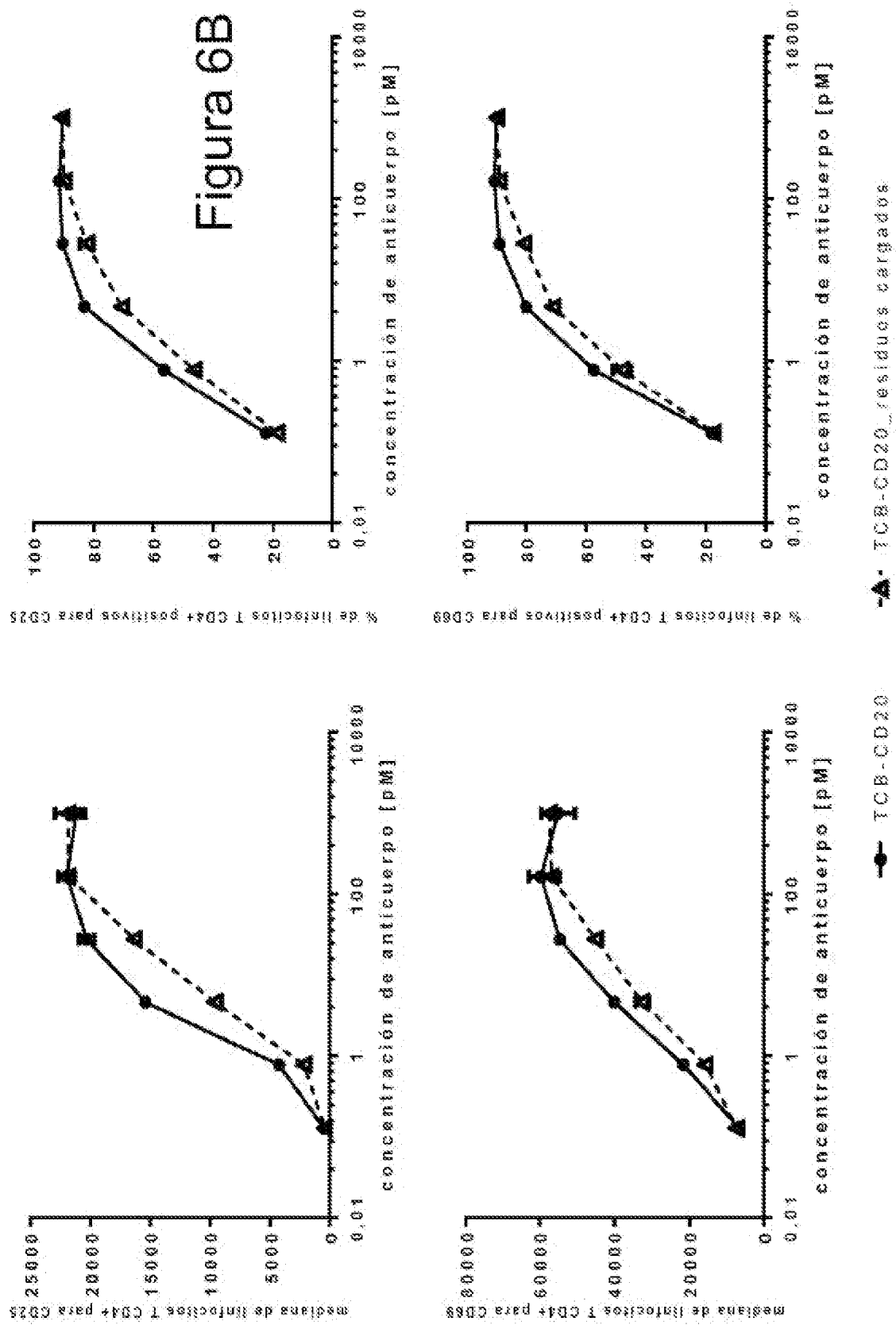
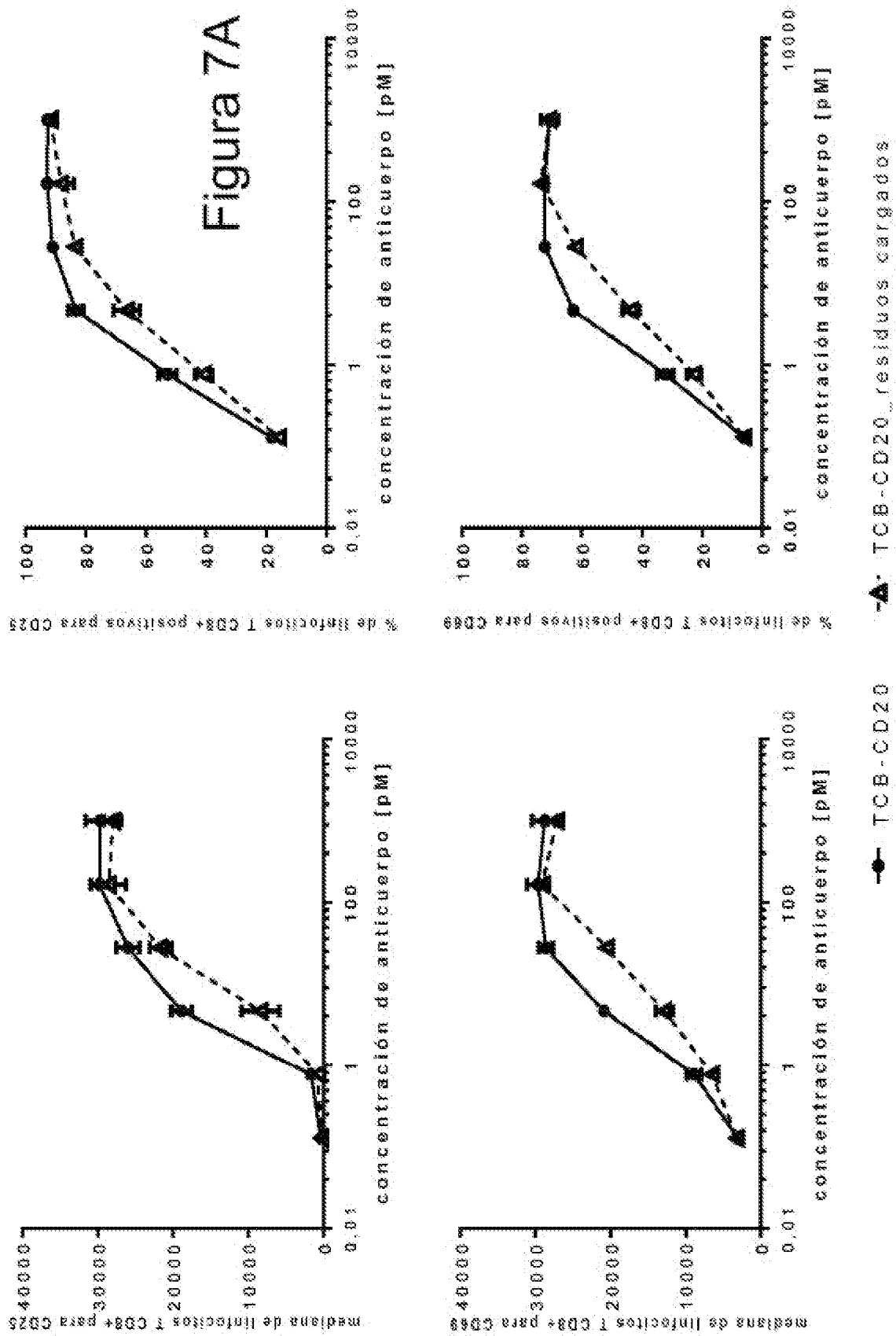


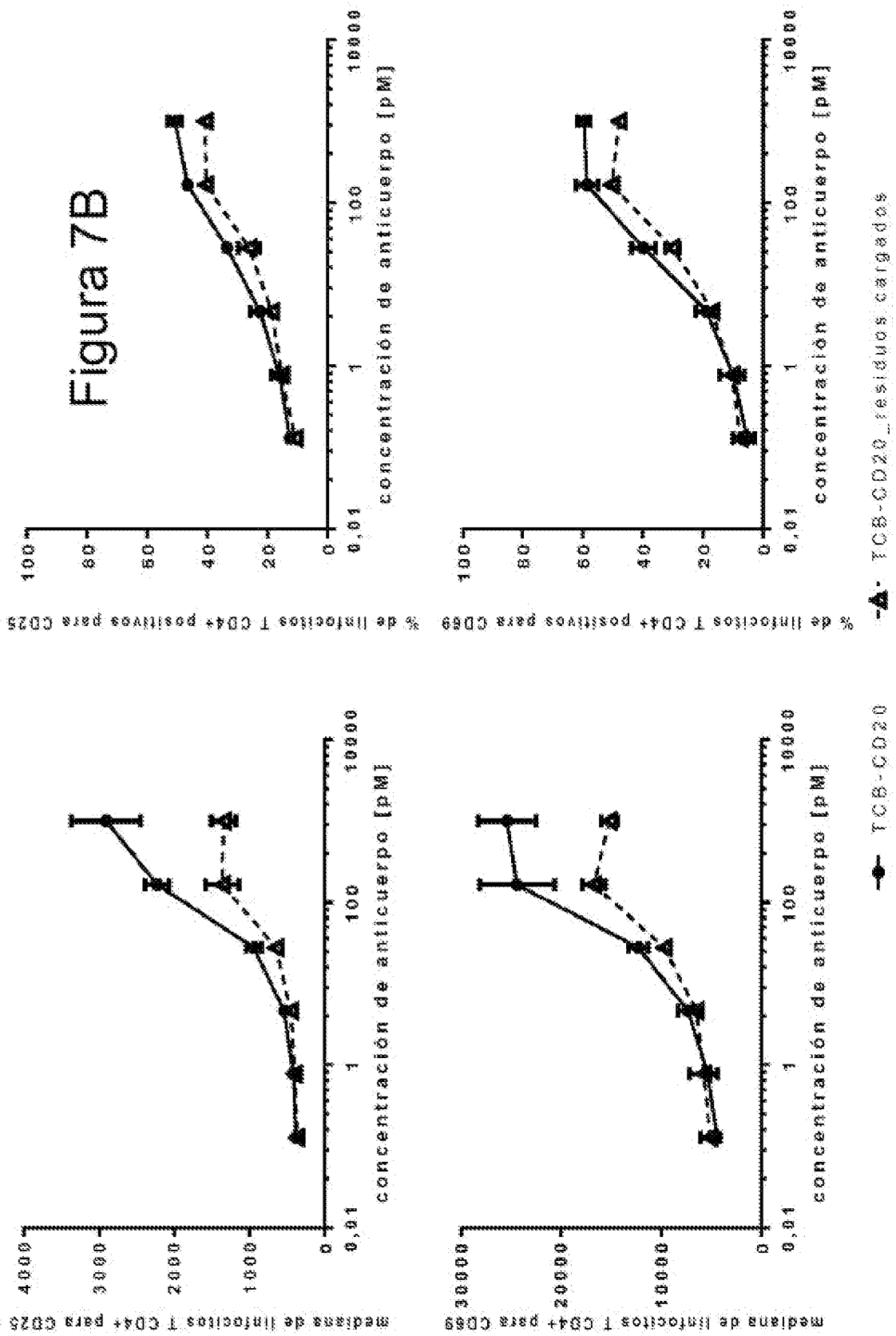
Figura 5

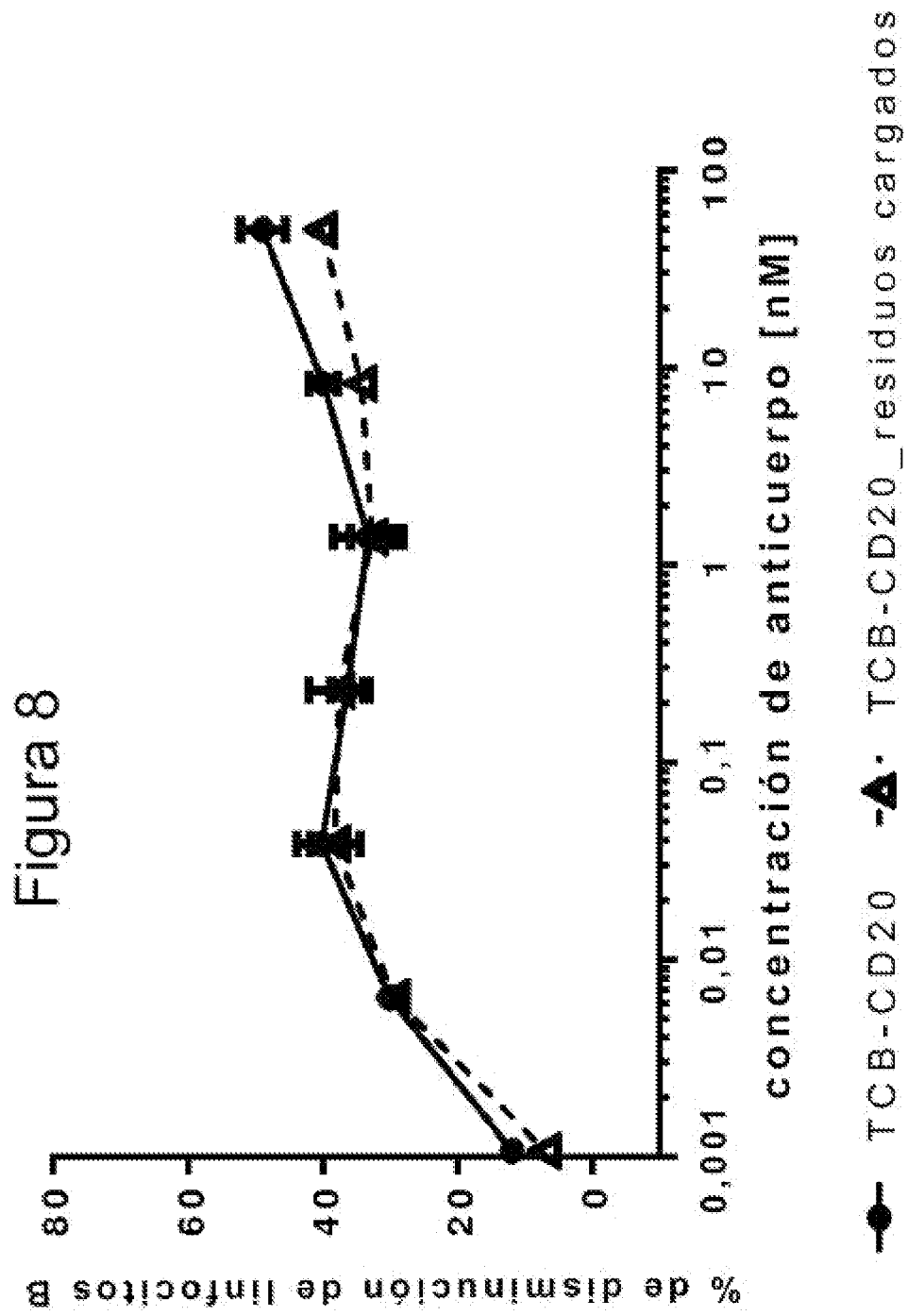
Figura 6A

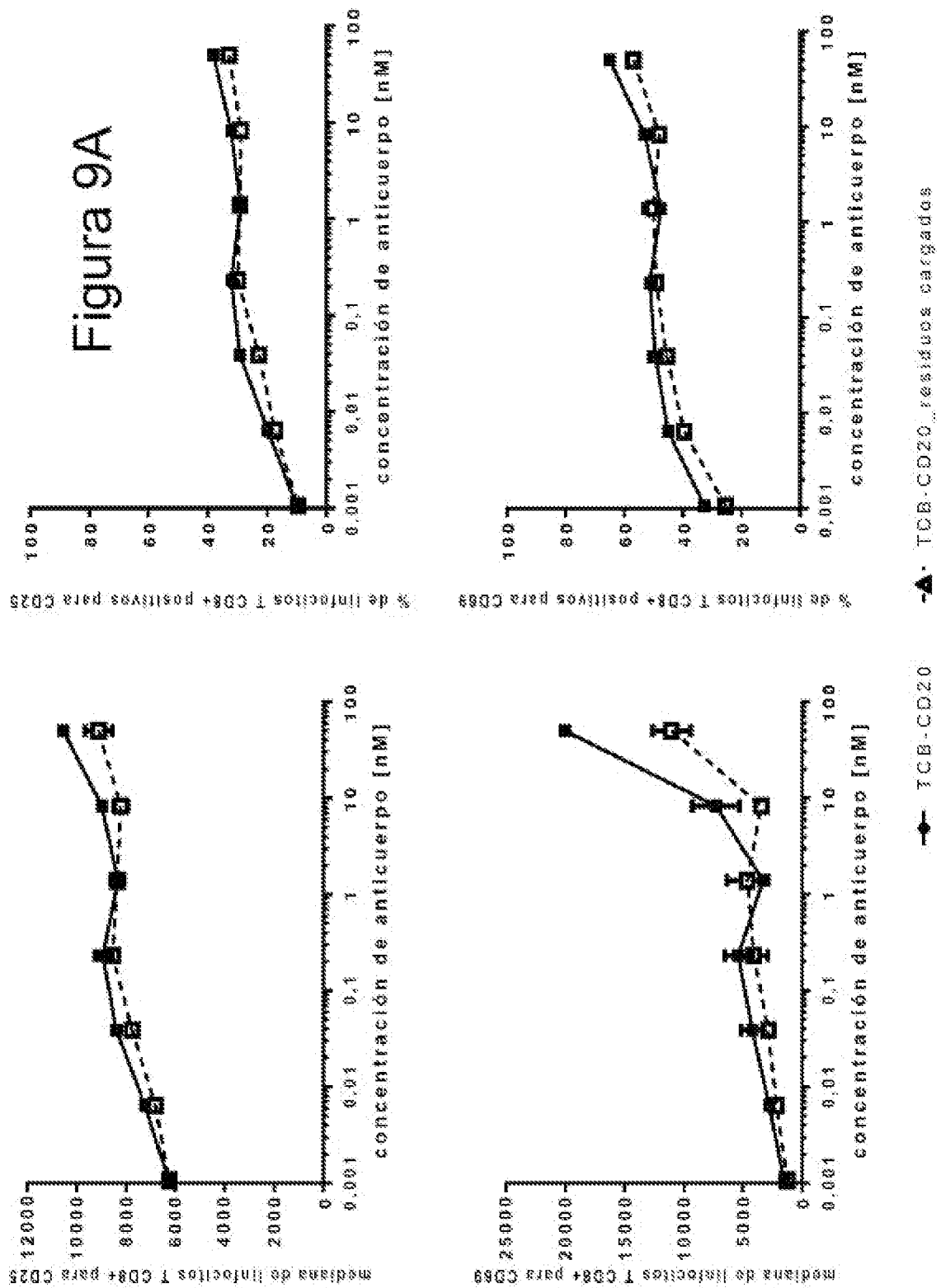












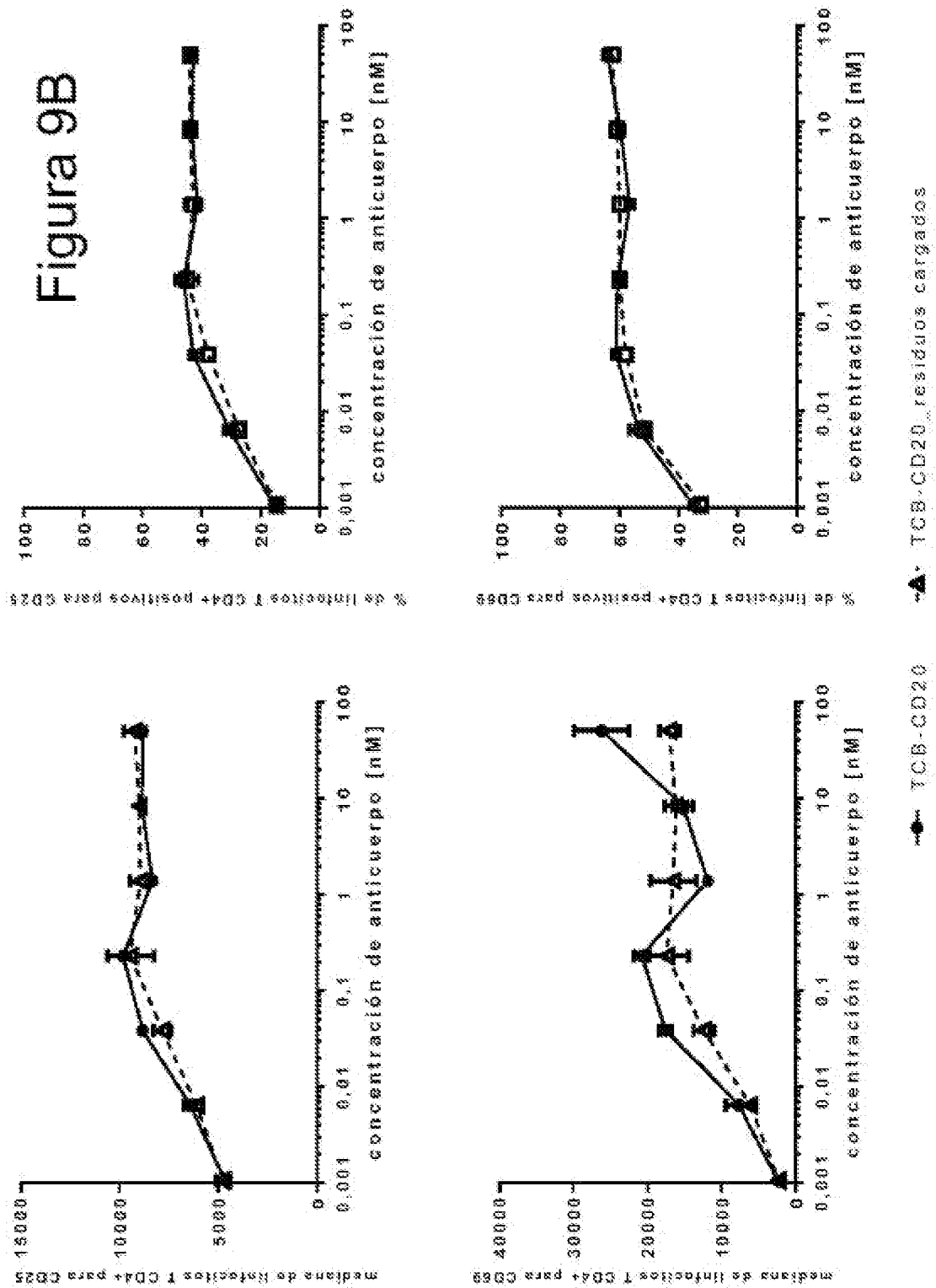
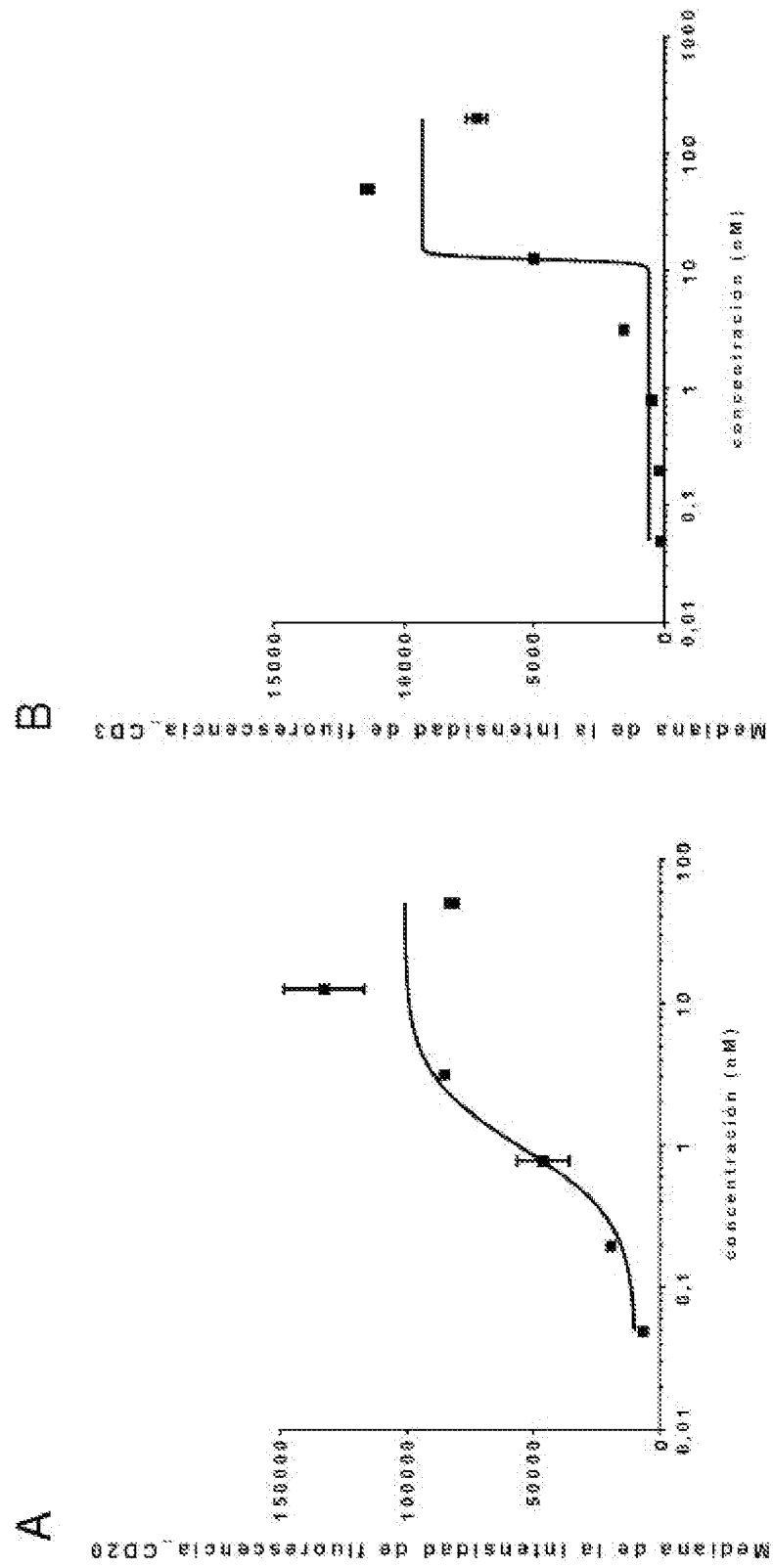


Figura 10



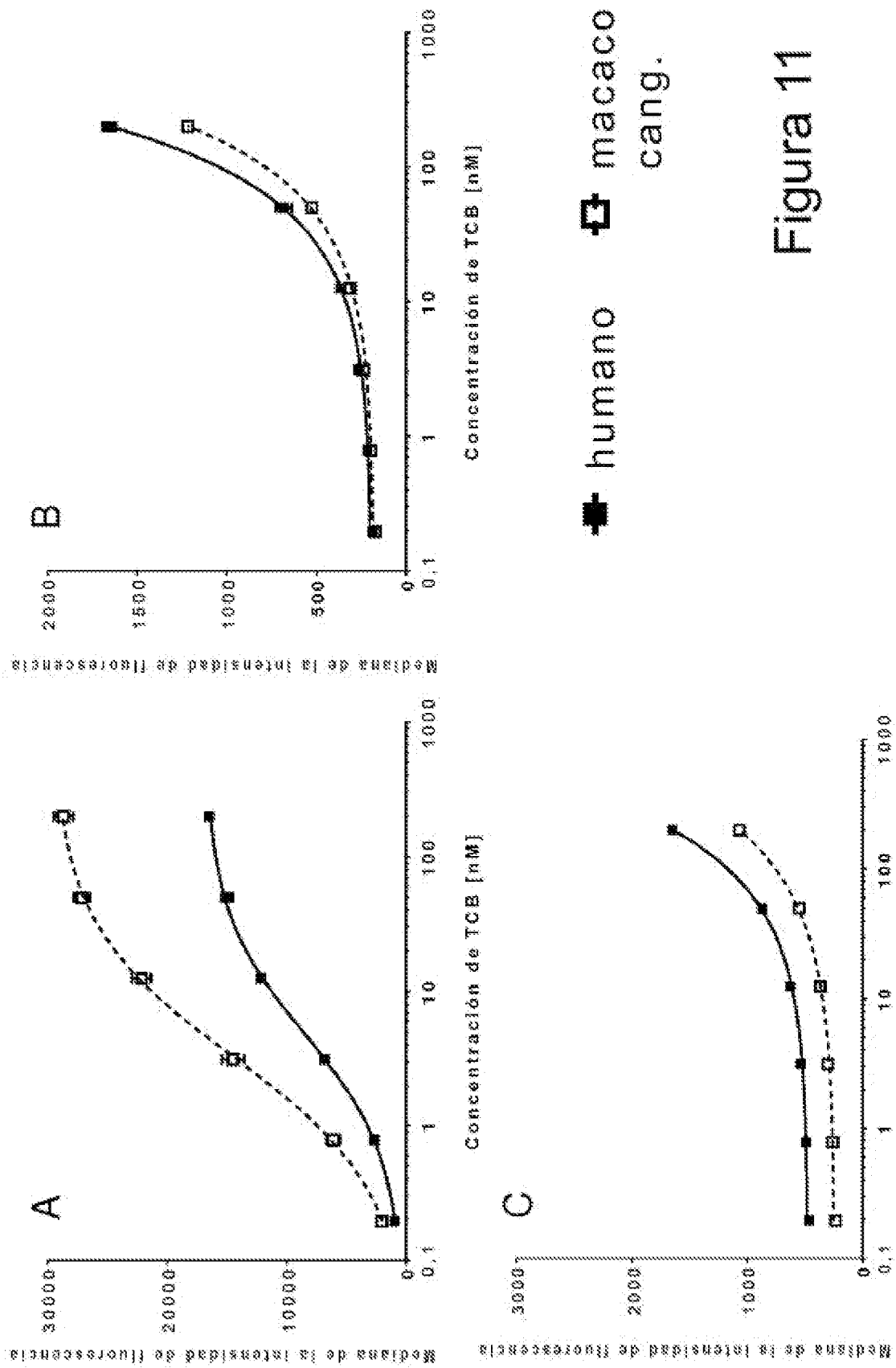


Figura 11

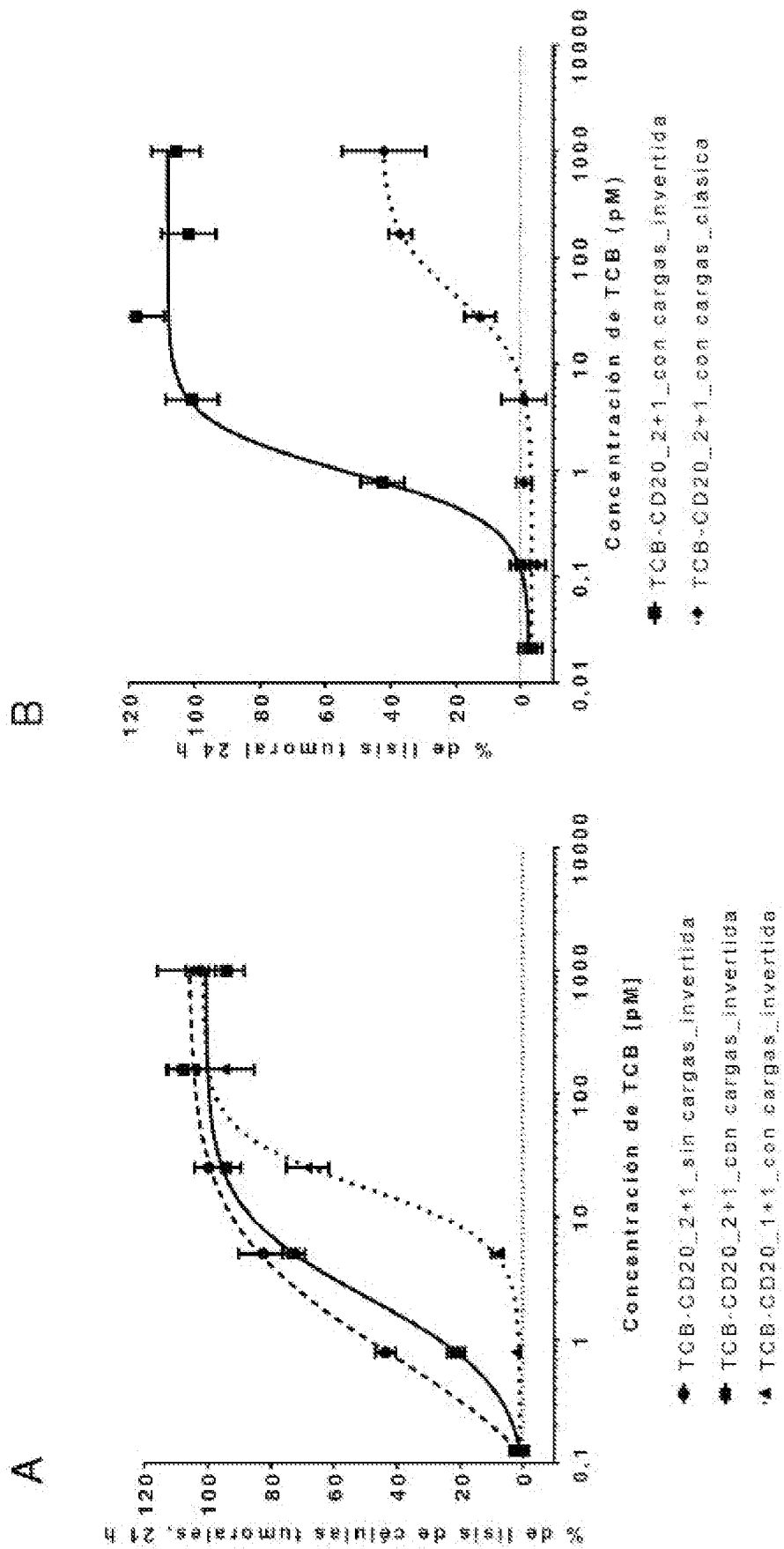


Figura 12

Figura 13

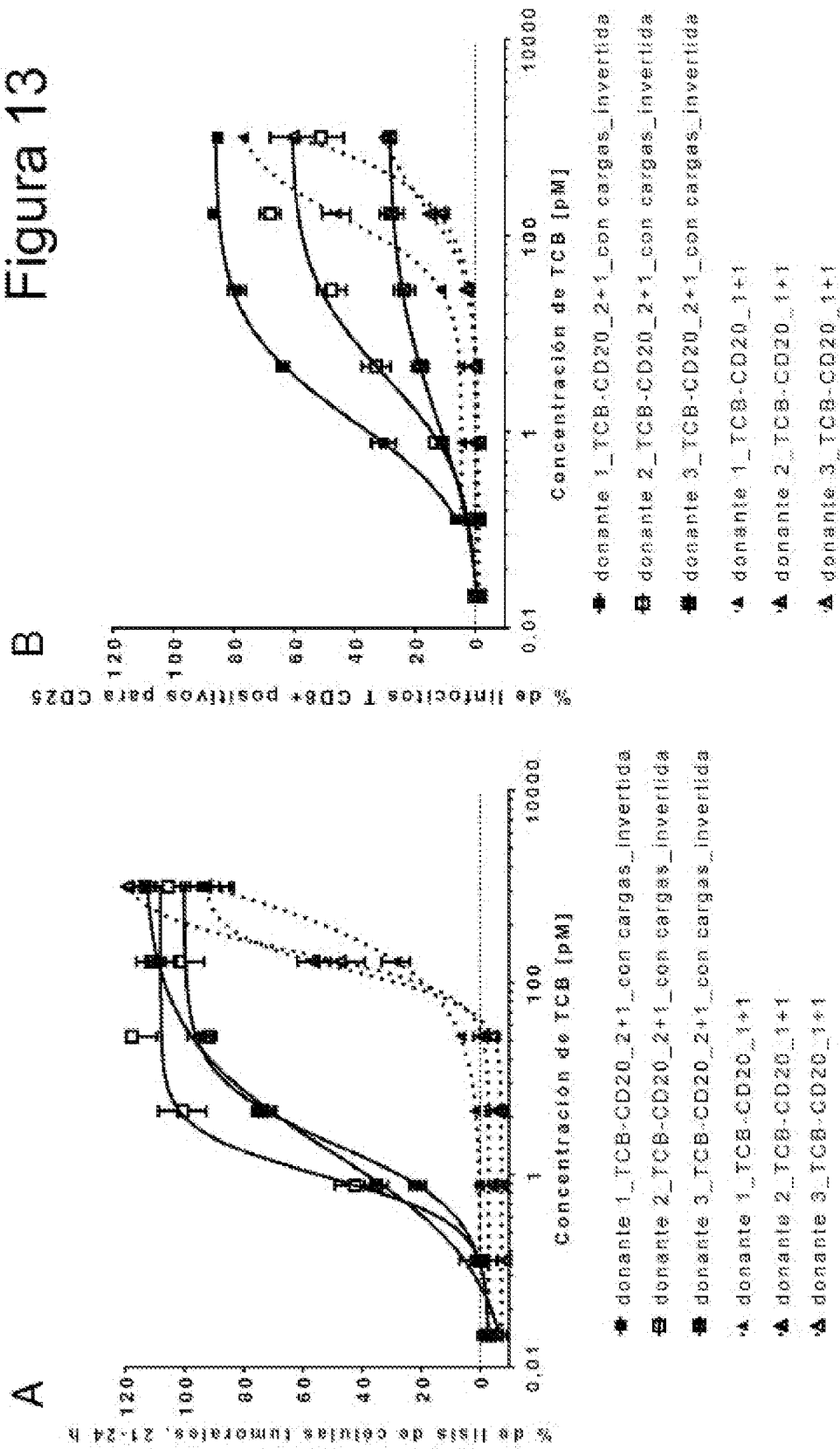
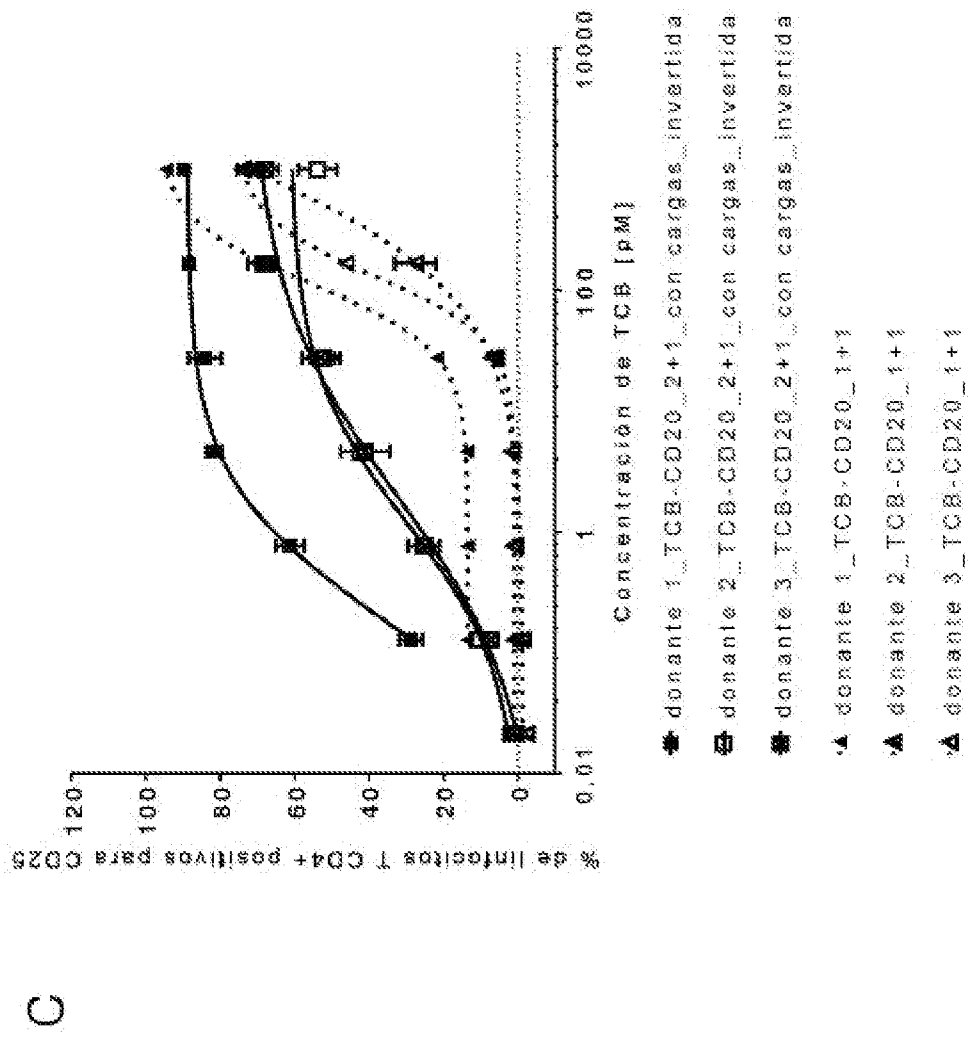
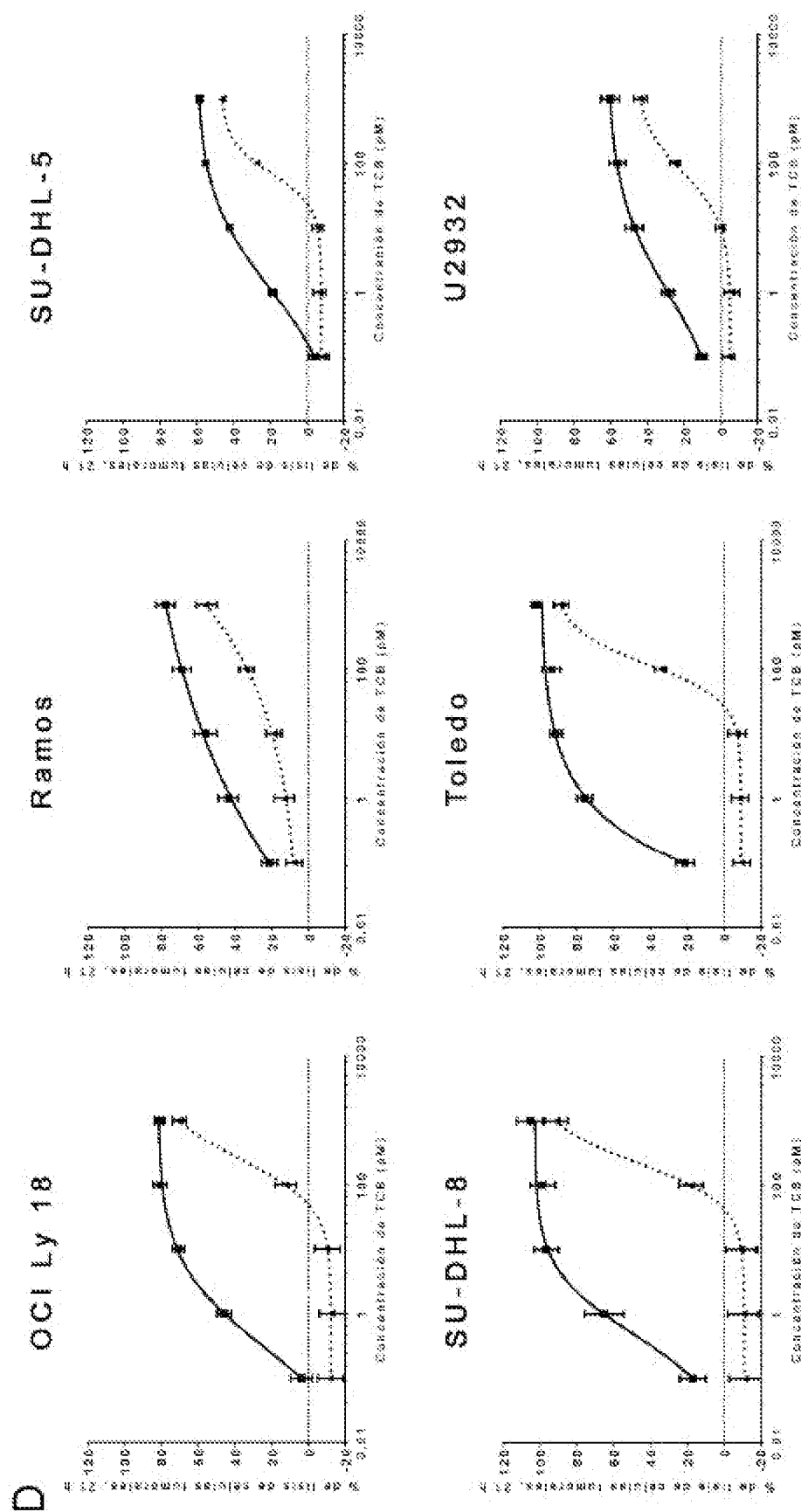


Figura 13





■ TCB-CD20_2+1_con cargas_invertida

▲ TCB-CD20_1+1

Figura 13

Figura 14

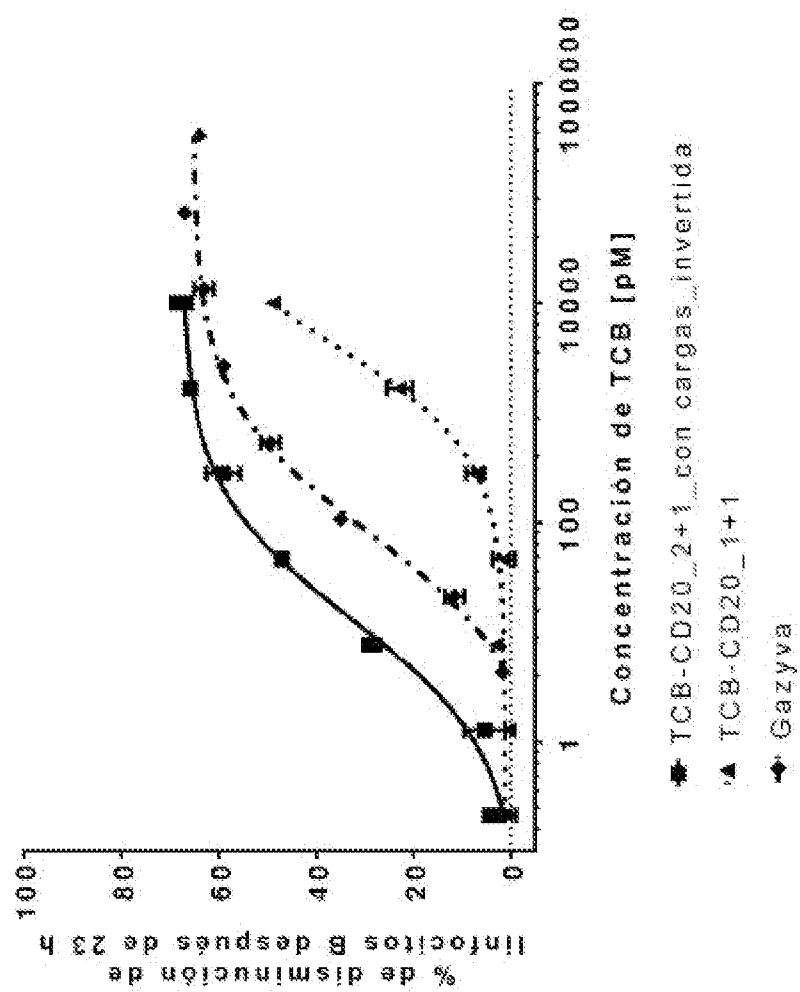
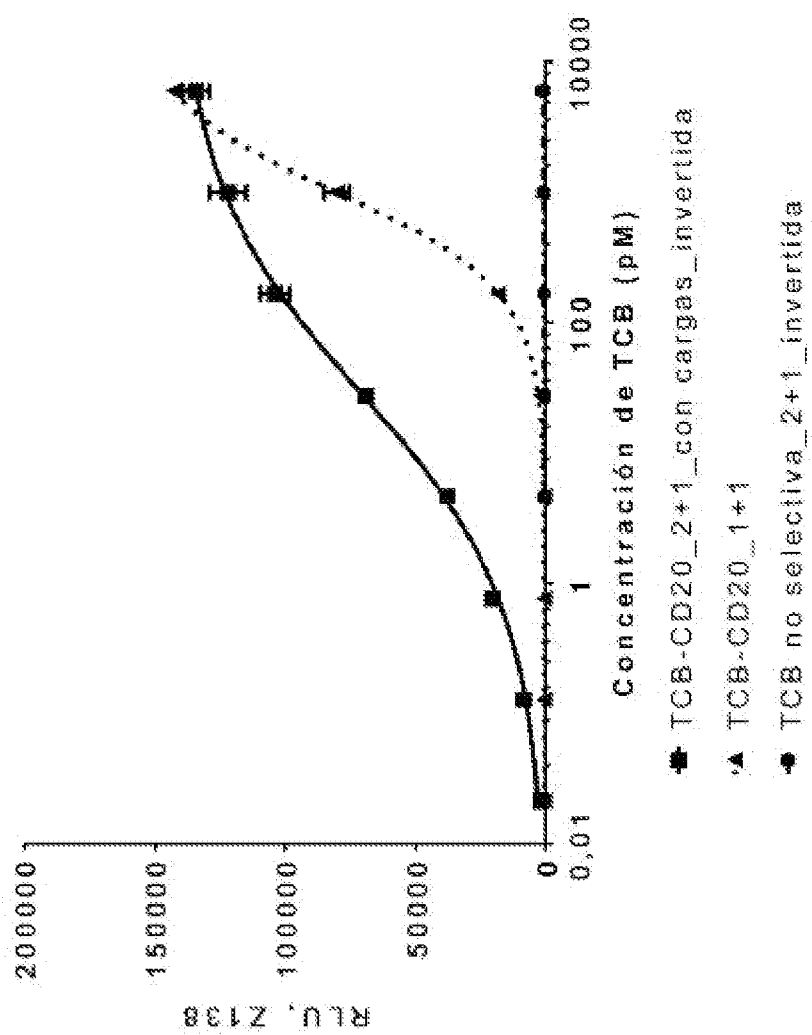


Figura 15



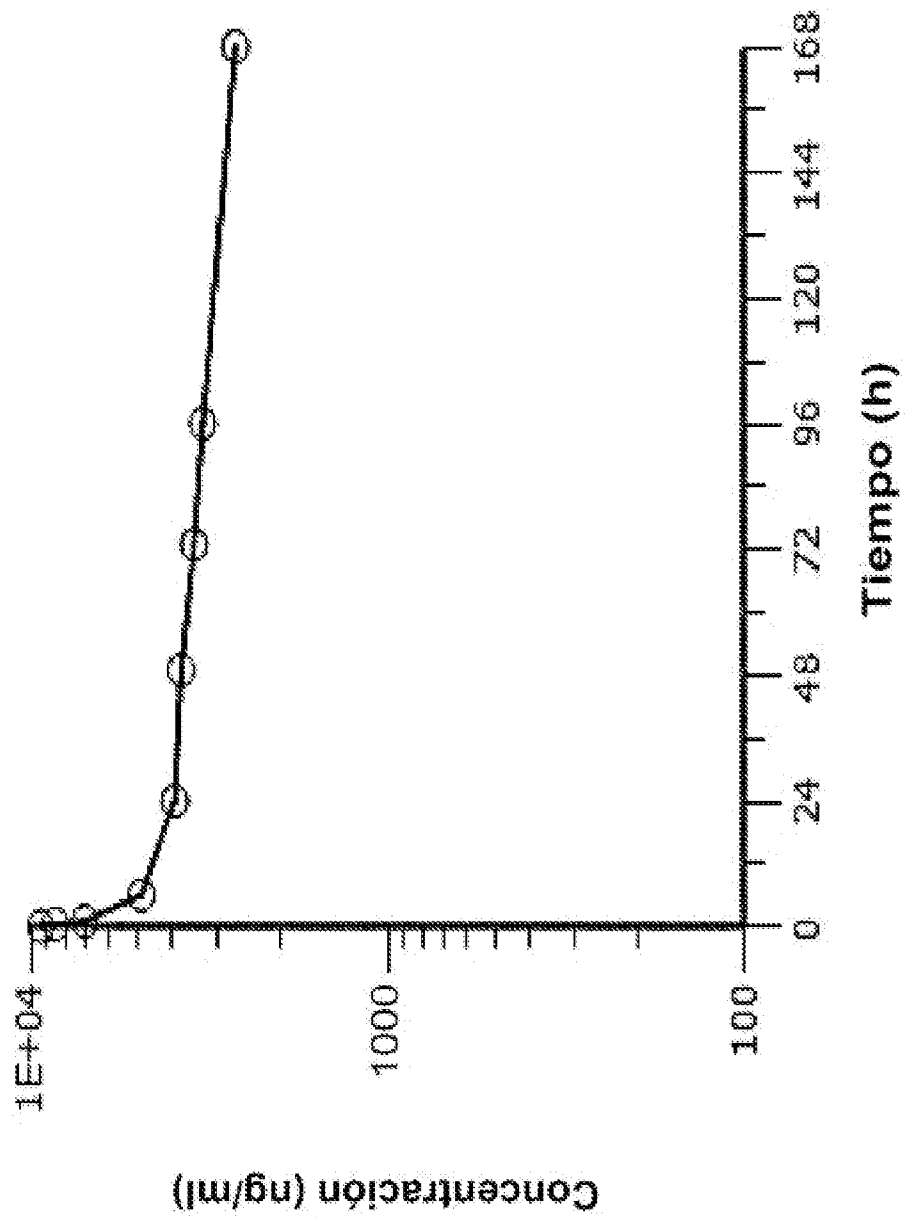


Figura 16

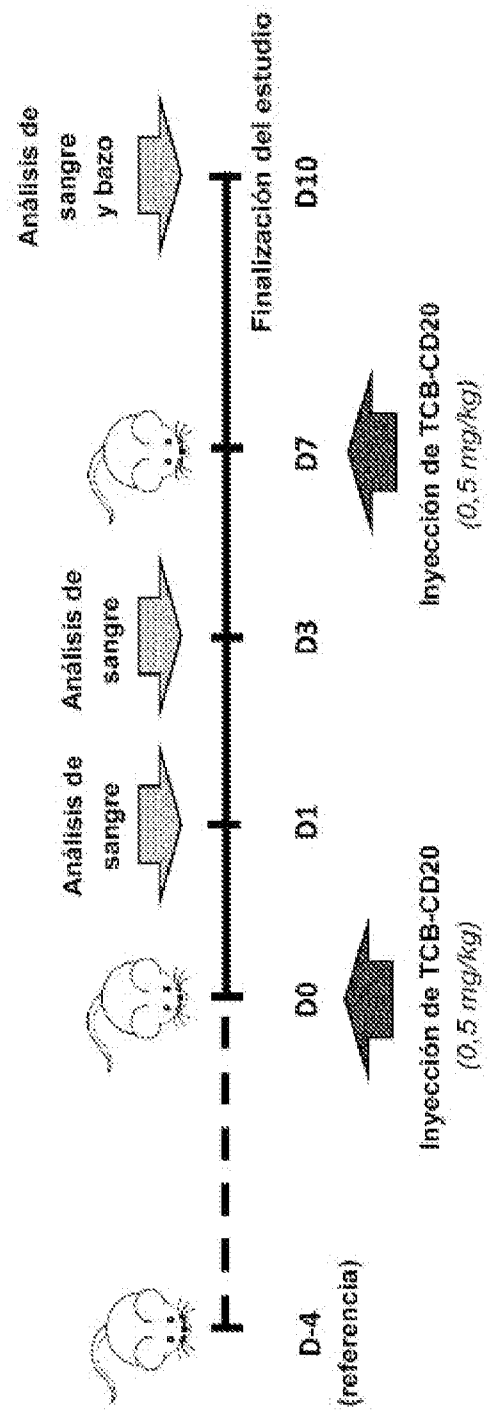


Figura 17

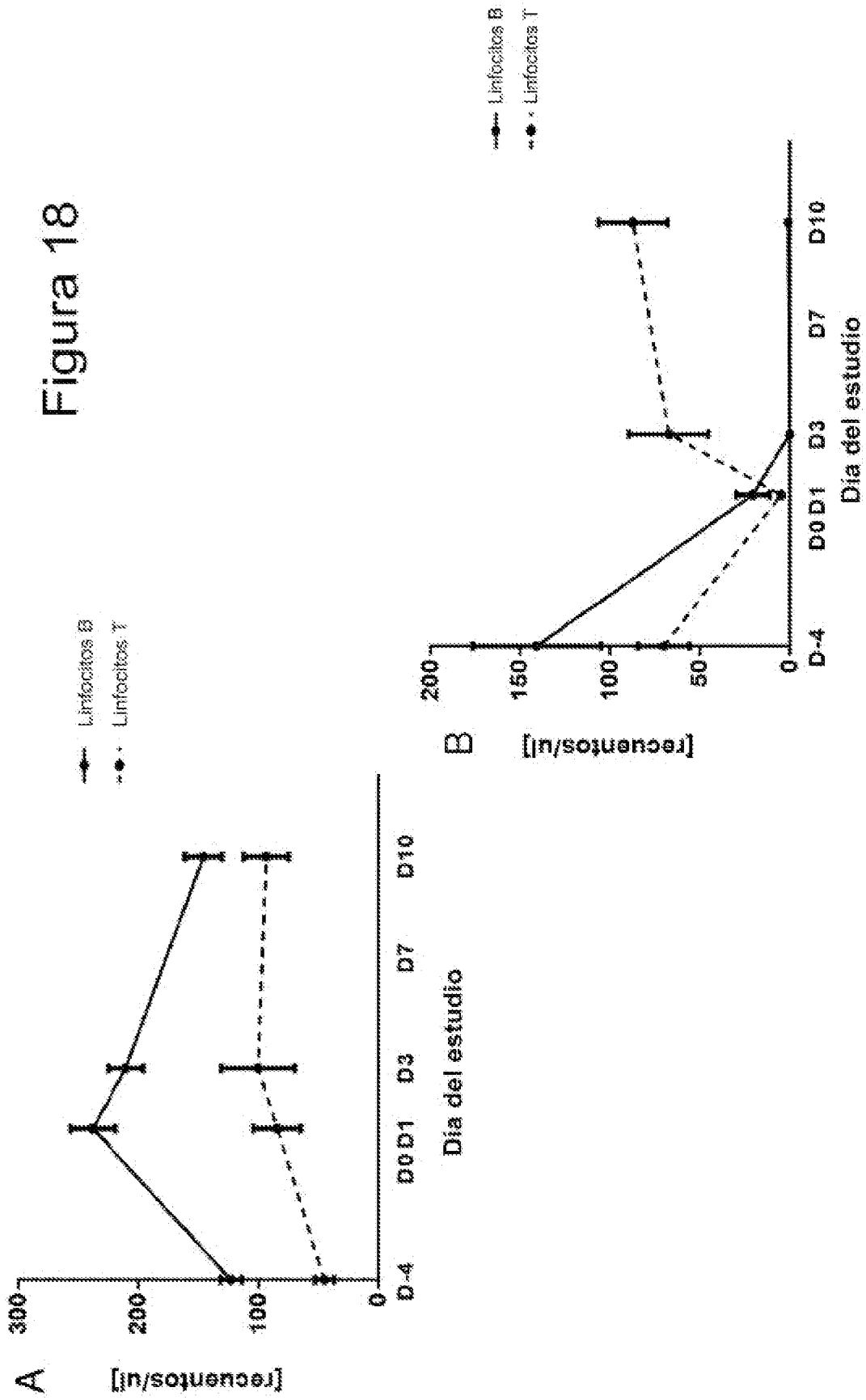


Figura 19

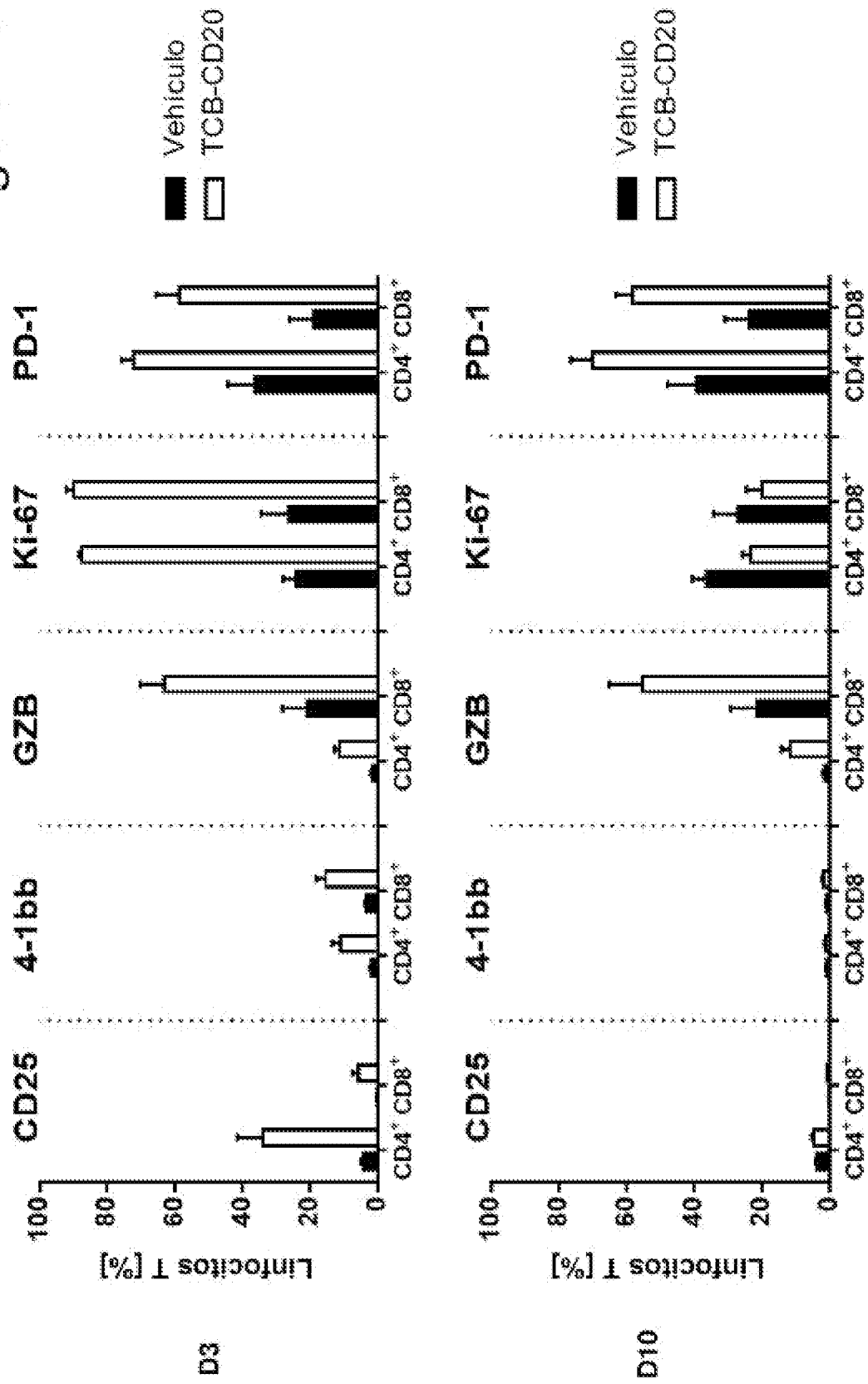


Figura 20

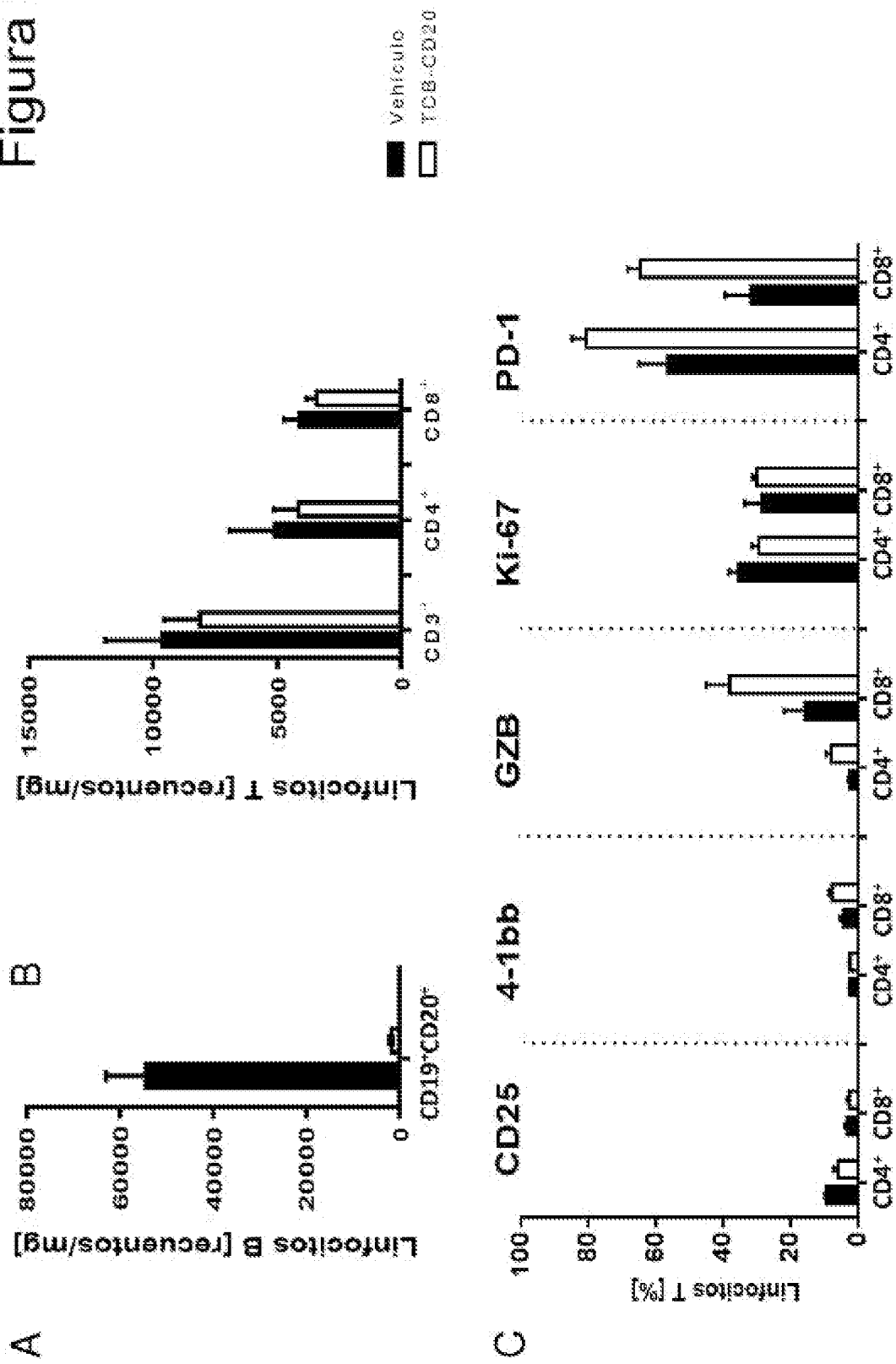
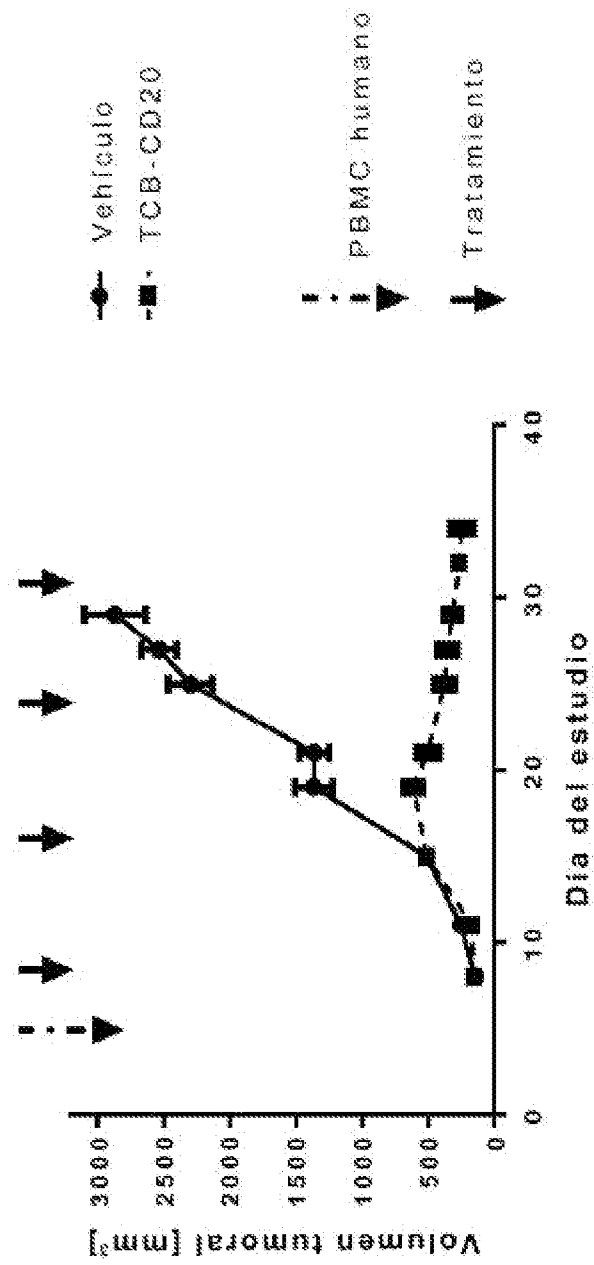


Figura 21



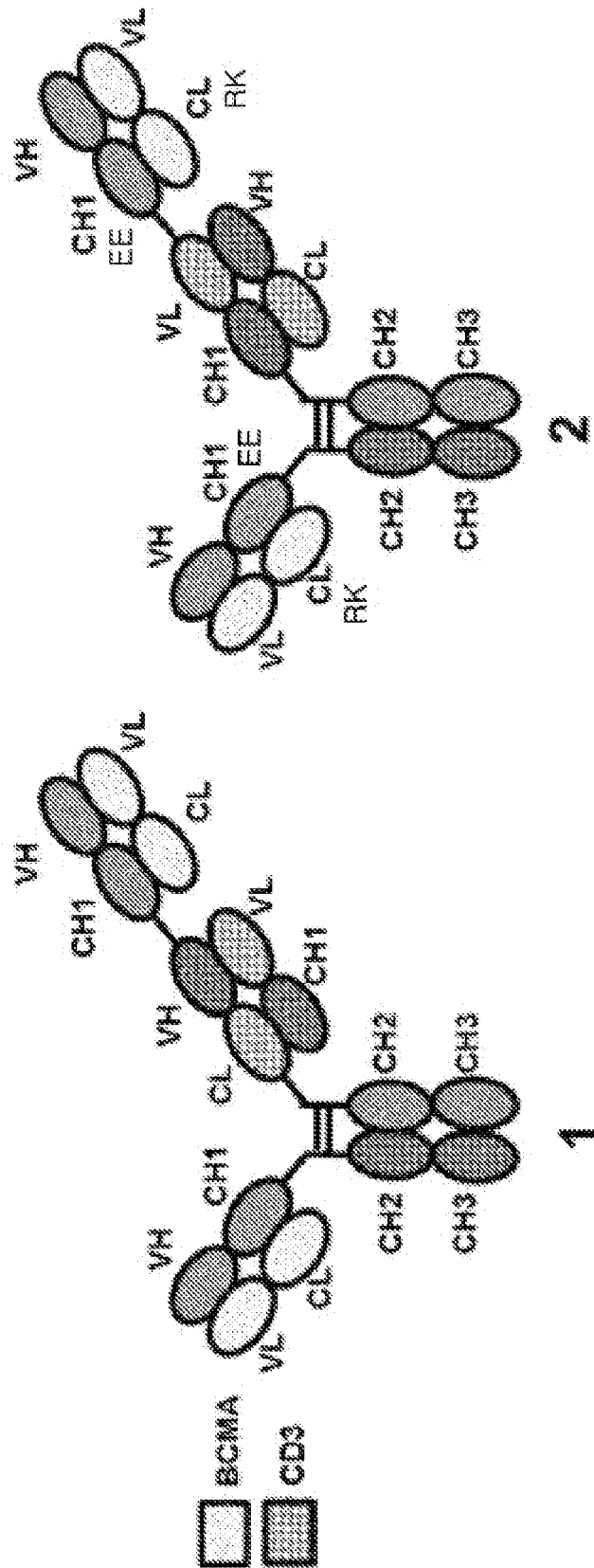


Figura 22

83A10-TCB

A.

Procedimientos de pur.: PA + SEC

Pureza: <30 %

Rendimiento: 6,7 mg/l

Cantidad: 2,7 mg

Monómero: 82,8 %

Tamaño [kDa]	% de pureza
28,78	0,79
89,65	1,20
154,36	22,53
165,88	3,52
172,58	4,23
180,85	16,81
188,67	25,19
198,86	26,52

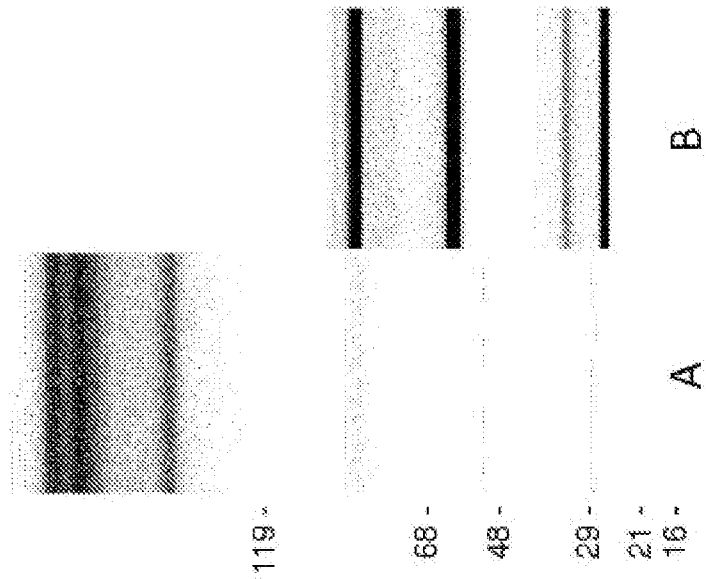


Figura 23

B. 83A10-TCB

Procedimientos de pur.: PA + SEC +
dEX + re-SEC
Pureza: 93,4 %
Rendimiento: 0,42 mg/l
Cantidad: 0,168 mg
Monómero: 82,8 %

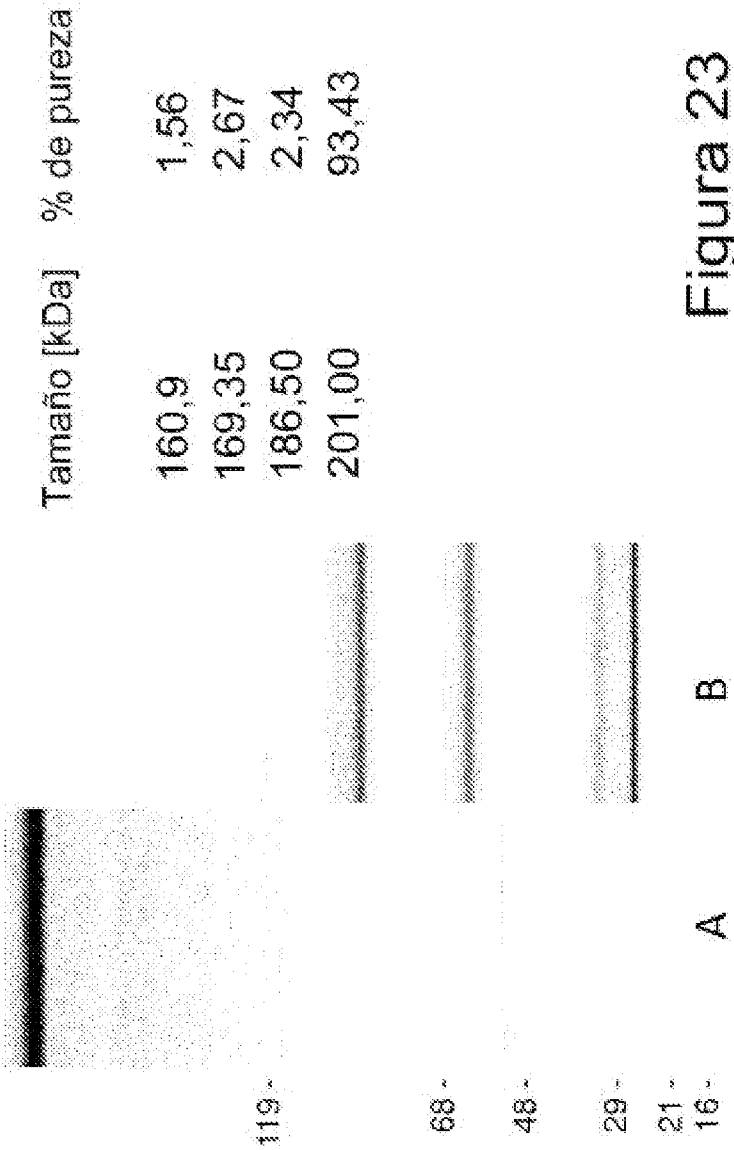


Figura 23

C. 83A10-ICBCV

Procedimientos de pur.: PA + cLEX + SEC
Pureza: 95,3 %
Rendimiento: 3,3 mg/l
Cantidad: 1,3 mg
Monómero: 100 %



Figura 23

A. 83A10-TCB

Procedimientos de pur.: PA

Pureza: 61,3 %

Rendimiento: 26,2 mg/l

Cantidad: 24,3 mg

Monómero: 63,7 %

CL-EM: n.d.

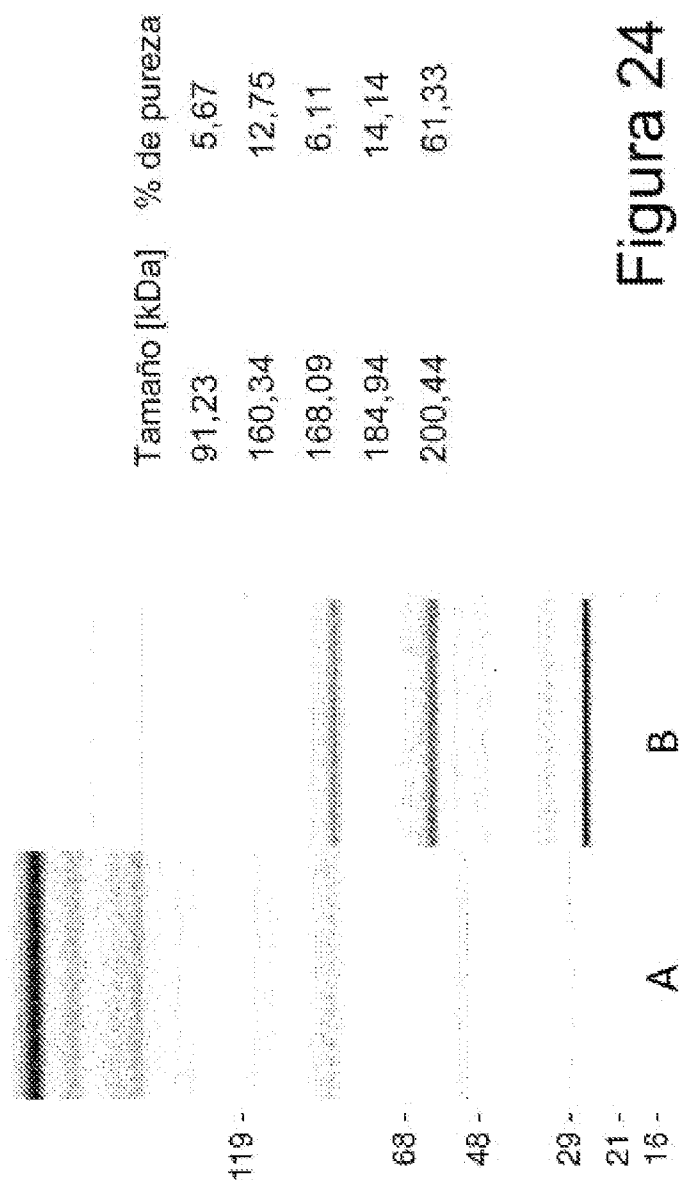


Figura 24

B. 83A10-TCBcy

Procedimientos de pur.: PA
Pureza: 81,0 %
Rendimiento: 51,5 mg/l
Cantidad: 50,2 mg
Monómero: 68,2 %
CL-EM: n.d.

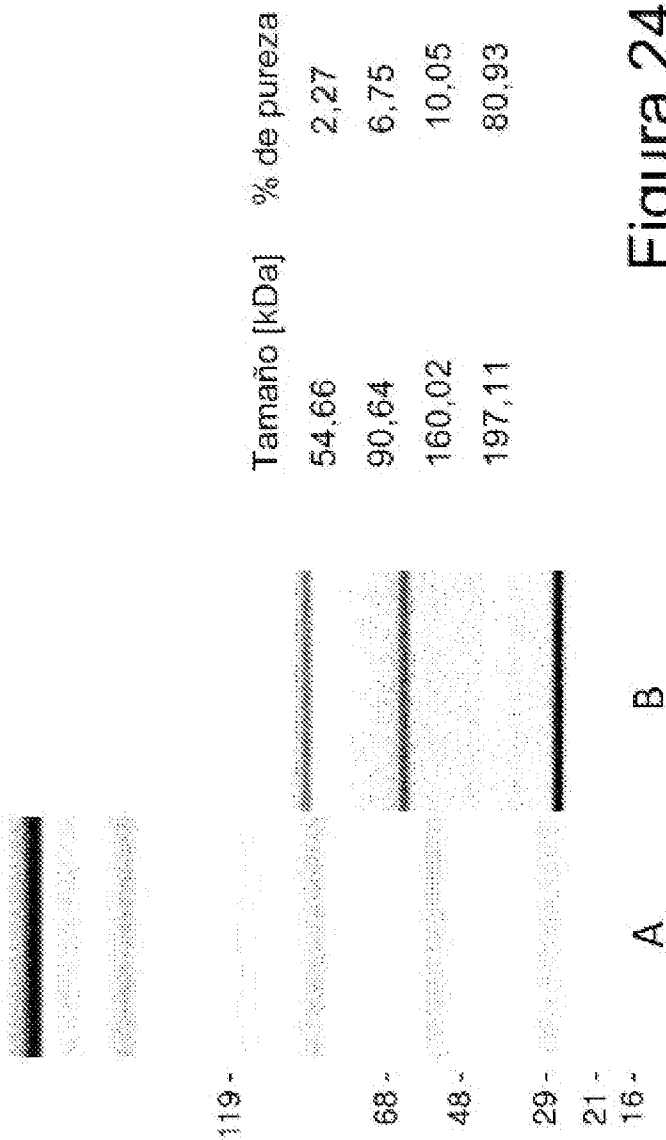


Figura 24

C. 83A10-TCB

Procedimientos de pur.: PA + SEC
Pureza: 69,5 %
Rendimiento: 14,1 mg/l
Cantidad: 13,1 mg
Monómero: 74,7 %
CL-EM: un 40-60 %
de molécula correcta

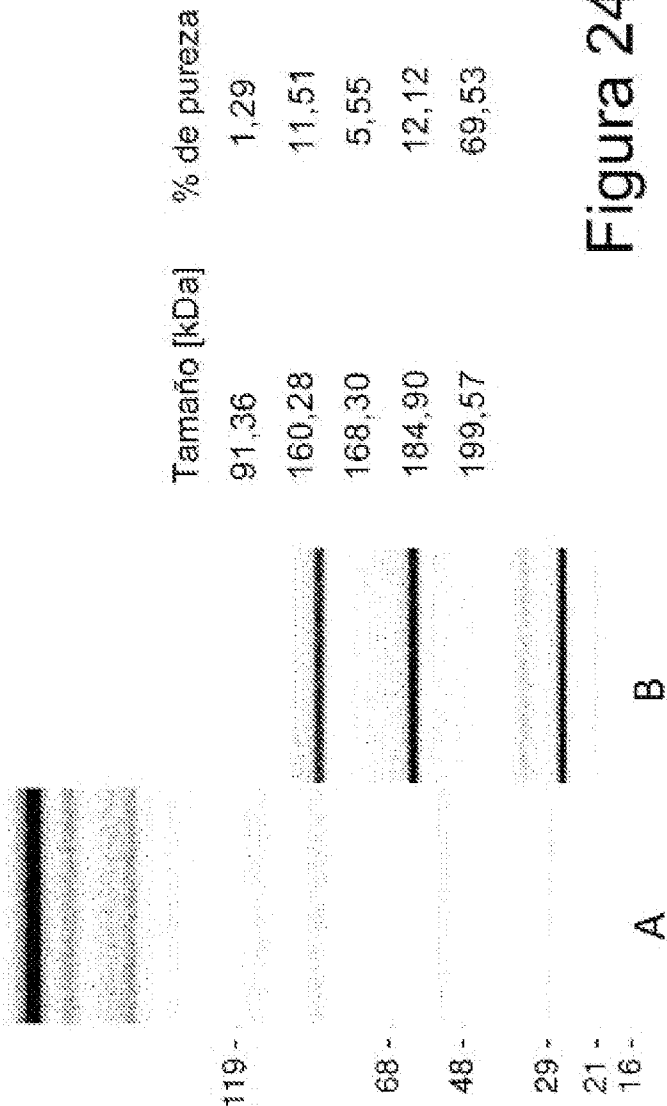
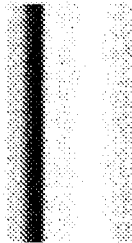


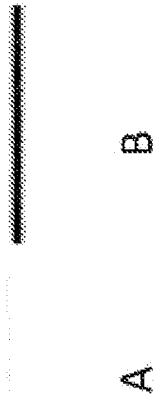
Figura 24

D. 83A10-TCBcv

Procedimientos de pur.: PA + SEC
Pureza: 91,0 %
Rendimiento: 10,3 mg/l
Cantidad: 10,0 mg
Monómero: 83,9 %
CL-EM: un 90 %
de molécula correcta



	Tamaño [kDa]	% de pureza
119 -	91,20	1,03
68 -	160,92	6,42
48 -	184,74	1,59
29 -	196,63	90,96



A

B

Figura 24

E. 83A10-TCB

Procedimientos de pur.: [(PA + SEC
+ (PA))] + cLEX + SEC

Pureza: 43,1 %

Rendimiento: 0,43 mg/l

Cantidad: 0,73 mg

Monómero: 98,3 %

CL-EM: un 60-70 %
de molécula correcta

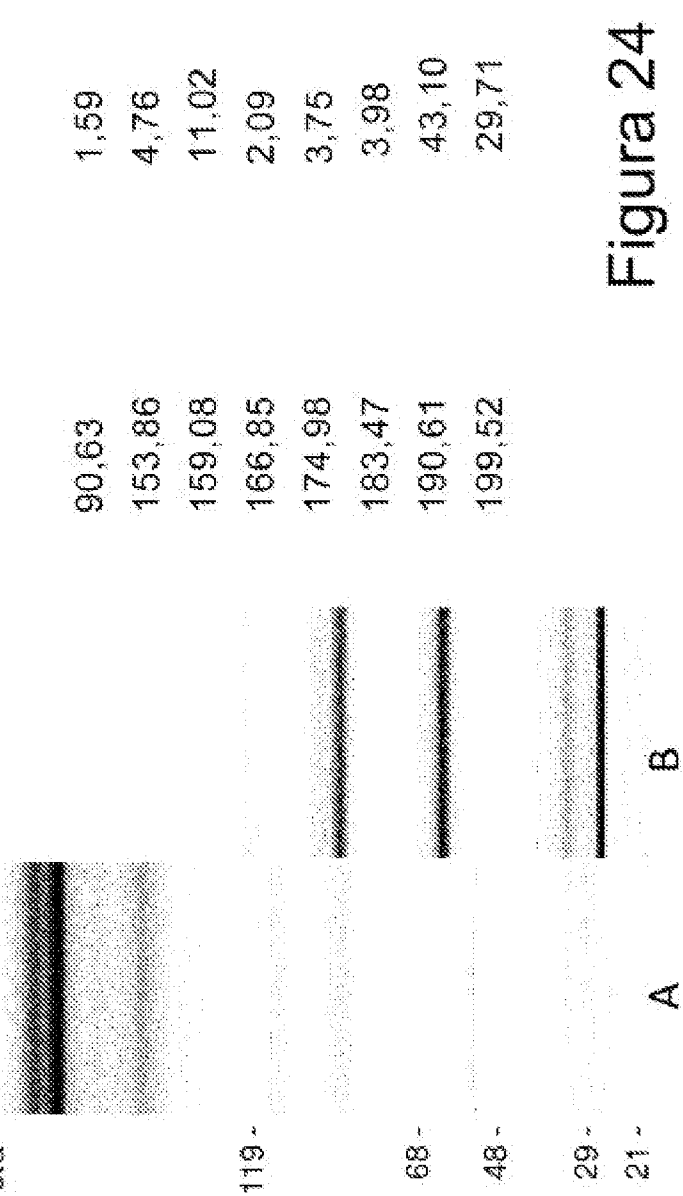


Figura 24

F. 83A10-TCBcv

Procedimientos de pur.: [(PA + SEC
+ (PA))] + cIEX + SEC
Pureza: 96,2 %
Rendimiento: 0,64 mg/l
Cantidad: 1,27 mg
Monómero: 98,9 %
CL-EM: >95 % de
molécula correcta

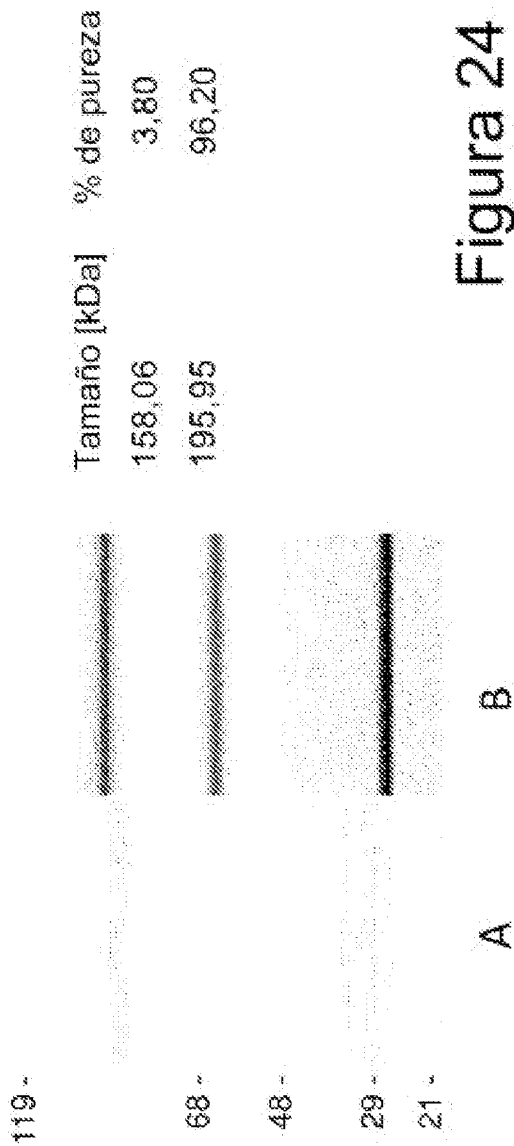
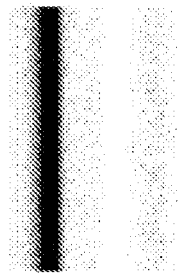


Figura 24

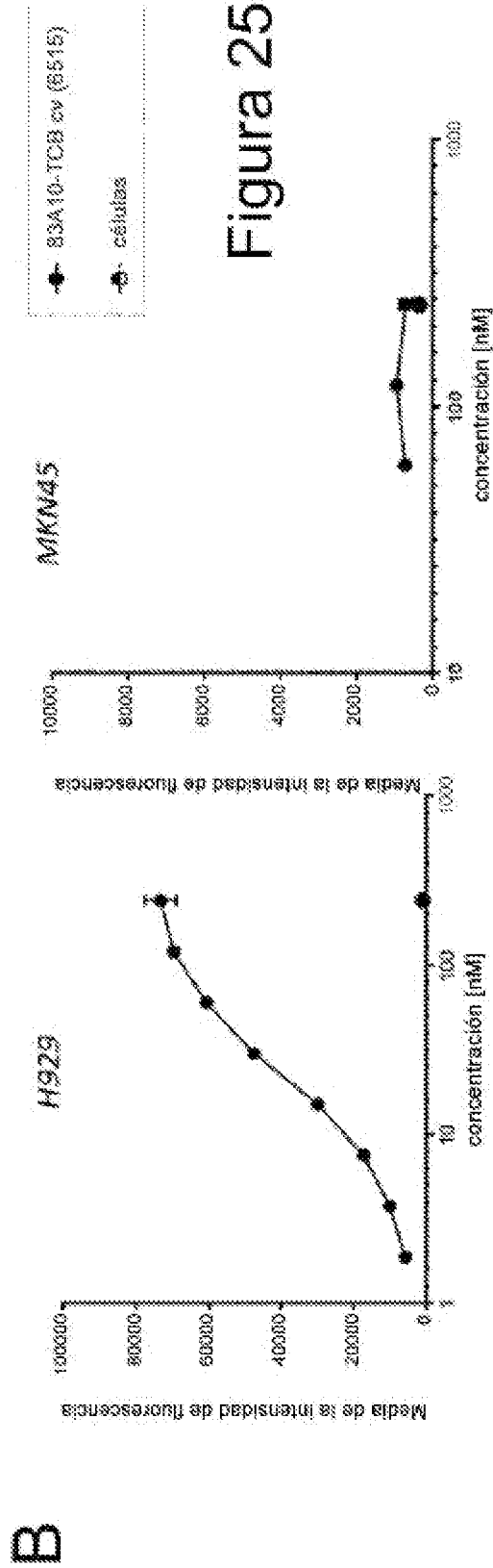
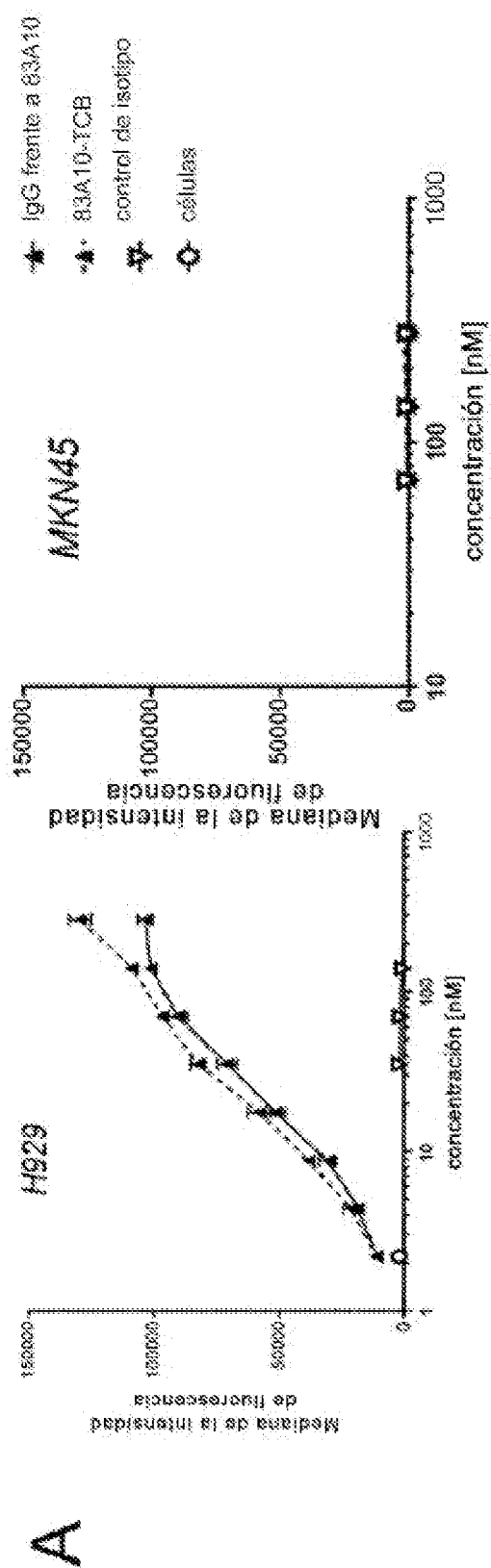


Figura 25

C

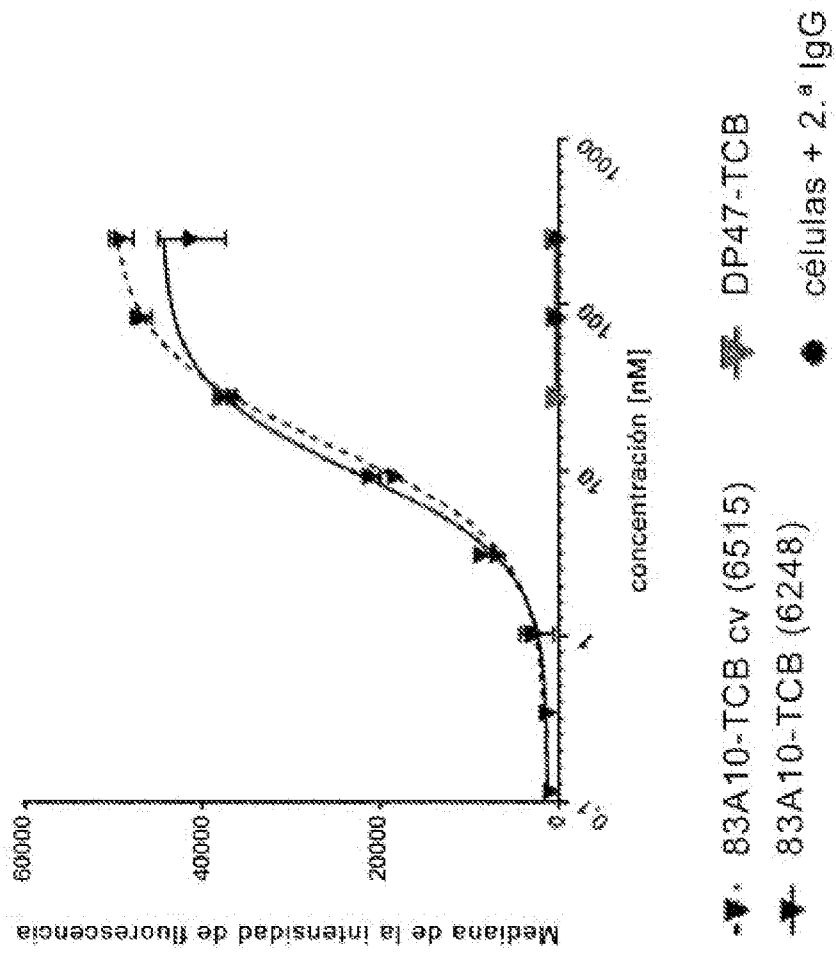


Figura 25

D

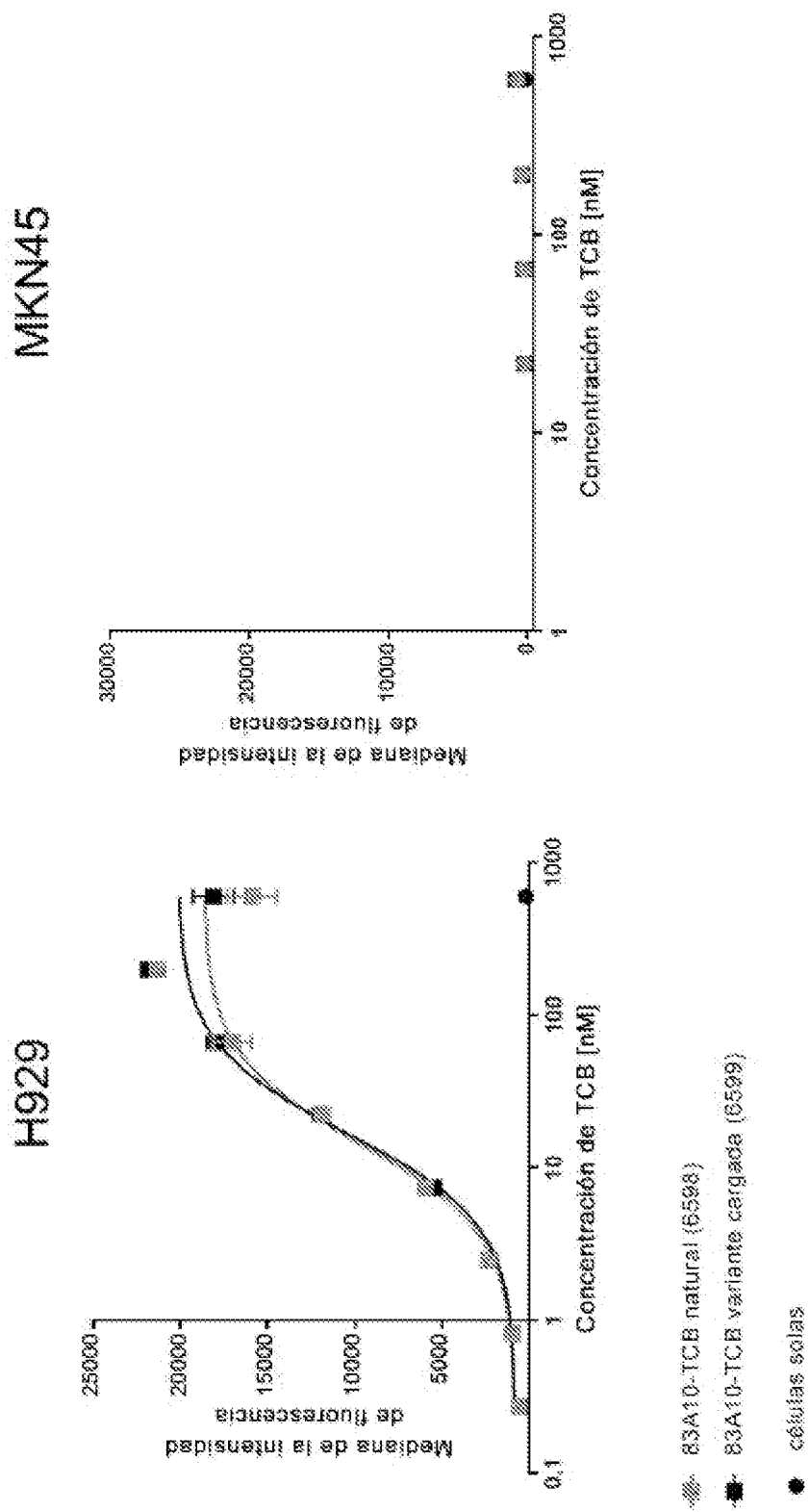


Figura 25

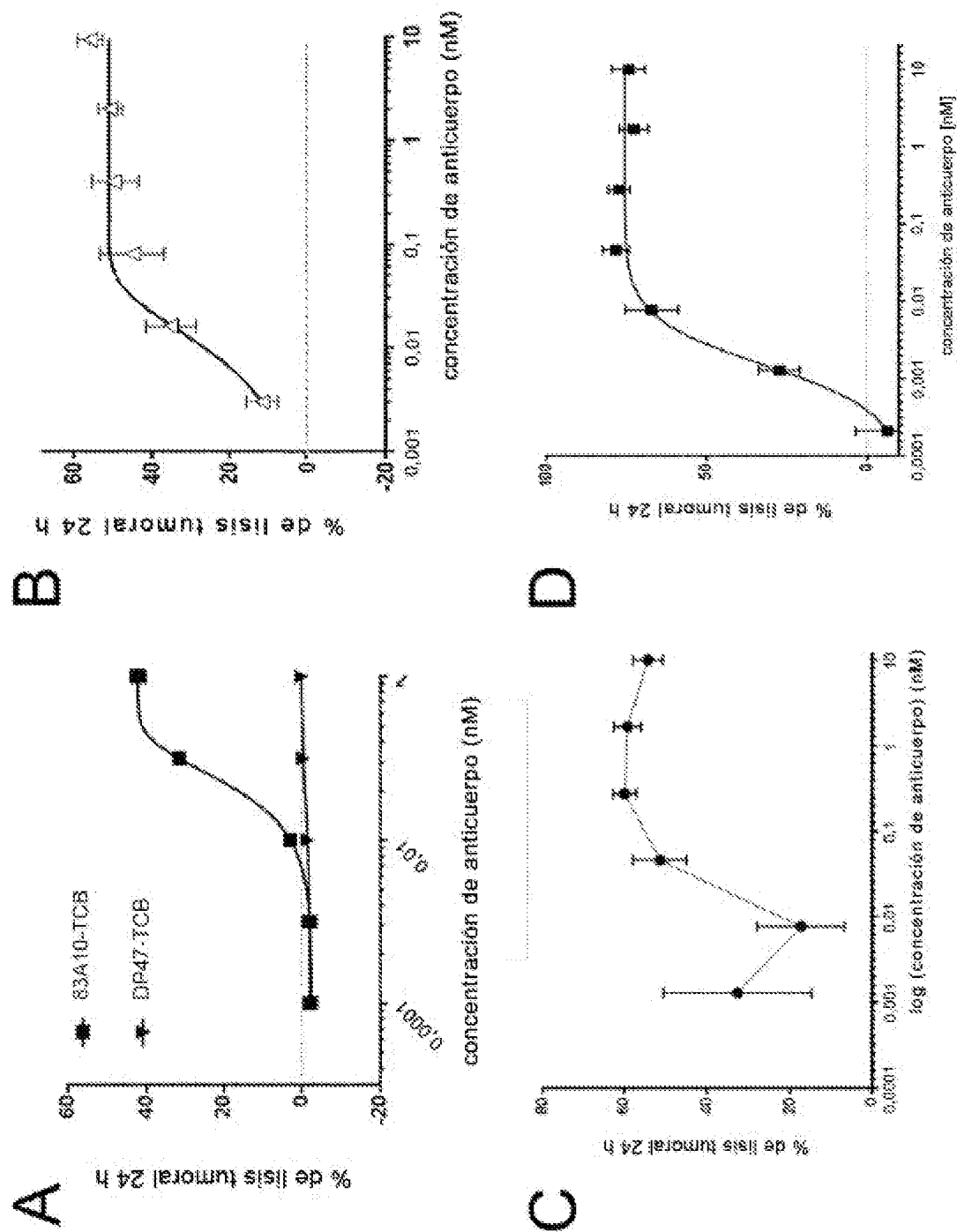


Figura 26

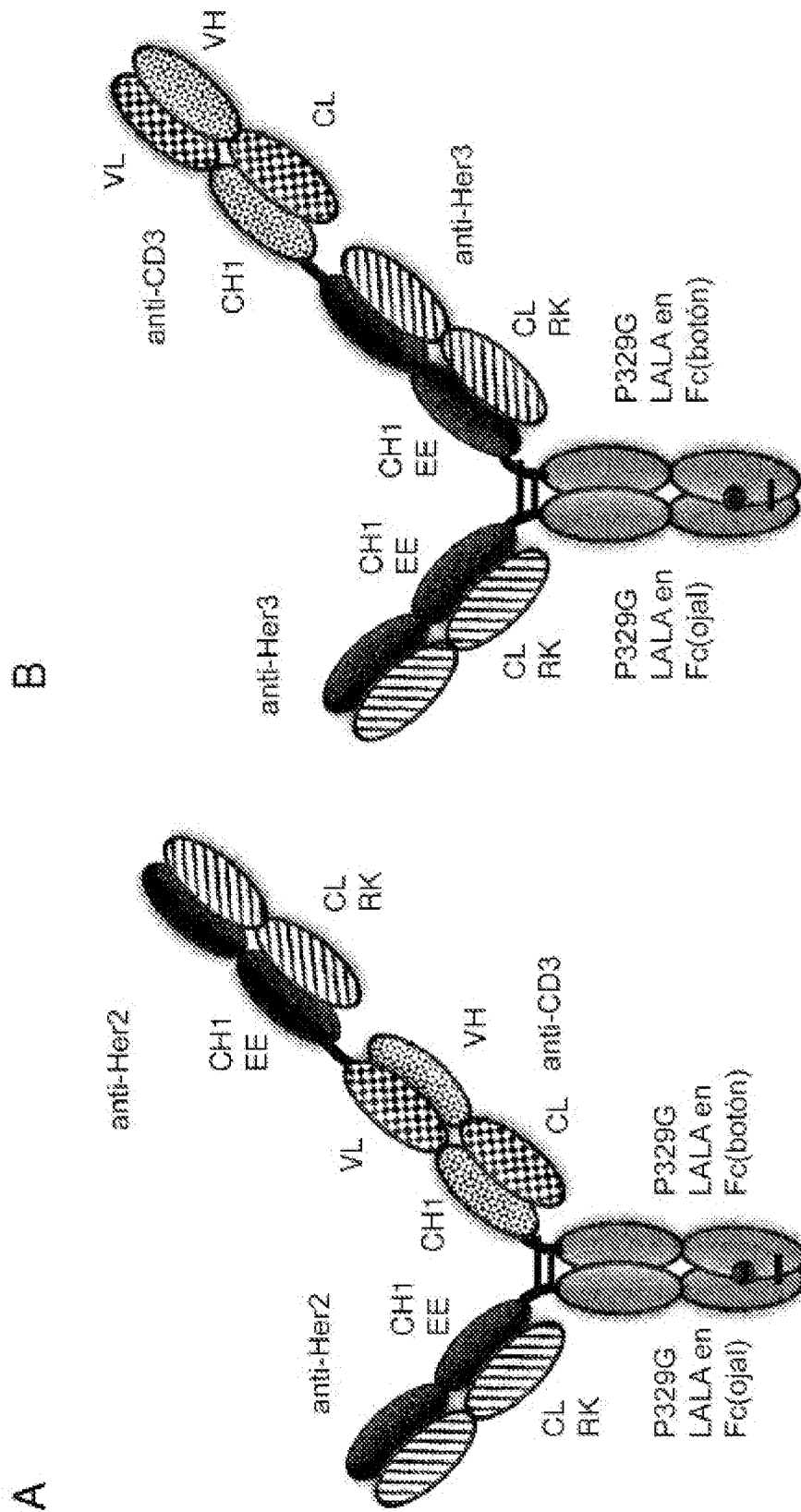


Figura 27

A

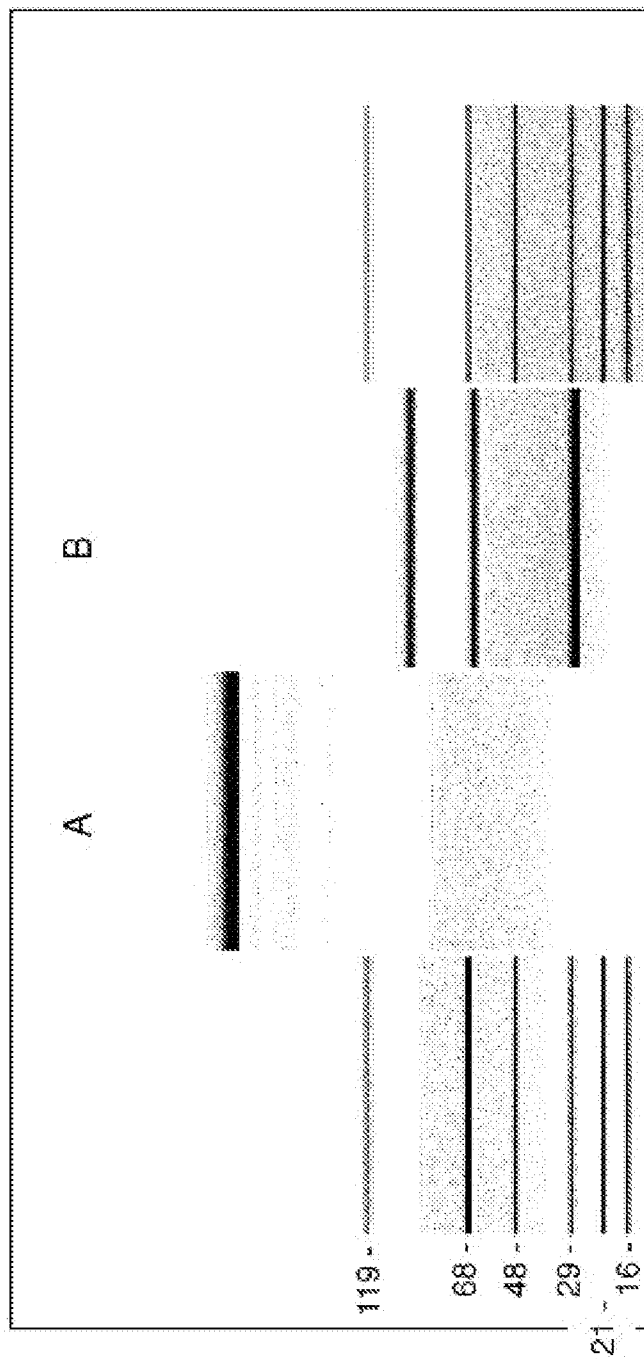


Figura 28

B

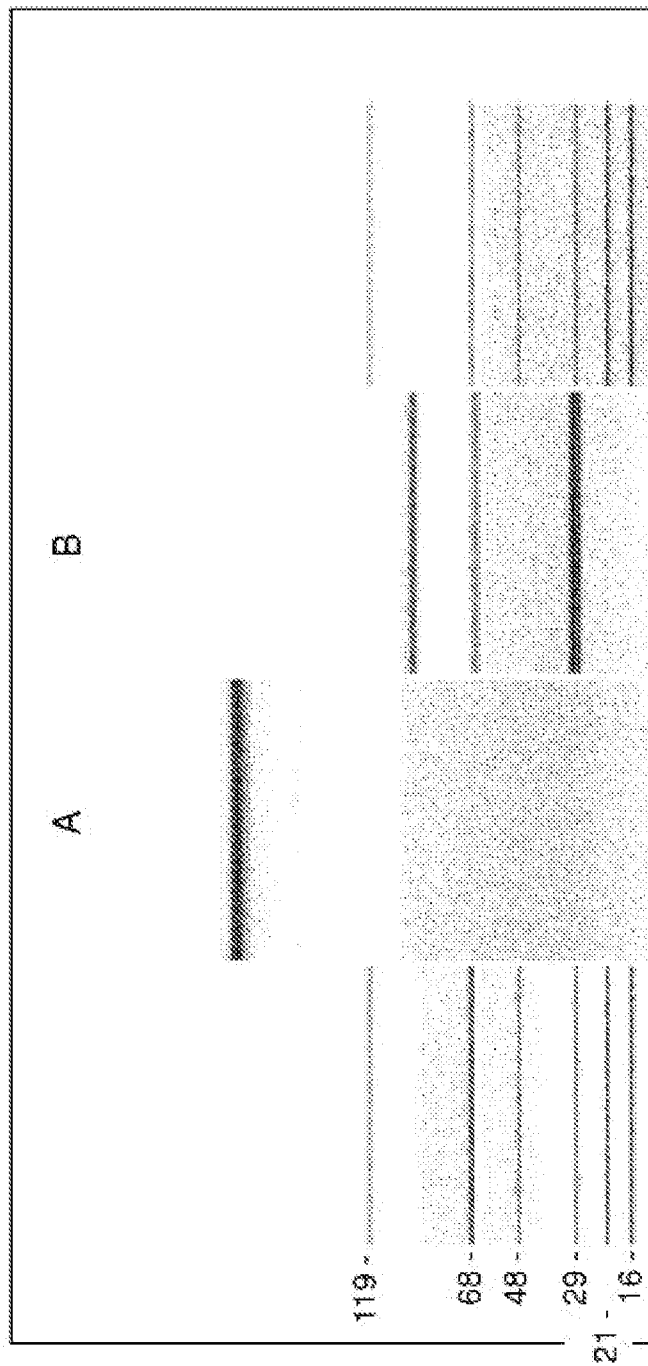


Figura 28

A

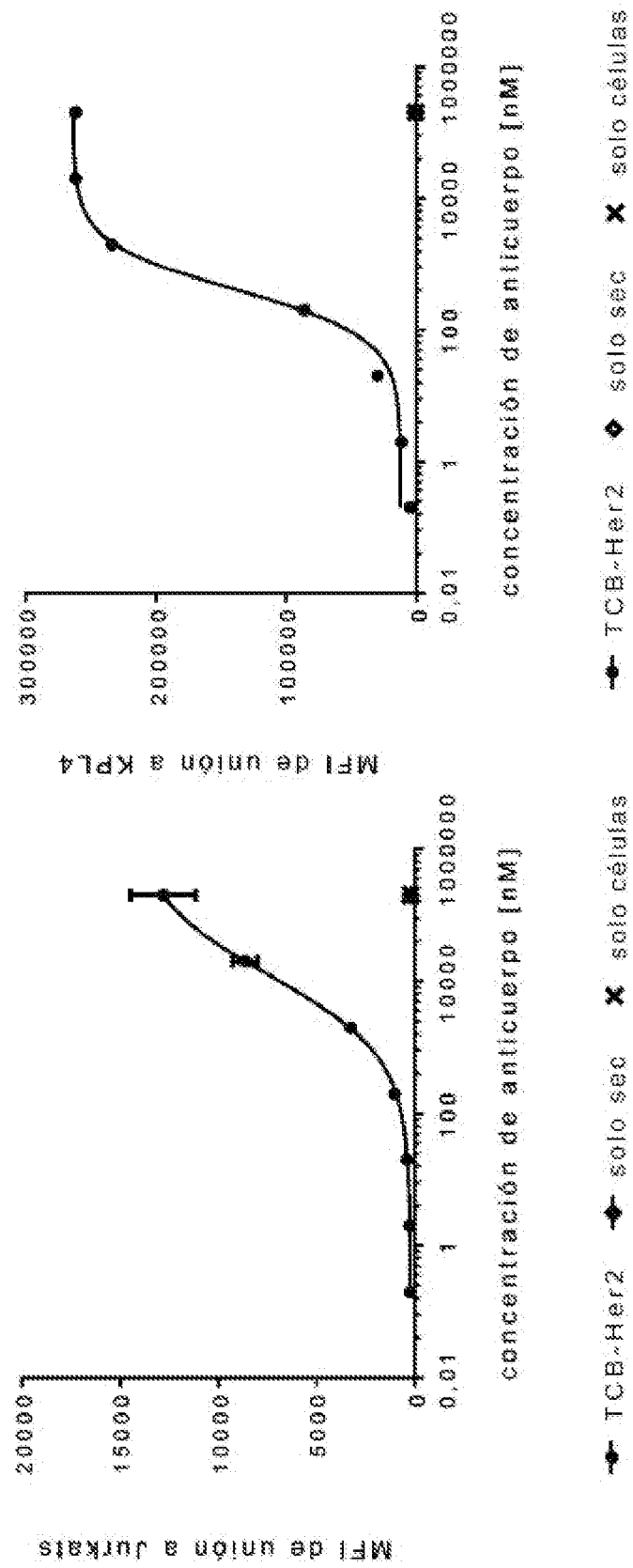


Figura 29

B

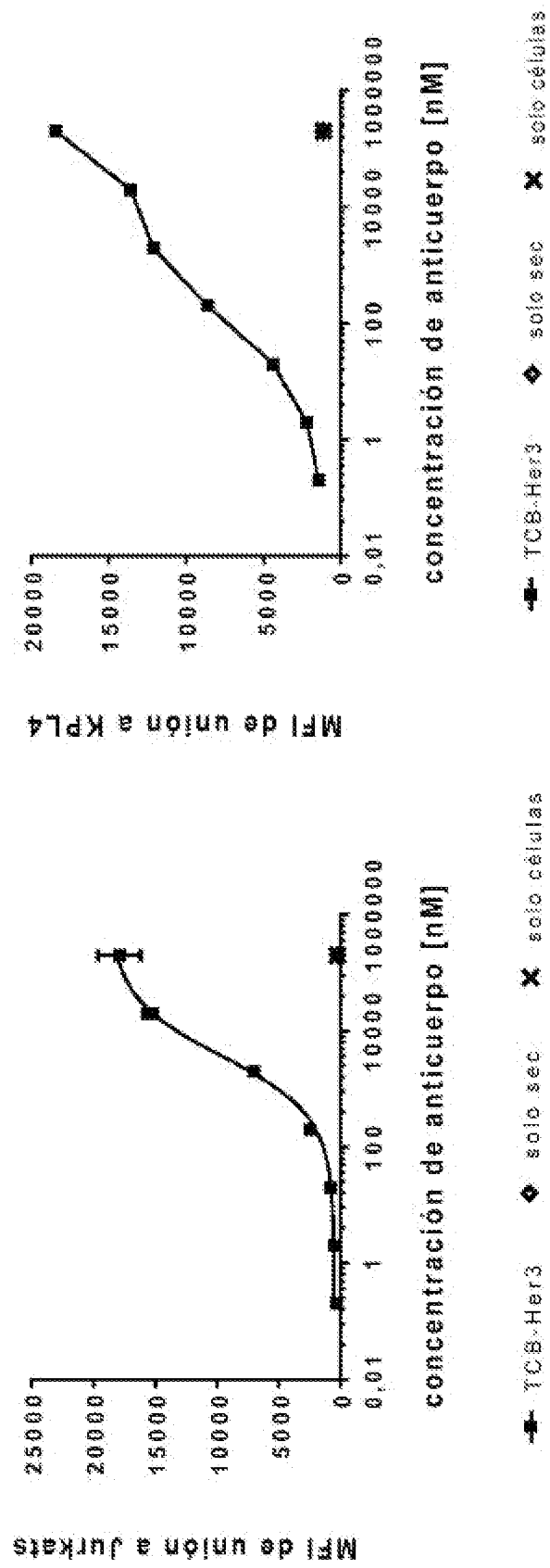


Figura 29

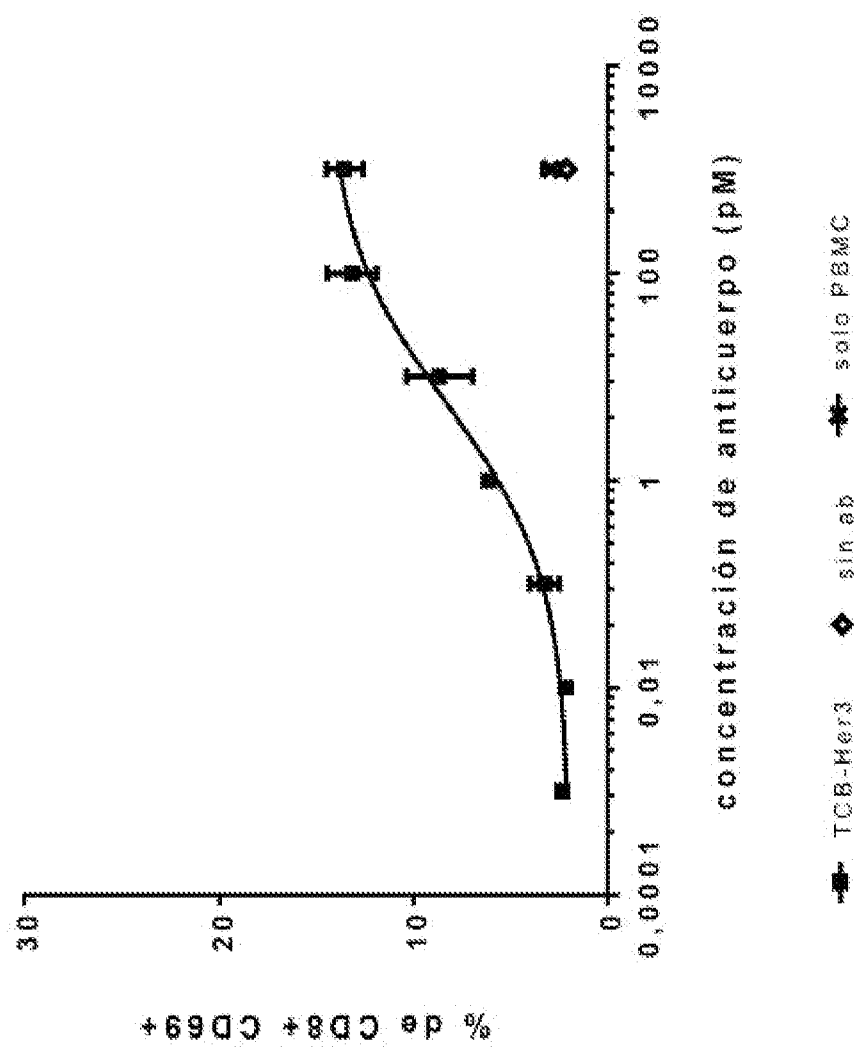


Figura 30

A

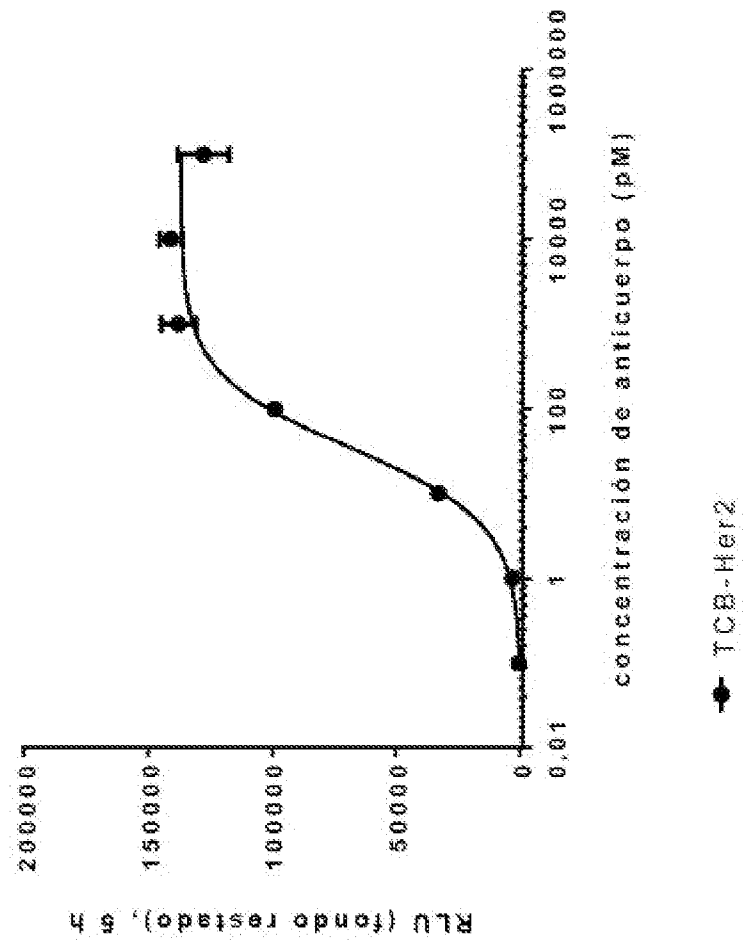


Figura 31

B

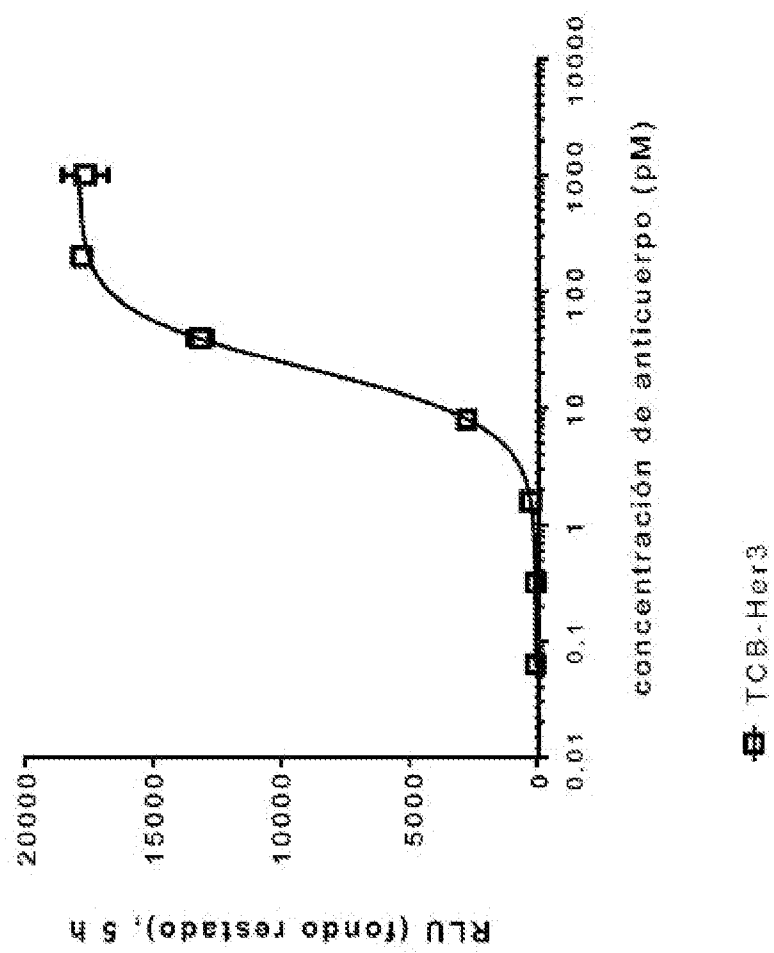


Figura 31

Figura 32

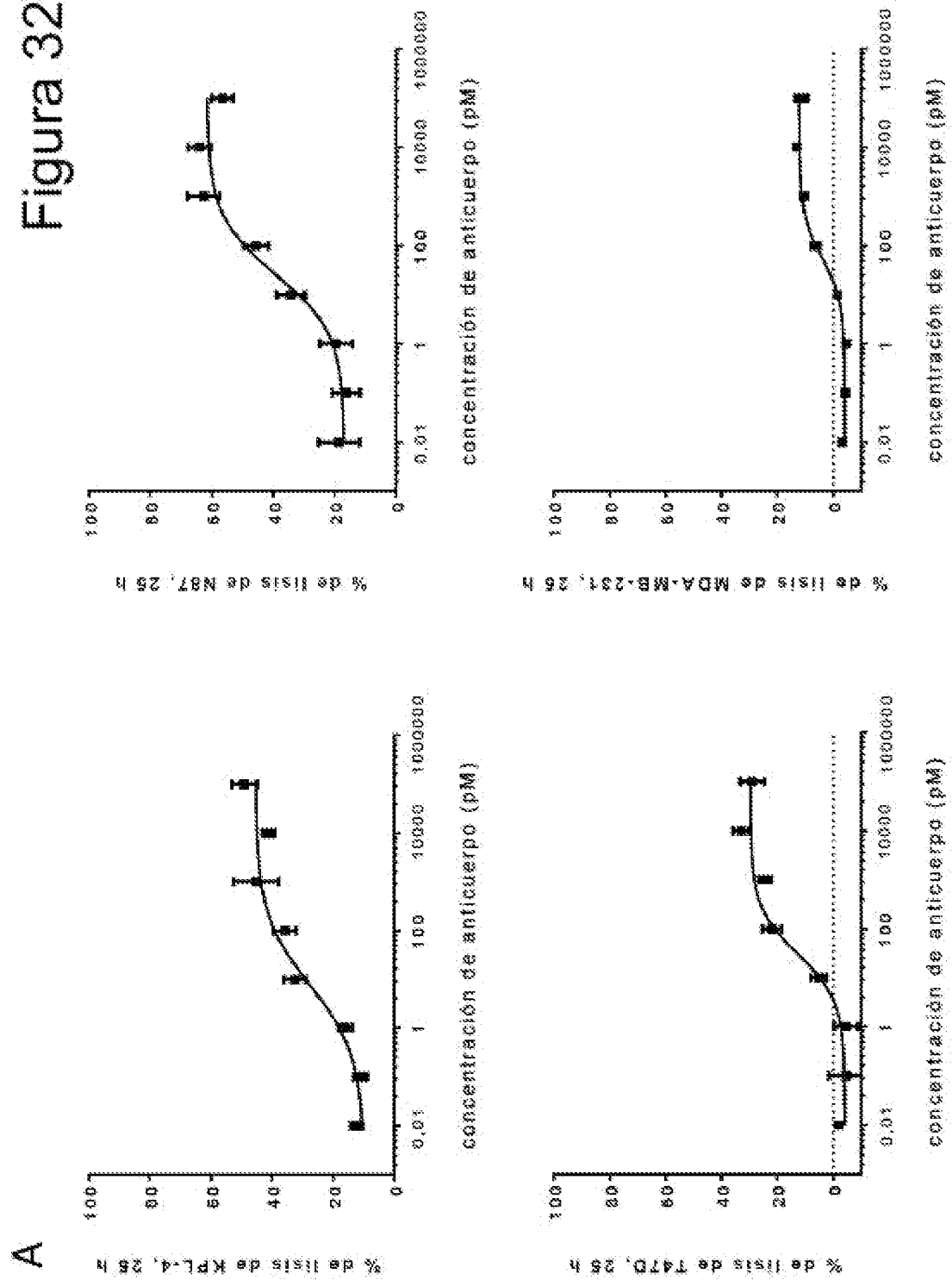
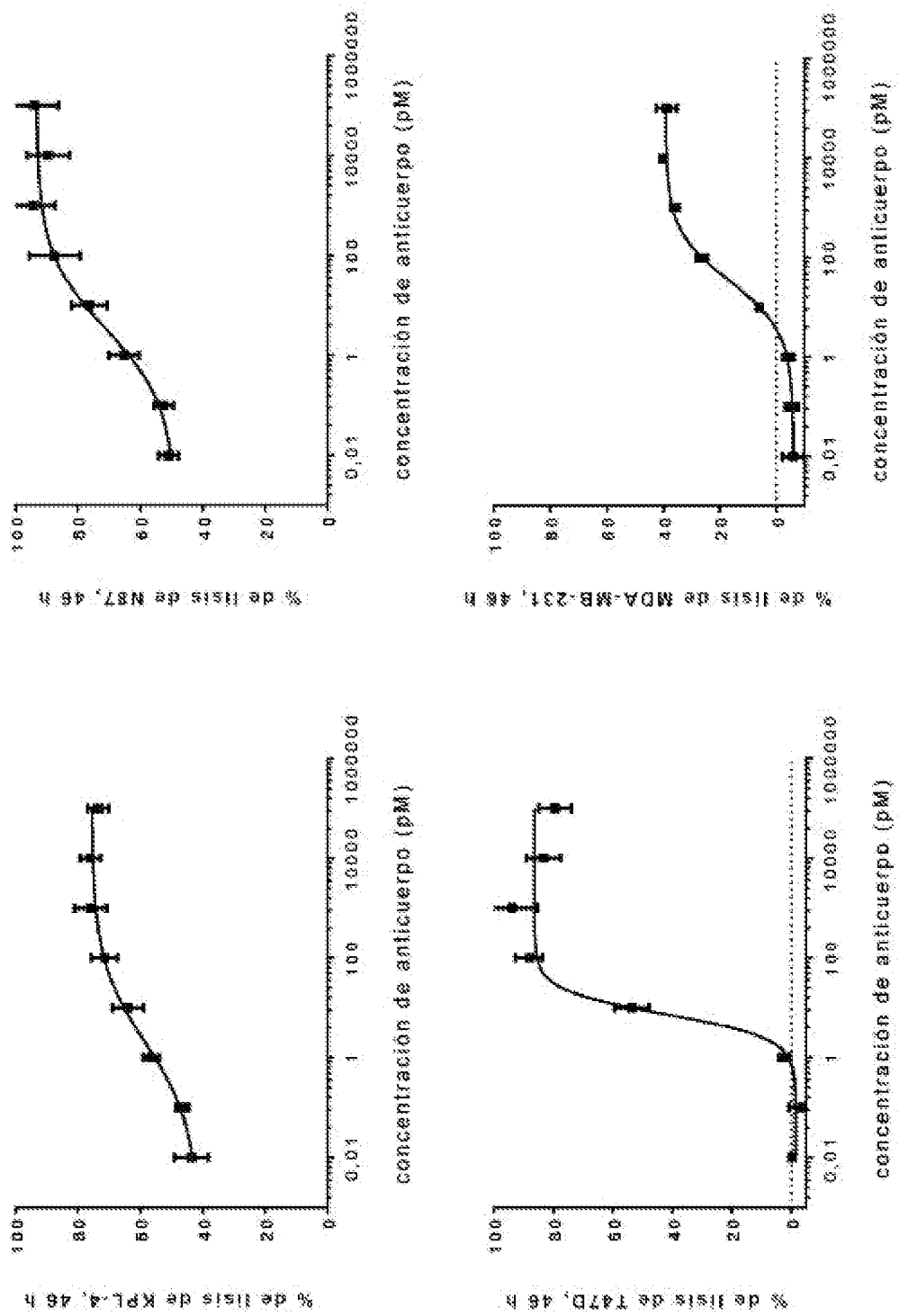


Figura 32

B



C

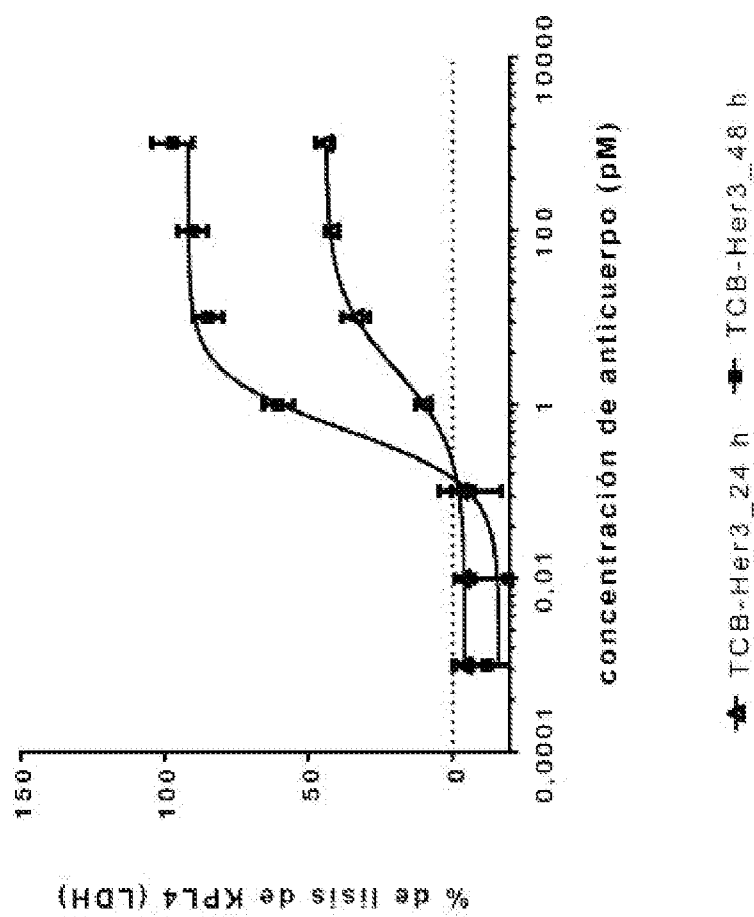


Figura 32

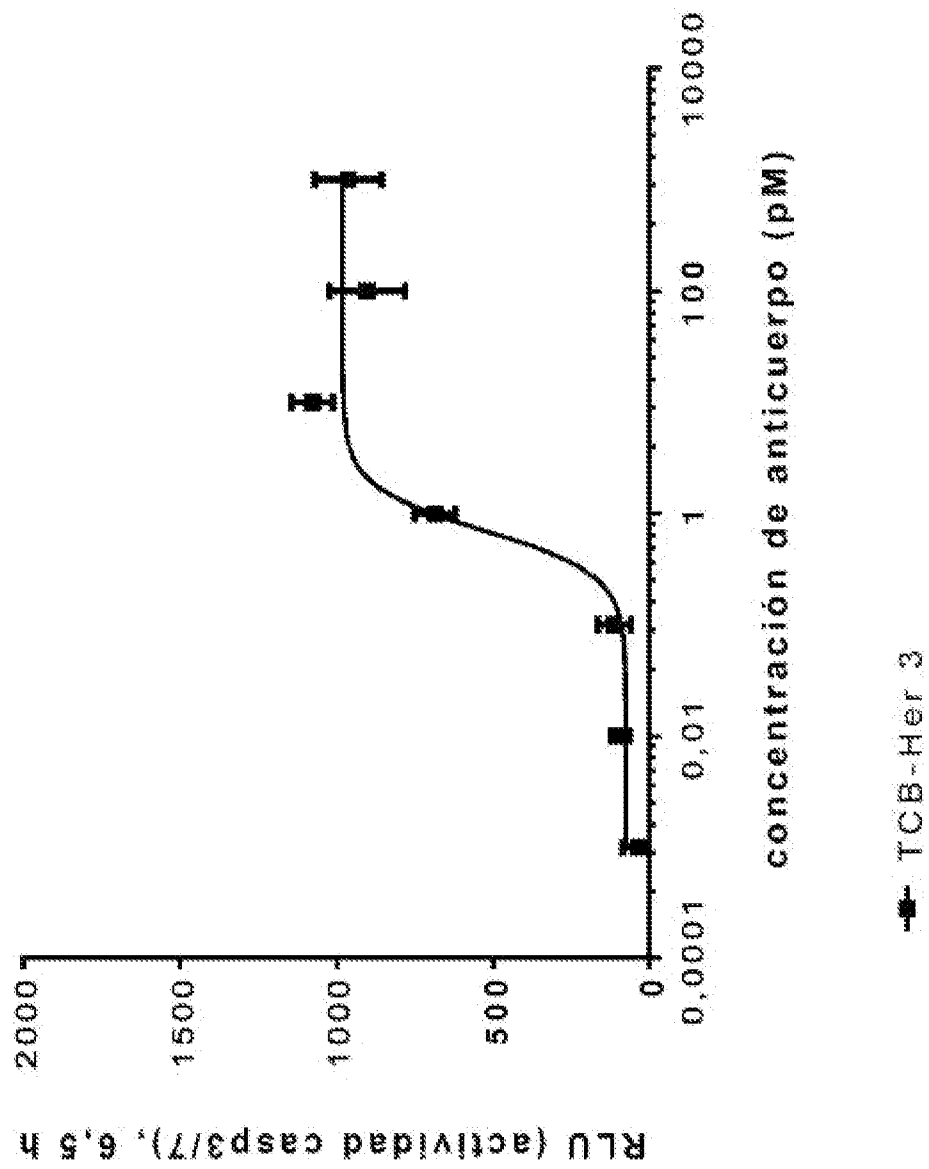


Figura 33

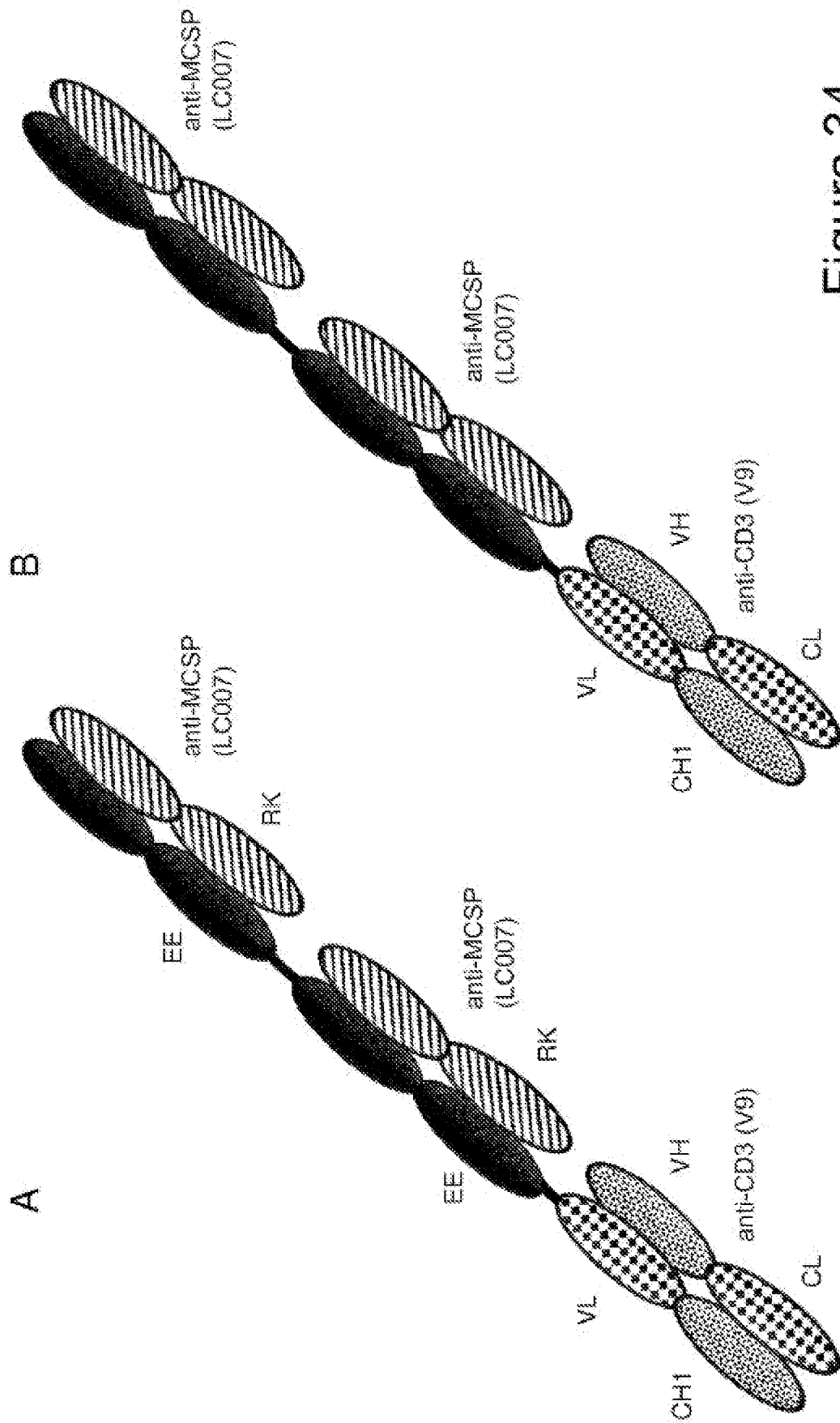


Figura 34

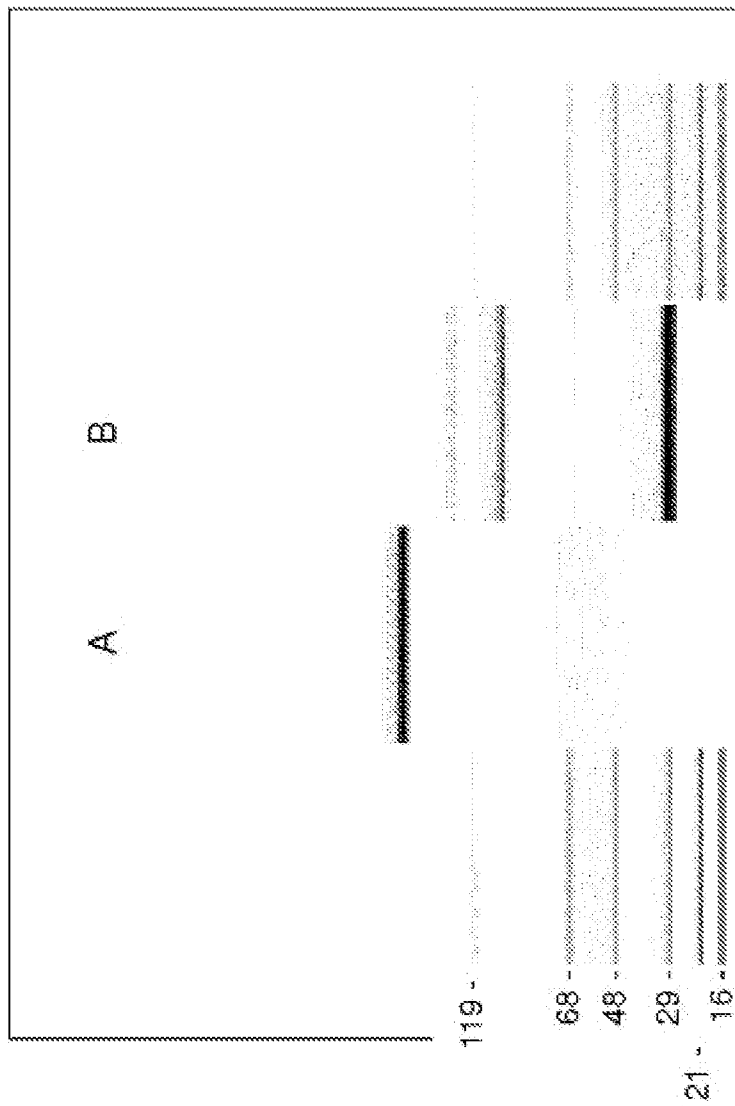


Figura 35

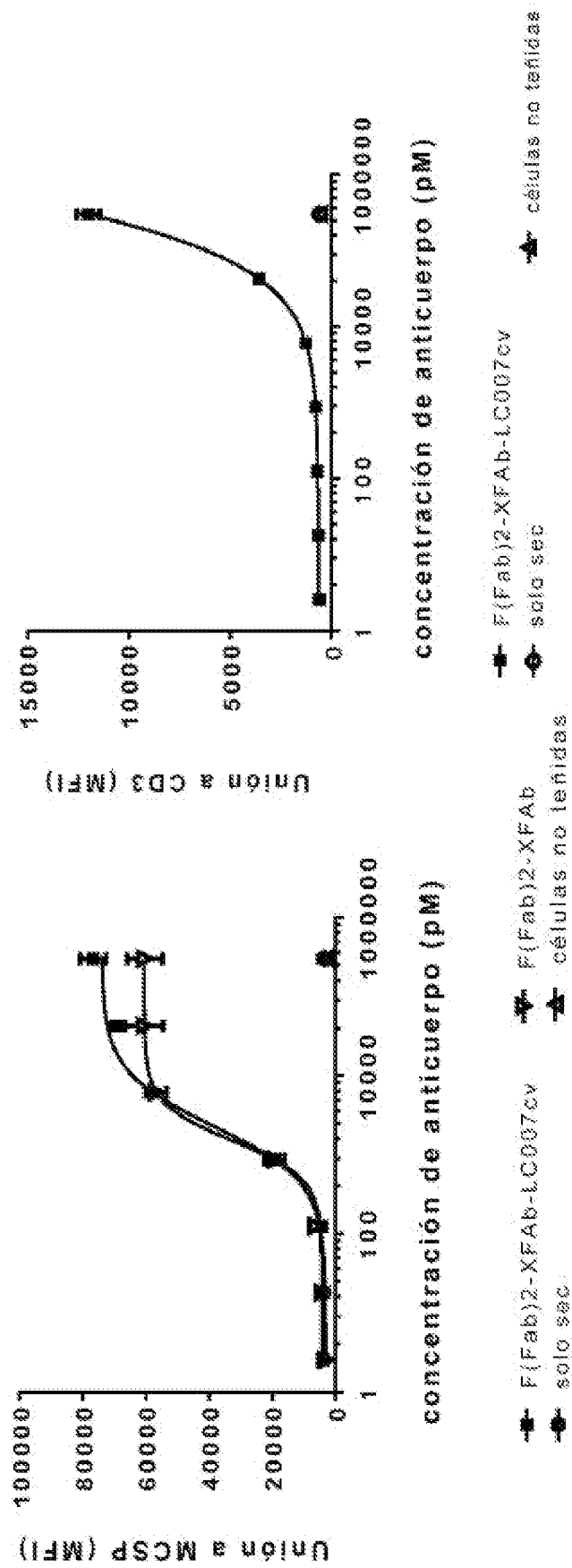


Figura 36

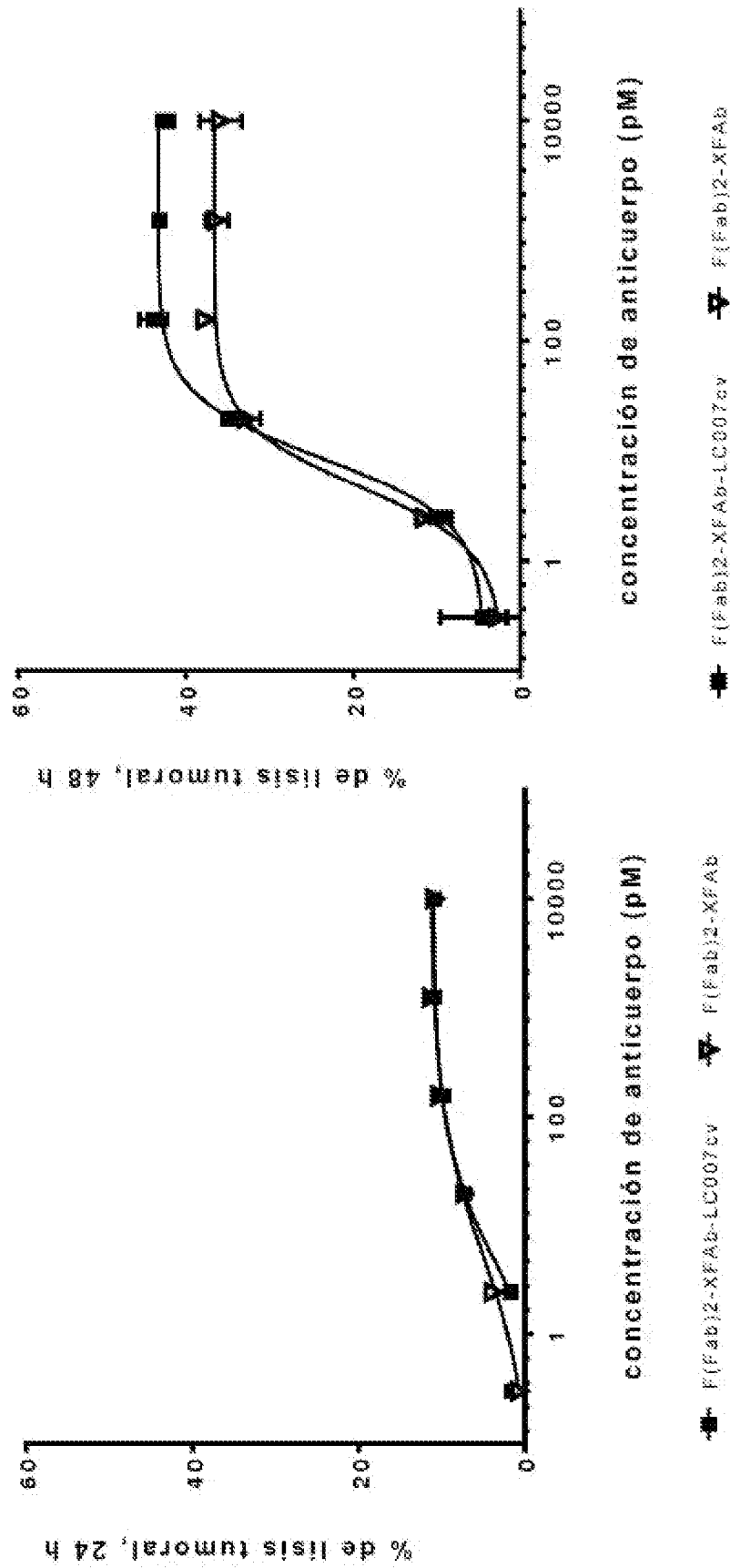


Figura 37