

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 980 623**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.06.2017** **E 22159278 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2024** **EP 4050034**

54 Título: **Anticuerpos de unión a CD3**

30 Prioridad:

14.09.2016 US 201662394360 P
28.04.2017 US 201762491908 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
02.10.2024

73 Titular/es:

TENEOONE, INC. (100.0%)
1 North Waukegan Road
North Chicago, Illinois 60064, US

72 Inventor/es:

TRINKLEIN, NATHAN;
VAN SCHOOTEN, WIM;
ALDRED FORCE, SHELLEY;
HARRIS, KATHERINE;
PHAM, DUY y
CLARKE, STARLYNN

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por la
Oficina Europea de Patentes

ES 2 980 623 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

Anticuerpos de unión a CD3

Antecedentes

El sistema inmunitario del cuerpo actúa como defensa contra las infecciones, las lesiones y el cáncer. Dos sistemas separados, pero interrelacionados, el sistema inmunitario humoral y el celular, trabajan conjuntamente para proteger el cuerpo. El sistema humoral está mediado por factores solubles, denominados anticuerpos, que neutralizan productos reconocidos como exógenos por el cuerpo. Por el contrario, el sistema celular implica células, tales como linfocitos T y macrófagos, que eliminan y neutralizan los invasores exógenos.

La activación de linfocitos T es crucial para la estimulación de las respuestas inmunitarias. Los linfocitos T presentan especificidad inmunológica y dirigen la mayoría de las respuestas inmunitarias celulares. Aunque los linfocitos T no secretan anticuerpos, son necesarios para la secreción de anticuerpos por parte de los linfocitos B. La activación de los linfocitos T requiere la participación de varias moléculas de la superficie celular, tal como el complejo receptor de linfocitos T y las moléculas CD4 o CD8. El receptor de linfocitos T (TcR) específico de antígeno está compuesto por un heterodímero unido por disulfuro, una glucoproteína de membrana con cadenas, alfa y beta (α y β), o gamma y delta (γ y δ). El TcR está unido de forma no covalente con un complejo de proteínas invariantes, denominado CD3.

Se sabe que los linfocitos T ejercen potentes efectos antitumorales en numerosos entornos experimentales. Los anticuerpos que pueden reclutar eficazmente linfocitos T contra las células tumorales están disponibles como anticuerpos biespecíficos, por ejemplo, dirigidos a antígenos asociados a tumor (TAA) y proteínas agonistas de la membrana de linfocitos T, tales como el complejo TCR/CD3 y CD28. Estos anticuerpos biespecíficos pueden activar linfocitos T, independientemente de su especificidad de TCR, lo que provoca lisis específica de células portadoras de los TAA respectivos.

Sin embargo, aunque los anticuerpos biespecíficos anti-CD3 pueden redirigir la lisis mediada por linfocitos T hacia células malignas, los ensayos clínicos con bsAb basados en CD3 han demostrado alta toxicidad en los pacientes. La activación inespecífica de linfocitos T a partir de bsAb puede producirse de manera independiente de antígeno debido a la interacción de Fc/receptor de Fc (FcR), o de manera dependiente de antígeno cuando el antígeno se expresa tanto en células normales como en tumorales. Ambos mecanismos pueden haber sido responsables de la toxicidad observada en estudios clínicos anteriores. (Véase, por ejemplo, Link *et al.* (1998) Int. J. Cancer 77(2):251-6; Durben *et al.* Molecular Therapy (2015); 23 4, 648-655). Debido al síndrome de liberación de citocinas resultante, se han producido bloqueos importantes en el desarrollo de estos anticuerpos con fines terapéuticos.

La interacción del receptor de linfocitos T (TCR) con su ligando péptido-MHC determina la actividad de un linfocito T. Las características de unión de esta interacción se han estudiado con gran detalle y se ha demostrado que controlan la función de los linfocitos T. La fuerza y la naturaleza de la interacción del TCR-péptido/MHC determinan si los linfocitos T ejercen funciones efectoras o si se inactivan y eliminan. Los anticuerpos contra CD3 activan los linfocitos T al cambiar la conformación de la cadena CD3 ϵ y, dependiendo del epítopo, pueden tener efectos agonistas o antagonistas sobre los linfocitos T (Yoon *et al.*, 1994 Immunity 1:563-569). A la luz de los importantes efectos secundarios de muchos agonistas de linfocitos T, puede preferirse mantener los potentes efectos antitumorales mientras se reduce la liberación de citocinas proinflamatorias. Sin embargo, los anticuerpos anti-CD3 agonistas parciales pueden alterar la cadena CD3 ϵ de manera subóptima, provocando una señalización ineficaz, y la mayoría de los anticuerpos anti-CD3 son agonistas totales de ambas vías. No está claro si estas funciones efectoras se pueden separar. Muchos anticuerpos anti-CD3 existentes (por ejemplo, SP-34, UCHT1, OKT3) tienen afinidades en el intervalo de 1 a 50 nM de KD, sin embargo, esto puede no ser óptimo para uso terapéutico.

La invención proporciona anticuerpos específicos de CD3 y anticuerpos biespecíficos derivados de los mismos.

Cualquier referencia en la descripción a métodos de tratamiento se refiere a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia (o para diagnóstico).

Publicaciones

Se describen anticuerpos contra CD3, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. n.º 5,585,097; 5,929,212; 5,968,509; 6,706,265; 6,750,325; 7,381,803; 7,728,114. Se describen anticuerpos biespecíficos con especificidad de unión a CD3, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. n.º 7,262,276; 7,635,472; 7,862,813; y 8,236,308.

Los anticuerpos biespecíficos contra CD3 y BCMA son conocidos en la técnica, como se ilustra en el documento WO 2013/072406.

Compendio

La presente invención proporciona un anticuerpo biespecífico, que comprende:

(a) un primer resto de unión específico para CD3 humano; en donde el primer resto de unión comprende:

(i) una primera subunidad polipeptídica que comprende un dominio variable de la cadena pesada (VH) que comprende una CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de GFTFDDYA (SEQ ID NO: 29), una CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de ISWNSGSI (SEQ ID NO: 24) y una CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de AKDSRGYGDYRLGGAY (SEQ ID NO: 41) en una región flanqueante humana; y

5 (ii) una segunda subunidad polipeptídica que comprende un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende una CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de QSVSSN (SEQ ID NO: 35), una CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de GAS (SEQ ID NO: 38) y una CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de QQYNNWPWT (SEQ ID NO: 45); y

(b) un segundo resto de unión específico para BCMA humano, en donde el segundo resto de unión comprende:

10 (i) una tercera subunidad polipeptídica que comprende un dominio VH que comprende una CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de GFTVSSYG (SEQ ID NO: 36), una CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de IRGSDGST (SEQ ID NO: 39) y una CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de AKQGENDGPFDH (SEQ ID NO: 46).

15 En algunas realizaciones, las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 en el dominio VL de la segunda subunidad polipeptídica están presentes en una región flanqueante de VL humana. En algunas realizaciones, la primera subunidad polipeptídica comprende un dominio VH que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, o la segunda subunidad polipeptídica comprende un dominio VL que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19. En algunas realizaciones, la primera subunidad polipeptídica comprende un dominio VH que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y la segunda subunidad polipeptídica comprende un dominio VL que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19. En algunas realizaciones, la tercera subunidad polipeptídica comprende un dominio VH que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21. En algunas realizaciones, la tercera subunidad polipeptídica tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20.

La presente invención proporciona además un anticuerpo biespecífico, que comprende:

25 (a) un primer resto de unión específico para CD3 humano; en donde el primer resto de unión comprende una primera subunidad polipeptídica que comprende un dominio VH que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una segunda subunidad polipeptídica que comprende un dominio VL que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19; y

30 (b) un segundo resto de unión específico para BCMA humano, en donde el segundo resto de unión comprende una tercera subunidad polipeptídica que comprende un dominio VH que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21.

35 En algunas realizaciones, la tercera subunidad polipeptídica comprende un primer dominio VH que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 y un segundo dominio VH que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21, en donde el primer dominio VH y el segundo dominio VH están dispuestos en una configuración en tándem. En algunas realizaciones, el primer dominio VH y el segundo dominio VH de la tercera subunidad polipeptídica están dispuestos en una configuración en tándem y se unen mediante un conector.

La presente invención proporciona además un anticuerpo biespecífico, que comprende:

40 (a) un primer resto de unión específico para CD3 humano; en donde el primer resto de unión comprende una primera subunidad polipeptídica que comprende un dominio VH que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una segunda subunidad polipeptídica que comprende un dominio VL que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19; y

(b) un segundo resto de unión específico para BCMA humano, en donde el segundo resto de unión comprende una tercera subunidad polipeptídica que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20.

La presente invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo biespecífico de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

45 La presente invención proporciona además uno o más polinucleótidos que codifican el anticuerpo biespecífico de la invención.

La presente invención proporciona además uno o más vectores que comprenden el uno o más polinucleótidos de la invención.

La presente invención proporciona además una célula que comprende el uno o más vectores de la invención.

50 La presente invención proporciona además un método de producción de un anticuerpo biespecífico, que comprende cultivar la célula de la invención en condiciones permisivas para la expresión del anticuerpo biespecífico y aislar el anticuerpo biespecífico de la célula.

La presente invención proporciona además un kit que comprende el anticuerpo biespecífico de una cualquiera de la invención e instrucciones de uso.

La presente invención proporciona además un anticuerpo biespecífico de la invención para su uso en el tratamiento de un cáncer que expresa BCMA en un sujeto humano que lo necesite.

- 5 En la presente memoria se describe una familia de anticuerpos muy relacionados que se unen a y activan la señalización a través de CD3, por ejemplo, la activación de linfocitos T CD3⁺. La familia de anticuerpos comprende un conjunto de secuencias de CDR como se define en la presente memoria. La familia de anticuerpos proporciona varios beneficios que contribuyen a la utilidad como agente o agentes terapéuticos clínicos. Los anticuerpos dentro de la familia incluyen miembros con un intervalo de afinidades de unión, lo que permite la selección de una secuencia específica con una afinidad deseada. La capacidad de ajustar la afinidad es de particular importancia para controlar el nivel de activación de CD3 en un individuo que se esté tratando, y reducir de ese modo la toxicidad.

- 10 Por ejemplo, los anticuerpos anti-CD3 tienen una afinidad (KD) por CD3 que varía de aproximadamente 10⁻⁶ a aproximadamente 10⁻¹¹. Los anticuerpos anti-CD3 que tienen afinidades (KD) de 50 nM o más, 100 nM o más, 500 nM o más, o 1 µM o más pueden ser deseables para imitar más de cerca la interacción de TCR/MHC y minimizar la liberación de citocinas tóxicas mientras se mantiene una lisis eficaz de las células tumorales. En algunos ejemplos, los anticuerpos anti-CD3 se caracterizan o seleccionan por su propensión reducida a inducir liberación de citocinas, tras la unión a un linfocito T competente, por ejemplo, para la liberación de IL-2 e IFNγ. Los anticuerpos pueden seleccionarse para uso terapéutico que optimice la destrucción de células tumorales y liberación reducida de citocinas, por ejemplo, un anticuerpo que, dentro de la familia de secuencias de anticuerpos descritas en la presente memoria, induzca una liberación de citocinas que sea inferior a aproximadamente la mitad del máximo observado para un miembro de la familia en un ensayo comparativo, y puede ser inferior, por ejemplo, inferior y aproximadamente un 25 % del máximo observado para un miembro de la familia en un ensayo comparativo. Además, los anticuerpos biespecíficos o multiespecíficos que comprenden al menos una región variable de la cadena pesada de la familia de anticuerpos pueden comprender una región variable de la cadena pesada y ligera proporcionada en la presente memoria. Los anticuerpos biespecíficos comprenden al menos la región variable de la cadena pesada de un anticuerpo específico para una proteína distinta de CD3, y pueden comprender una región variable de la cadena pesada y ligera. En algunos de dichos ejemplos, el segundo anticuerpo se une específicamente a un antígeno asociado a tumor, un antígeno diana, por ejemplo, integrinas, etc., un antígeno patógeno, una proteína de punto de control y similares. Diversos formatos de anticuerpos biespecíficos incluyen, sin limitación, polipéptidos monocatenarios, polipéptidos bicatenarios, polipéptidos tricatenarios, polipéptidos tetracatenarios y múltiplos de los mismos.

- 20 Cada uno de los anticuerpos específicos de CD3 comprende un dominio VH, que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 en una región flanqueante de VH humana. Las secuencias de CDR de la familia 2 pueden estar situadas, como ejemplo, en la región de alrededor de los residuos aminoacídicos 26-33, 51-58 y 97-112 para CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, de las secuencias de la región variable ejemplares proporcionadas expuestas en SEQ ID NO: 1-18. Un experto en la técnica entenderá que las secuencias de CDR pueden estar en una posición diferente si se selecciona una secuencia flanqueante diferente, aunque en general el orden de las secuencias seguirá siendo el mismo.

Las secuencias de CDR para un anticuerpo de la familia 2 pueden tener las siguientes fórmulas de secuencia. Una X indica un aminoácido variable, que pueden ser aminoácidos específicos como se indica a continuación.

- 40 CDR1 G₁ F₂ T₃ F₄ X₅ X₆ Y₇ A₈

donde:

X₅ puede ser cualquier aminoácido; por ejemplo, X₅ puede ser D, A o H; según la invención, X₅ es D.

X₆ puede ser cualquier aminoácido; por ejemplo, X₆ puede ser D o N; según la invención, X₆ es D.

- 45 Una secuencia CDR1 de un anticuerpo anti-CD3 de la familia 2 puede comprender la secuencia expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 1-18, residuos 26-33.

CDR2 I₁' S₂' W₃' N₄' S₅' G₆' S₇' I₈'

Una secuencia CDR2 de un anticuerpo anti-CD3 de la familia 2 puede comprender la secuencia expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 1-18, residuos 51-58.

CDR3 A₁" K₂" D₃" S₄" R₅" G₆" Y₇" G₈" X₉" Y₁₀" X₁₁" X₁₂" G₁₃" G₁₂" A₁₅" Y₁₆"

- 50 donde:

X₉ puede ser cualquier aminoácido, por ejemplo, X₉ puede ser D o S; según la invención, X₉ es D;

X₁₁" puede ser cualquier aminoácido, por ejemplo, X₁₁" puede ser R o S;

X₁₂" puede ser cualquier aminoácido, por ejemplo, X₁₂" puede ser L o R.

Una secuencia de CD3 de un anticuerpo anti-CD3 de la familia 2 tiene la fórmula A K D 8 R G Y G D Y X₁₁" X₁₂" G G A Y donde X₁₁" y X₁₂" son como se definen anteriormente. Una secuencia CDR3 de un anticuerpo anti-CD3 de la familia 2 puede comprender la secuencia expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 1-18, residuos 97-112. En algunos ejemplos, el dominio VH de unión a CD3 de un anticuerpo de la familia 2 se empareja con un dominio de región variable de la cadena ligera. En algunos de dichos ejemplos, la cadena ligera es una cadena ligera fija.

En algunas realizaciones, la cadena ligera comprende un dominio VL con secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 en una región flanqueante de VL humana. Las secuencias de CDR pueden ser las de SEQ ID NO: 19. En algunas realizaciones, la secuencia CDR1 comprende los residuos aminoácidos 27-32; 50-52; 89-97 para CDR1, CDR2, CDR3, respectivamente.

Las secuencias de CDR de un anticuerpo pueden ser una secuencia con al menos un 85 % de identidad, al menos un 90 % de identidad, al menos un 95 % de identidad, al menos un 99 % de identidad con respecto a una secuencia de CDR o conjunto de secuencias de CDR en SEQ ID NO: 1-18. En algunos ejemplos, una secuencia de CDR comprende una, dos, tres o más sustituciones aminoácidas con respecto a una secuencia de CDR o conjunto de secuencias de CDR en una cualquiera de SEQ ID NO: 1-18. En algunos ejemplos, dicha una o más sustituciones aminoácidas son una o más de la posición 5 o 10 de CDR1, la posición 2, 6 o 7 de CDR2, la posición 1, 8, 9 o 10 de CDR3, con respecto a las fórmulas de la familia 2 proporcionadas anteriormente.

Un anticuerpo biespecífico descrito en la presente memoria puede comprender una región variable de unión a CD3 descrita en la presente memoria, emparejada con una cadena ligera. En algunas realizaciones, la cadena ligera comprende la secuencia de la región variable expuesta en SEQ ID NO: 19, o una región variable que comprende el conjunto de secuencias de CDR en SEQ ID NO: 19 y las secuencias flanqueantes. Varias secuencias de Fc encuentran uso, incluyendo, sin limitación, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgG4 humanas, etc. El segundo brazo del anticuerpo biespecífico puede comprender una región variable que se une específicamente a un antígeno asociado a tumor. Según la invención, el segundo brazo del anticuerpo biespecífico comprende una región variable que se une específicamente a BCMA. En algunas realizaciones, el brazo anti-BCMA es una región variable monocatenaria, por ejemplo, como se muestra en la figura 2B. En algunas realizaciones, el brazo anti-BCMA comprende la secuencia de la región variable expuesta en SEQ ID NO: 20; o la secuencia de la región variable en tándem expuesta en SEQ ID NO: 21. La secuencia de Fc del brazo anti-BCMA puede ser, sin limitación, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgG4 humana, etc. Las secuencias de CDR pueden ser las contenidas en SEQ ID NO: 20. En algunas realizaciones, la secuencia de CDR comprende los residuos aminoácidos 26-33; 51-58; 97-108 para CDR1, CDR2, CDR3, respectivamente.

Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria pueden comprender al menos un dominio VH de unión a CD3, por ejemplo, un anticuerpo monoespecífico, biespecífico, etc. o una proteína similar a anticuerpo que comprende al menos un dominio VH de unión a CD3; y un excipiente farmacéuticamente aceptable. La composición puede liofilizarse, suspenderse en solución, etc. y puede proporcionarse en una formulación monodosis.

En algunas realizaciones, un método para el tratamiento del cáncer comprende administrar a un individuo que lo necesita una dosis eficaz del anticuerpo biespecífico de la invención. Un segundo sitio de unión a antígeno del anticuerpo biespecífico puede unirse específicamente a un antígeno tumoral, una proteína de punto de control, etc. En diversas realizaciones, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer gastrointestinal, cáncer cerebral, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de pulmón, leucemia, linfoma, sarcoma, carcinoma, tumores de células neurales, carcinomas escamocelulares, tumores de células germinativas, metástasis, tumores indiferenciados, seminomas, melanomas, mielomas, neuroblastomas, tumores de células mixtas y neoplasias provocadas por agentes infecciosos.

En algunos ejemplos, un método para el tratamiento de una enfermedad infecciosa comprende administrar a un individuo que lo necesita una dosis eficaz de un anticuerpo monoespecífico, biespecífico, etc. Cuando el anticuerpo es biespecífico, un segundo sitio de unión a antígeno puede unirse específicamente a un antígeno patógeno, por ejemplo, bacterias, virus o parásitos.

En otras realizaciones, se proporciona un método para la producción de un anticuerpo biespecífico de la presente invención, que comprende expresar las secuencias del anticuerpo, por ejemplo, una o más secuencias que codifican la cadena ligera, una o más secuencias que codifican la cadena pesada, en una sola célula hospedadora. En diversas realizaciones, la célula hospedadora puede ser una célula procariota o eucariota, tal como una célula de mamífero.

Breve descripción de los dibujos

La invención se entiende mejor a partir de la siguiente descripción detallada cuando se lee junto con los dibujos adjuntos. El archivo de patente o solicitud contiene al menos un dibujo realizado en color. El departamento proporcionará copias de esta publicación de patente o solicitud de patente con uno o más dibujos en color, previa solicitud y pago de la tasa necesaria. Se hace hincapié en que, según la práctica común, los diversos rasgos de los dibujos no están a escala. Por el contrario, las dimensiones de los diversos rasgos se expanden o reducen arbitrariamente para mayor claridad. En los dibujos se incluyen las siguientes figuras.

Figura 1A-1C. La figura 1A muestra una alineación de las regiones CDR1, 2 y 3 de los miembros de la familia 2 de anticuerpos de SEQ ID NO: 1-18, que se unen específicamente a CD3 humano, correspondiente a los residuos 26-33, 51-58 y 97-112. La figura 1B muestra las regiones CDR1, 2 y 3 de la cadena ligera fija (SEQ ID NO: 19); y una secuencia anti-BCMA ejemplar (SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 21). La figura 1C proporciona las secuencias de CDR de un anticuerpo anti-CD3 de referencia (SEQ ID NO: 22), ID 304704.

Figuras 2A-2E. Modelos esquemáticos de anticuerpos humanos biespecíficos. Figura 2A Anticuerpo biespecífico anti-CD3:antígeno tumoral con cadena ligera común (3 cadenas únicas en total). Figura 2B Anticuerpo biespecífico anti-CD3:antígeno tumoral con 2 cadenas ligeras únicas (4 cadenas únicas en total). Figura 2C Anticuerpo biespecífico anti-CD3:antígeno tumoral con cadena de dominio de unión a antígeno tumoral únicamente de cadena pesada (3 cadenas únicas). Figura 2D Anticuerpo biespecífico anti-CD3:antígeno tumoral con dominio de unión a antígeno tumoral scFv (3 cadenas únicas en total). Figura 2E Anticuerpo biespecífico anti-CD3:antígeno tumoral con dominio de unión anti-CD3 scFv (3 cadenas únicas en total).

Figura 3. La tabla de datos de la familia 2 anti-CD3 resume el comportamiento de los anticuerpos anti-CD3 en formato monoespecífico y biespecífico. La columna 1 muestra la ID de secuencia para la secuencia de VH anti-CD3. La columna 2 muestra el valor de MFI para la unión a células Jurkat del anticuerpo monoespecífico anti-CD3 precursor. La columna 3 muestra el valor de MFI para la unión a linfocitos T de macaco del anticuerpo monoespecífico anti-CD3 precursor. La columna 4 muestra el nombre del anticuerpo biespecífico α CD3: α BCMA. La columna 5 muestra los picogramos de IL-2 liberados por linfocitos panT estimulados por el anticuerpo biespecífico que se une a la proteína BCMA recubierta sobre plástico a la dosis indicada. La columna 6 muestra los picogramos de IL-6 liberados por linfocitos panT estimulados por el anticuerpo biespecífico que se une a la proteína BCMA recubierta sobre plástico a la dosis indicada. La columna 7 muestra los picogramos de IL-10 liberados por linfocitos panT estimulados por el anticuerpo biespecífico que se une a la proteína BCMA recubierta sobre plástico a la dosis indicada. La columna 8 muestra los picogramos de IFN- γ liberados por linfocitos panT estimulados por el anticuerpo biespecífico que se une a la proteína BCMA recubierta sobre plástico a la dosis indicada. La columna 9 muestra los picogramos de TNF α liberados por linfocitos panT estimulados por el anticuerpo biespecífico que se une a la proteína BCMA recubierta sobre plástico a la dosis indicada. La columna 10 muestra la CE₅₀ de lisis de células tumorales U266 mediada por anticuerpos biespecíficos en presencia de linfocitos pan-T humanos. La columna 11 muestra el porcentaje de lisis de células tumorales U266 en presencia de anticuerpos biespecíficos y linfocitos pan-T humanos a una dosis de 333 ng/ml de anticuerpo biespecífico. La columna 12 muestra la afinidad de unión a proteína del brazo anti-CD3 del anticuerpo biespecífico medida por Octet. La columna 13 muestra el valor de MFI para la unión del anticuerpo biespecífico a células Jurkat.

Figura 4. Lisis de células tumorales mediada por anticuerpos biespecíficos. Se sometieron a prueba siete anticuerpos biespecíficos α CD3_{fam2}: α BCMA, cada uno con un brazo anti-CD3 único y un brazo anti-BCMA común, para determinar su capacidad de destruir células tumorales U266 BCMA⁺ a través de redirección de los linfocitos T primarios activados. En este experimento, las células U266 que expresan BCMA se mezclaron con linfocitos pan-T activados en una relación de E:T de 10:1 junto con la adición de anticuerpo biespecífico. El eje de abscisas muestra la concentración de anticuerpo usada y el eje de ordenadas muestra el % de lisis de células tumorales 6 horas después de la adición del anticuerpo.

Figura 5. Actividad de destrucción biespecífica de U266 correlacionada con la liberación de IL-2. En el diagrama de dispersión se muestra una comparación de la actividad de lisis de células tumorales mediada por anticuerpos biespecíficos con la liberación de citocinas IL-2. La correlación entre la producción de IL-2 y la lisis de células tumorales U266 es $R^2 = 0,37$.

Figura 6. Actividad de destrucción biespecífica de U266 correlacionada con la liberación de IFN- γ . En el diagrama de dispersión se muestra una comparación de la actividad de lisis de células tumorales mediada por anticuerpos biespecíficos con la liberación de citocinas IFN- γ . La correlación entre la producción de IFN- γ y la lisis de células tumorales U266 es $R^2 = 0,53$.

Figura 7. Actividad de destrucción biespecífica de U266 correlacionada con la afinidad de unión anti-CD3. En el diagrama de dispersión se muestra una comparación de la actividad de lisis de células tumorales U266 mediada por anticuerpos biespecíficos con la afinidad de unión anti-CD3. La correlación entre la CE₅₀ de destrucción de U266 y la afinidad de unión a proteína es $R^2 = 0,93$.

Figura 8A-8D. Lisis de células tumorales mediada por anticuerpos biespecíficos. Se ensayaron anticuerpos biespecíficos α CD3_{F1F}: α BCMA para determinar la capacidad de destruir tres células tumorales BCMA⁺ diferentes y una línea celular BCMA negativa a través de redirección de los linfocitos T primarios activados. En este experimento, las células tumorales se mezclaron con linfocitos pan-T activados en una relación de E:T de 10:1 junto con la adición de anticuerpo biespecífico. La figura 8A muestra la destrucción de células RPMI-8226, la figura 8B muestra la destrucción de células NCI-H929, la figura 8C muestra la destrucción de células U-266 y la figura 8D muestra la destrucción de células K562, un control negativo. El eje de abscisas muestra la concentración de anticuerpo usada y el eje de ordenadas muestra el % de lisis de células tumorales 6 horas después de la adición del anticuerpo.

Figuras 9A-9D. Liberación de IL-2 mediada por anticuerpos biespecíficos. El nivel de liberación de citocinas IL-2 se midió después de cultivar linfocitos T humanos en reposo con diversas líneas celulares tumorales y dosis crecientes del anticuerpo biespecífico α CD3_F1F:aBCMA. La figura 9A muestra la liberación de IL-2 estimulada por células RPMI-8226, la figura 9B muestra la liberación de IL-2 estimulada por células NCI-H929, la figura 9C muestra la liberación de IL-2 estimulada por células U-266 y la figura 9D muestra la liberación de IL-2 estimulada por células K562, un control negativo.

Figuras 10A-10D. Liberación de IFN- γ mediada por anticuerpos biespecíficos. El nivel de liberación de citocinas IFN- γ se midió después de cultivar linfocitos T humanos en reposo con diversas líneas celulares tumorales y dosis crecientes del anticuerpo biespecífico α CD3_F1F:aBCMA. La figura 10A muestra la liberación de IFN- γ estimulada por células RPMI-8226, la figura 10B muestra la liberación de IFN- γ estimulada por células NCI-H929, la figura 10C muestra la liberación de IFN- γ estimulada por células U-266 y la figura 10D muestra la liberación de IFN- γ estimulada por células K562, un control negativo.

Descripción detallada

Para facilitar la comprensión de la invención, a continuación se definen varios términos.

Debe entenderse que la terminología usada en la presente memoria tiene el propósito de describir realizaciones particulares únicamente, y no pretende limitar el alcance de la presente invención, que estará limitado únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

Debe observarse que, como se usa en la presente memoria y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un/o", "una" y "el/la" incluyen referentes en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, la referencia a "un fármaco candidato" se refiere a uno o mezclas de dichos candidatos, y la referencia a "el método" incluye la referencia a etapas y métodos equivalentes conocidos por los expertos en la técnica, etc.

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que entiende habitualmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Todas las publicaciones mencionadas en la presente memoria tienen el propósito de describir y divulgar los dispositivos, formulaciones y metodologías que se describen en la publicación y que podrían usarse en relación con la invención descrita en la presente.

Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, hasta la décima parte de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto indique claramente lo contrario, entre el límite superior e inferior de ese intervalo y cualquier otro valor establecido o intermedio en ese intervalo establecido está incluido dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden incluirse de forma independiente en los intervalos más pequeños y también se incluyen dentro de la invención, sujetos a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo establecido. Cuando el intervalo establecido incluye uno o ambos de los límites, los intervalos que excluyen cualquiera de los dos límites incluidos también se incluyen en la invención.

En la siguiente descripción, se exponen numerosos detalles específicos para proporcionar una comprensión más completa de la presente invención. Sin embargo, será evidente para un experto en la técnica que la presente invención puede ponerse en práctica sin uno o más de estos detalles específicos. En otros casos, no se han descrito rasgos y procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica para evitar complicar la invención.

En general, se emplean en la presente invención métodos convencionales de síntesis de proteínas, cultivo celular recombinante y aislamiento de proteínas, y técnicas de ADN recombinante dentro de las habilidades de la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía, véase, por ejemplo, Maniatis, Fritsch y Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982); Sambrook, Russell y Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2001); Harlow, Lane y Harlow, Using Antibodies: A Laboratory Manual: Portable Protocol No. 1, Cold Spring Harbor Laboratory (1998); y Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory; (1988).

Definiciones

Por "comprender" se entiende que los elementos citados son necesarios en la composición/método/kit, pero pueden incluirse otros elementos para formar la composición/método/kit, etc., dentro del alcance de la reivindicación.

Por "que consiste esencialmente en", se entiende una limitación del alcance de la composición o método descrito a los materiales o etapas especificados que no afectan de forma material a la característica o características básicas y novedosas de la presente invención.

Por "que consiste en", se entiende la exclusión de la composición, método o kit de cualquier elemento, etapa o ingrediente no especificado en la reivindicación.

Los términos "tratamiento", "tratar" y similares se usan en la presente memoria para indicar en general la obtención de un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir completa o parcialmente una enfermedad o síntoma de la misma y/o puede ser terapéutico en términos de una cura parcial o

completa de una enfermedad y/o efecto adverso atribuible a la enfermedad. El término "tratamiento", como se usa en la presente memoria, cubre cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero e incluye: (a) prevenir la aparición de la enfermedad en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad, pero que aún no se ha diagnosticado que la tiene; (b) inhibir la enfermedad, es decir, detener su desarrollo; o (c) aliviar la enfermedad, es decir, provocar la regresión de la enfermedad. El agente terapéutico se puede administrar antes, durante o después de manifestarse la enfermedad o lesión. El tratamiento de la enfermedad en curso, donde el tratamiento estabiliza o reduce los síntomas clínicos indeseables del paciente, es de particular interés. Dicho tratamiento se realiza deseablemente antes de la pérdida completa de la función en los tejidos afectados. El presente tratamiento puede administrarse durante la fase sintomática de la enfermedad y, en algunos casos, después de la fase sintomática de la enfermedad.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de agente activo que es necesaria para conferir un beneficio terapéutico a un sujeto. Por ejemplo, una "cantidad terapéuticamente eficaz" es una cantidad que induce, mejora o provoca de otro modo una mejora en los síntomas patológicos, la progresión de la enfermedad o las condiciones fisiológicas asociadas con una enfermedad o que mejora la resistencia a un trastorno.

Los términos "sujeto", "individuo" y "paciente" se usan indistintamente en la presente memoria para referirse a un mamífero que se está evaluando para su tratamiento y/o que se está tratando. En una realización, el mamífero es un ser humano. Los términos "sujeto", "individuo" y "paciente" abarcan, sin limitación, individuos que tienen cáncer, individuos con enfermedades autoinmunitarias, con infecciones por patógenos y similares. Los sujetos pueden ser humanos, pero también pueden incluir otros mamíferos, particularmente aquellos mamíferos útiles como modelos de laboratorio para enfermedades humanas, por ejemplo, ratones, ratas, etc.

Los términos "cáncer", "neoplasia" y "tumor" se usan indistintamente en la presente memoria para referirse a células que presentan un crecimiento autónomo, no regulado, de manera que presentan un fenotipo de crecimiento aberrante caracterizado por una pérdida significativa de control sobre la proliferación celular. Las células de interés para detección, análisis o tratamiento en la presente solicitud incluyen células precancerosas (por ejemplo, benignas), malignas, premetastásicas, metastásicas y no metastásicas. Se conocen cánceres de prácticamente todos los tejidos. La expresión "carga cancerosa" se refiere a la cantidad de células cancerosas o volumen del cáncer en un sujeto. Por consiguiente, reducir la carga cancerosa se refiere a reducir el número de células cancerosas o el volumen del cáncer en un sujeto. La expresión "célula cancerosa", como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier célula que sea una célula cancerosa o que derive de una célula cancerosa, por ejemplo, un clon de una célula cancerosa. Los expertos en la técnica conocen muchos tipos de cáncer, incluyendo tumores sólidos, tales como carcinomas, sarcomas, glioblastomas, melanomas, linfomas, mielomas, etc., y cánceres del sistema circulatorio, tales como leucemias, incluyendo específicamente leucemias de linfocitos B, leucemias de linfocitos T, etc. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer cervicouterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer de las vías urinarias, cáncer de tiroides, cáncer renal, carcinoma, melanoma, cáncer de cabeza y cuello y cáncer cerebral.

"Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos" y "ADCC" se refieren a una reacción mediada por células en la que células citotóxicas inespecíficas que expresan los receptores de Fc, tales como los linfocitos citolíticos naturales, neutrófilos y macrófagos, reconocen el anticuerpo unido en una célula diana y provocan la lisis de la célula diana. La actividad de ADCC puede evaluarse usando métodos, tales como los descritos en la patente de EE. UU. n.º 5,821,337. ADCP se refiere a fagocitosis mediada por células dependiente de anticuerpos.

Las "células efectoras" son leucocitos que expresan uno o más receptores de la región constante y realizan funciones efectoras.

Una "citocina" es una proteína liberada por una célula para actuar sobre otra célula como mediador intercelular. Citocinas de interés incluyen, sin limitación, las citocinas liberadas de linfocitos T activados, por ejemplo, IL-2, IFN γ , etc.

"No inmunógeno" se refiere a un material que no inicia, provoca o potencia una respuesta inmunitaria donde la respuesta inmunitaria incluye las respuestas inmunitarias adaptativas y/o innatas.

El término "aislado" significa que el material se retira de su entorno original (por ejemplo, el entorno natural si se produce de forma natural). Por ejemplo, un polinucleótido o polipéptido de origen natural presente en un animal vivo no está aislado, pero el mismo polinucleótido o polipéptido, separado de algunos o todos los materiales coexistentes en el sistema natural, está aislado. Dichos polinucleótidos podrían formar parte de un vector y/o dichos polinucleótidos o polipéptidos podrían formar parte de una composición, y aun estar aislados porque dicho vector o composición no forma parte de su entorno natural.

"Excipiente farmacéuticamente aceptable" significa un excipiente que es útil para preparar una composición farmacéutica que en general es segura, atóxica y deseable, e incluye excipientes que son aceptables para uso veterinario, así como para uso farmacéutico en seres humanos. Dichos excipientes pueden ser sólidos, líquidos, semisólidos o, en el caso de una composición de aerosol, gaseosos.

"Sales y ésteres farmacéuticamente aceptables" significa sales y ésteres que son farmacéuticamente aceptables y tienen las propiedades farmacológicas deseadas. Dichas sales incluyen sales que se pueden formar cuando los protones ácidos presentes en los compuestos pueden reaccionar con bases inorgánicas u orgánicas. Las sales inorgánicas adecuadas incluyen las formadas con los metales alcalinos, por ejemplo, sodio y potasio, magnesio, calcio y aluminio. Las sales orgánicas adecuadas incluyen las formadas con bases orgánicas, tales como las bases amínicas, por ejemplo, etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, trometamina, N-metilglucamina y similares. Dichas sales también incluyen sales de adición de ácido formadas con ácidos inorgánicos (por ejemplo, ácido clorhídrico y ácido bromhídrico) y ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido acético, ácido cítrico, ácido maleico y los ácidos alcanosulfónicos y arenosulfónicos, tales como ácido metanosulfónico y ácido bencenosulfónico). Los ésteres farmacéuticamente aceptables incluyen ésteres formados a partir de grupos carboxi, sulfoniloxy y fosfonoxi presentes en los compuestos, por ejemplo, ésteres alquílicos C₁₋₆. Cuando hay dos grupos ácidos presentes, una sal o éster farmacéuticamente aceptable puede ser una monosal o monoéster de monoácido o una disal o diéster; y de manera similar, cuando hay más de dos grupos ácidos presentes, algunos o todos dichos grupos pueden estar salificados o esterificados. Los compuestos nombrados en esta invención pueden estar presentes en forma no salificada o no esterificada, o en forma salificada y/o esterificada, y la denominación de dichos compuestos pretende incluir tanto el compuesto original (no salificado y no esterificado) como sus sales y ésteres farmacéuticamente aceptables. Además, determinados compuestos nombrados en esta invención pueden estar presentes en más de una forma estereoisomérica, y la denominación de dichos compuestos pretende incluir todos los estereoisómeros individuales y todas las mezclas (ya sean racémicas o de otro tipo) de dichos estereoisómeros.

Las expresiones "farmacéuticamente aceptable", "fisiológicamente tolerable" y sus variaciones gramaticales, cuando se refieren a composiciones, vehículos, diluyentes y reactivos, se usan indistintamente y representan que los materiales tienen capacidad de administración a o sobre un ser humano sin producir efectos fisiológicos indeseables en un grado que prohibiría la administración de la composición.

La "homología" entre dos secuencias se determina por la identidad de secuencia. Si dos secuencias, que se van a comparar entre sí, difieren en longitud, la identidad de secuencia se refiere preferiblemente al porcentaje de los residuos nucleotídicos de la secuencia más corta que son idénticos a los residuos nucleotídicos de la secuencia más larga. La identidad de secuencia se puede determinar convencionalmente con el uso de programas informáticos tales como el programa Bestfit (Wisconsin Sequence Analysis Package, versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive Madison, Wis. 53711). Bestfit utiliza el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2 (1981), 482-489, para encontrar el segmento que tiene la mayor identidad de secuencia entre dos secuencias. Cuando se usa Bestfit u otro programa de alineación de secuencias para determinar si una secuencia particular tiene, por ejemplo, un 95 % de identidad con una secuencia de referencia de la presente invención, los parámetros se ajustan preferiblemente de manera que el porcentaje de identidad se calcule sobre toda la longitud de la secuencia de referencia y que se permitan brechas de homología de hasta un 5 % del número total de nucleótidos en la secuencia de referencia. Cuando se usa Bestfit, los denominados parámetros opcionales se dejan preferiblemente en sus valores preestablecidos ("predeterminados"). Las desviaciones que aparecen en la comparación entre una secuencia dada y las secuencias de la invención descritas anteriormente pueden deberse, por ejemplo, a adición, eliminación, sustitución, inserción o recombinación. Dicha comparación de secuencias también se puede llevar a cabo preferiblemente con el programa "fasta20u66" (versión 2.0u66, septiembre de 1998 de William R. Pearson y la Universidad de Virginia; véase también W. R. Pearson (1990), *Methods in Enzymology* 183, 63-98, ejemplos adjuntos y <http://workbench.sdsc.edu/>). Para ello, se pueden usar los ajustes de parámetros "predeterminados".

"Variante" se refiere a polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos que difieren en cierta medida de un polipéptido de secuencia natural. Normalmente, las variantes de secuencia de aminoácidos poseerán al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia, más preferiblemente, al menos aproximadamente un 90 % de homología por secuencia. Las variantes de secuencia de aminoácidos pueden poseer sustituciones, eliminación y/o inserciones en determinadas posiciones dentro de la secuencia de aminoácidos de referencia.

El término "vector", como se usa en la presente memoria, pretende referirse a una molécula de ácido nucleico que puede transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle circular de ADN bicatenario en el que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector vírico, en donde se pueden ligar segmentos de ADN adicionales en el genoma vírico. Determinados vectores pueden replicarse de forma autónoma en una célula hospedadora en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episómicos de mamífero). Otros vectores (por ejemplo, vectores no episómicos de mamífero) pueden integrarse en el genoma de una célula hospedadora tras su introducción en la célula hospedadora, y de ese modo, se replican junto con el genoma del hospedador. Además, determinados vectores pueden dirigir la expresión de los genes a los que están unidos de forma funcional. Dichos vectores se denominan en la presente memoria "vectores de expresión recombinantes" (o simplemente, "vectores recombinantes"). En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante están con frecuencia en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" se pueden usar indistintamente, ya que el plásmido es la forma de vector más habitualmente usada.

La expresión "célula hospedadora" (o "célula hospedadora recombinante"), como se usa en la presente memoria, pretende referirse a una célula que se ha alterado genéticamente o que puede alterarse genéticamente mediante la

introducción de un polinucleótido exógeno, tal como un plásmido o vector recombinante. Debe entenderse que dichas expresiones pretenden referirse no solo a la célula en cuestión particular sino a la descendencia de dicha célula. Debido a que pueden producirse determinadas modificaciones en las generaciones sucesivas debido a mutaciones o a influencias ambientales, dicha descendencia puede, de hecho, no ser idéntica a la célula original, pero aun así estar incluida dentro del alcance de la expresión "célula hospedadora" como se usa en la presente memoria.

La "afinidad de unión" en general se refiere a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un solo sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo u otra molécula de unión) y su pareja de unión (por ejemplo, un antígeno o receptor). La afinidad de una molécula X por su pareja Y en general puede representarse mediante la constante de disociación (Kd). La afinidad se puede medir mediante métodos comunes conocidos en la técnica, incluyendo los que descritos en la presente memoria. Los anticuerpos de baja afinidad se unen débilmente al antígeno (o receptor) y tienden a disociarse fácilmente, mientras que los anticuerpos de alta afinidad se unen al antígeno (o receptor) más fuertemente y permanecen unidos durante más tiempo.

A menos que se indique específicamente lo contrario, el término "conjugado", como se describe y reivindica en la presente memoria, se define como una molécula heterogénea formada por la unión covalente de uno o más fragmentos de anticuerpo a una o más moléculas de polímero, en donde la molécula heterogénea es soluble en agua, es decir, soluble en líquidos fisiológicos tales como sangre, y en donde la molécula heterogénea está libre de cualquier agregado estructurado. Un conjugado de interés es PEG. En el contexto de la definición anterior, la expresión "agregado estructurado" se refiere a (1) cualquier agregado de moléculas en solución acuosa que tenga una estructura esferoide o de cubierta esferoide, de modo que la molécula heterogénea no esté en una micela u otra estructura de emulsión, y no esté anclada a una bicapa lipídica, vesícula o liposoma; y (2) cualquier agregado de moléculas en forma sólida o insolubilizada, tal como una matriz de microesferas de cromatografía, que no libere la molécula heterogénea en solución al entrar en contacto con una fase acuosa. Por consiguiente, el término "conjugado", como se define en la presente memoria, abarca la molécula heterogénea mencionada anteriormente en un precipitado, sedimento, matriz bioerosionable u otro sólido que pueda liberar la molécula heterogénea en una solución acuosa tras la hidratación del sólido.

La palabra "marcador", cuando se usa en la presente memoria, se refiere a un compuesto o composición detectable que se conjuga directa o indirectamente con el anticuerpo. El marcador en sí mismo puede ser detectable por sí mismo (por ejemplo, marcadores de radioisótopos o marcadores fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar la alteración química de un compuesto o composición de sustrato que sea detectable.

Por "fase sólida" se entiende una matriz no acuosa a la que se puede adherir el anticuerpo de la presente invención. Ejemplos de fases sólidas incluidas en la presente memoria incluyen las formadas parcial o totalmente de vidrio (por ejemplo, vidrio de poro controlado), polisacáridos (por ejemplo, agarosa), poliacrilamidas, poliestireno, poli(alcohol vinílico) y siliconas. En determinadas realizaciones, dependiendo del contexto, la fase sólida puede comprender el pocillo de una placa de ensayo; en otras, es una columna de purificación (por ejemplo, una columna de cromatografía de afinidad). Esta expresión también incluye una fase sólida discontinua de partículas diferenciadas, tales como las descritas en la patente de EE. UU. n.º 4,275,149.

Los anticuerpos, también denominados inmunoglobulinas, comprenden convencionalmente al menos una cadena pesada y una ligera, donde el dominio aminoterminal de la cadena pesada y ligera es de secuencia variable, por tanto, se denomina comúnmente dominio de la región variable o dominio pesado variable (VH) o dominio ligero variable (VL). Los dos dominios se asocian convencionalmente para formar una región de unión específica, aunque, como también se describirá aquí, la unión específica también se puede obtener con secuencias variables únicamente de la cadena pesada, y en la técnica se conocen y usan una variedad de configuraciones no naturales de anticuerpos.

Un anticuerpo o molécula de unión a antígeno "funcional" o "biológicamente activa" (incluyendo anticuerpos únicamente de cadena pesada y moléculas tricaténarias biespecíficas similares a anticuerpos (ATC) (en la presente memoria) es una que puede ejercer una o más de sus actividades naturales en acontecimientos estructurales, reguladores, bioquímicos o biofísicos. Por ejemplo, un anticuerpo funcional u otra molécula de unión, por ejemplo, TCA, puede tener la capacidad de unirse específicamente a un antígeno y la unión, a su vez, puede provocar o alterar un acontecimiento celular o molecular, tal como la transducción de señalización o la actividad enzimática. Un anticuerpo funcional u otra molécula de unión, por ejemplo, TCA, también puede bloquear la activación del ligando de un receptor o actuar como agonista o antagonista. La capacidad de un anticuerpo u otra molécula de unión, por ejemplo, TCA, de ejercer una o más de sus actividades naturales depende de varios factores, incluyendo el plegamiento y ensamblaje adecuados de las cadenas polipeptídicas.

El término "anticuerpo" en la presente memoria se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, monómeros, dímeros, multímeros, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), anticuerpos solo de cadena pesada, anticuerpos tricaténarios, Fv monocatenarios, nanocuerpos, etc., y también incluye fragmentos de anticuerpo, siempre que presenten la actividad biológica deseada (Miller *et al.* (2003) *Jour. of Immunology* 170:4854-4861). Los anticuerpos pueden ser murinos, humanos, humanizados, quiméricos o derivados de otras especies.

El término anticuerpo puede hacer referencia a una cadena pesada de longitud completa, una cadena ligera de longitud completa, una molécula de inmunoglobulina intacta; o una parte inmunológicamente activa de cualquiera de estos polipéptidos, es decir, un polipéptido que comprende un sitio de unión a antígeno que se une inmuno-específicamente a un antígeno de una diana de interés o parte de la misma, dichas dianas incluyendo, pero sin limitarse a, células cancerosas o células que producen anticuerpos autoinmunitarios asociados con una enfermedad autoinmunitaria. La inmunoglobulina descrita en la presente memoria puede ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD e IgA), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase de molécula de inmunoglobulina, incluyendo subclases manipuladas con partes Fc alteradas que proporcionan actividad reducida o potenciada de las células efectoras. Las inmunoglobulinas pueden derivar de cualquier especie. En un aspecto, la inmunoglobulina es de origen principalmente humano.

El término "variable" se refiere al hecho de que determinadas partes de los dominios variables difieren ampliamente en la secuencia entre los anticuerpos y se usan en la unión a y la especificidad de cada anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no está distribuida uniformemente por todos los dominios variables de los anticuerpos. Se concentra en tres segmentos denominados regiones hipervariables, tanto en los dominios variables de la cadena ligera como de la cadena pesada. Las partes más altamente conservadas de los dominios variables se denominan regiones flanqueantes (FR). Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera naturales comprenden cada uno cuatro FR, que adoptan en gran medida una configuración de lámina beta, conectadas por tres regiones hipervariables, que forman bucles que conectan y, en algunos casos, forman parte de la estructura de lámina beta. Las FR mantienen juntas en cercana proximidad las regiones hipervariables en cada cadena y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (véase Kabat *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.). Los dominios constantes no participan directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

La expresión "región hipervariable", cuando se usa en la presente memoria, se refiere a los residuos aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable puede comprender residuos aminoácidos de una "región determinante de la complementariedad" o "CDR", y/o aquellos residuos de un "bucle hipervariable". Los residuos de "región flanqueante" o "FR" son aquellos residuos del dominio variable distintos de los residuos de la región hipervariable como se definen en la presente memoria.

Las regiones variables de interés incluyen al menos una secuencia de CDR de las regiones variables de la familia 2 proporcionadas en la presente memoria, normalmente al menos 2 secuencias de CDR y, más habitualmente, 3 secuencias de CDR. En la presente memoria se muestran designaciones de CDR ejemplares, sin embargo, un experto en la técnica entenderá que se usan habitualmente varias definiciones de las CDR, incluyendo la definición de Kabat (véase "Zhao *et al.* A germline knowledge based computational approach for determining antibody complementarity determining regions." *Mol Immunol.* 2010; 47:694-700), que se basa en la variabilidad de secuencia y es la más habitualmente usada. La definición de Chothia se basa en la ubicación de las regiones de bucle estructural (Chothia *et al.* "Conformations of immunoglobulin hypervariable regions." *Nature.* 1989; 342:877-883). Definiciones alternativas de CDR de interés incluyen, sin limitación, las descritas por Honegger, "Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and analysis tool." *J Mol Biol.* 2001; 309:657-670; Ofra *et al.* "Automated identification of complementarity determining regions (CDRs) reveals peculiar characteristics of CDRs and B cell epitopes." *J Immunol.* 2008; 181:6230-6235; Almagro "Identification of differences in the specificity-determining residues of antibodies that recognize antigens of different size: implications for the rational design of antibody repertoires." *J Mol Recognit.* 2004; 17:132-143; y Padlan *et al.* "Identification of specificity-determining residues in antibodies." *Faseb J.* 1995; 9:133-139.

La expresión "anticuerpo monoclonal", como se usa en la presente memoria, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que la población comprende son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos y se dirigen contra un solo sitio antigénico. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales, que incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un solo determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos ya que pueden sintetizarse sin estar contaminados por otros anticuerpos. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo que se obtiene de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, y no debe interpretarse como que requiera la producción del anticuerpo mediante ningún método particular.

Los anticuerpos de la presente memoria incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes de anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de las cadenas o cadenas es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes de anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada (patente de EE. UU. n.º 4,816,567; y Morrison *et al.* (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81:6851-6855). Anticuerpos quiméricos de interés en la presente memoria incluyen anticuerpos "primatizados" que comprenden secuencias de unión a antígeno del dominio variable derivadas de un primate no

humano (por ejemplo, simios inferiores del Viejo Mundo, simios superiores, etc.) y secuencias de regiones constantes humanas.

Una "cadena de anticuerpo intacta", como se usa en la presente memoria, es una que comprende una región variable de longitud completa y una región constante de longitud completa (Fc). Un anticuerpo "convencional" intacto comprende una cadena ligera intacta y una cadena pesada intacta, así como un dominio constante de la cadena ligera (CL) y los dominios constantes de la cadena pesada, CH1, de bisagra, CH2 y CH3 para la IgG secretada. Otros isotipos, tales como IgM o IgA, pueden tener diferentes dominios CH. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencia natural (por ejemplo, dominios constantes humanos de secuencia natural) o variantes de secuencia de aminoácidos de los mismos. El anticuerpo intacto puede tener una o más "funciones efectoras", que se refieren a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región constante Fc (una región Fc de secuencia natural o una región Fc variante de secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo. Ejemplos de funciones efectoras del anticuerpo incluyen unión a C1q; citotoxicidad dependiente del complemento; unión al receptor de Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC); fagocitosis; y la regulación por disminución de receptores de superficie celular. Las variantes de la región constante incluyen aquellas que alteran el perfil efector, la unión a los receptores de Fc y similares.

Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del Fc (dominio constante) de sus cadenas pesadas, se pueden proporcionar anticuerpos y diversas proteínas de unión a antígeno como clases diferentes. Hay cinco clases principales de regiones Fc de la cadena pesada: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas pueden dividirse además en "subclases" (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. Los dominios constantes Fc que corresponden a las diferentes clases de anticuerpos pueden denominarse α , δ , ω , γ y μ , respectivamente. Las estructuras de subunidades y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas. Las formas de Ig incluyen modificaciones con bisagra o formas sin bisagra (Roux *et al.* (1998) J. Immunol. 161:4083-4090; Lund *et al.* (2000) Eur. J. Biochem. 267:7246-7256; documento US 2005/0048572; documento US 2004/0229310). Las cadenas ligeras de los anticuerpos de cualquier especie de vertebrado pueden asignarse a uno de dos tipos, denominados κ y λ , en función de las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

Una "región Fc funcional" posee una "función efectora" de una región Fc de secuencia natural. Las funciones efectoras ejemplares incluyen unión a C1q; CDC; unión al receptor de Fc; ADCC; ADCP; regulación por disminución de receptores de superficie celular (por ejemplo, el receptor de linfocitos B), etc. Dichas funciones efectoras en general requieren que la región Fc interactúe con un receptor, por ejemplo, los receptores Fc γ RI, Fc γ RIIA, Fc γ RIIB1, Fc γ RIIB2, Fc γ RIIIA, Fc γ RIIIB, y el receptor FcRn de baja afinidad, y pueden evaluarse usando diversos ensayos como se describe, por ejemplo, en las definiciones de la presente memoria. Un Fc "muerto" es uno que se ha mutagenizado para conservar la actividad con respecto a, por ejemplo, prolongar la semivida en suero, pero que no activa un receptor de Fc de alta afinidad.

Una "región Fc de secuencia natural" comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de aminoácidos de una región Fc encontrada en la naturaleza. Regiones Fc humanas de secuencia natural incluyen, por ejemplo, una región Fc de IgG1 humana de secuencia natural (alotipos no A y A); una región Fc de IgG2 humana de secuencia natural; una región Fc de IgG3 humana de secuencia natural; y una región Fc de IgG4 humana de secuencia natural, así como variantes de origen natural de las mismas.

Una "región Fc variante" comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de la de una región Fc de secuencia natural como consecuencia de al menos una modificación aminoacídica, preferiblemente una o más sustituciones aminoacídicas. Preferiblemente, la región Fc variante tiene al menos una sustitución aminoacídica en comparación con una región Fc de secuencia natural o con la región Fc de un polipéptido original, por ejemplo, de aproximadamente una a aproximadamente diez sustituciones aminoacídicas, y preferiblemente de aproximadamente una a aproximadamente cinco sustituciones aminoacídicas en una región Fc de secuencia natural o en la región Fc del polipéptido original. La región Fc variante de la presente memoria poseerá preferiblemente al menos aproximadamente un 80 % de homología con una región Fc de secuencia natural y/o con una región Fc de un polipéptido original, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente un 90 % de homología con la misma, más preferiblemente al menos aproximadamente un 95 % de homología con la misma.

Las secuencias de Fc variantes pueden incluir tres sustituciones aminoacídicas en la región CH2 para reducir la unión de Fc γ RI en las posiciones 234, 235 y 237 del índice EU (véase Duncan *et al.*, (1988) Nature 332:563). Dos sustituciones aminoacídicas en el sitio de unión a C1q del complemento en las posiciones 330 y 331 del índice EU reducen la fijación del complemento (véase Tao *et al.*, J. Exp. Med. 178:661 (1993) y Canfield y Morrison, J. Exp. Med. 173:1483 (1991)). La sustitución en IgG1 humana de residuos de IgG2 en las posiciones 233-236 y residuos de IgG4 en las posiciones 327, 330 y 331 reduce considerablemente la ADCC y la CDC (véase, por ejemplo, Armour KL. *et al.*, 1999 Eur J Immunol. 29(8):2613-24; y Shields RL. *et al.*, 2001. J Biol Chem. 276(9):6591-604). Son posibles otras variantes de Fc, incluyendo, sin limitación, una en la que se elimina una región que puede formar un enlace disulfuro, o en la que determinados residuos aminoacídicos se eliminan en el extremo N terminal de una forma Fc natural o se añade a la misma un residuo de metionina. Por tanto, en una realización de la invención, una o más partes Fc de la molécula scFc pueden comprender una o más mutaciones en la región de bisagra para eliminar los enlaces disulfuro. En otra realización más, la región de bisagra de un Fc se puede eliminar por completo. En otra realización más, la molécula puede comprender una variante de Fc.

Además, se puede construir una variante de Fc para eliminar o reducir sustancialmente las funciones efectoras al sustituir, eliminar o añadir residuos aminoacídicos para lograr la unión al complemento o la unión al receptor de Fc. Por ejemplo, y sin limitación, puede producirse una eliminación en un sitio de unión al complemento, tal como un sitio de unión a C1q. Se describen técnicas para preparar dichos derivados de secuencia del fragmento Fc de inmunoglobulina en las publicaciones de patente internacional n.º WO 97/34631 y WO 96/32478. Además, el dominio Fc puede modificarse mediante fosforilación, sulfatación, acilación, glucosilación, metilación, farnesilación, acetilación, amidación y similares.

El Fc puede estar en la forma que tiene cadenas glucídicas naturales, cadenas glucídicas aumentadas en comparación con una forma natural o cadenas glucídicas disminuidas en comparación con la forma natural, o puede estar en una forma aglucosilada o desglucosilada. El aumento, la disminución, la eliminación u otra modificación de las cadenas glucídicas se pueden conseguir mediante métodos comunes en la técnica, tales como un método químico, un método enzimático o expresándolas en una línea celular de producción genomanipulada. Dichas líneas celulares pueden incluir microorganismos, por ejemplo, *Pichia pastoris*, y líneas celulares de mamífero, por ejemplo, células CHO, que expresan de forma natural enzimas glucosilantes. Además, los microorganismos o células pueden manipularse para que expresen enzimas glucosilantes, o pueden convertirse en incapaces de expresar enzimas de glucosilación (véase, por ejemplo, Hamilton, *et al.*, Science, 313:1441 (2006); Kanda, *et al.*, J. Biotechnology, 130:300 (2007); Kitagawa, *et al.*, J. Biol. Chem., 269 (27): 17872 (1994); Ujita-Lee *et al.*, J. Biol. Chem., 264 (23): 13848 (1989); Imai-Nishiya, *et al.*, BMC Biotechnology 7:84 (2007); y el documento WO 07/055916). Como ejemplo de una célula manipulada para que tenga actividad de sialilación alterada, el gen de la alfa-2,6-sialiltransferasa 1 se ha manipulado en células de ovario de hámster chino y en células sf9. Por tanto, los anticuerpos expresados por estas células manipuladas están sialilados por el producto génico exógeno. Otro método para obtener moléculas de Fc que tienen una cantidad modificada de residuos glucídicos en comparación con una pluralidad de moléculas naturales incluye separar dicha pluralidad de moléculas en fracciones glucosiladas y no glucosiladas, por ejemplo, usando cromatografía de afinidad por lectina (véase, por ejemplo, el documento WO 07/117505). Se ha demostrado que la presencia de fracciones de glucosilación particulares altera la función de las inmunoglobulinas. Por ejemplo, la eliminación de las cadenas glucídicas de una molécula de Fc provoca una fuerte disminución de la afinidad de unión a la parte C1q del primer componente del complemento C1 y una disminución o pérdida en la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) o de la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), por lo que no se inducen respuestas inmunitarias innecesarias *in vivo*. Modificaciones importantes adicionales incluyen sialilación y fucosilación: la presencia de ácido siálico en IgG se ha correlacionado con la actividad antiinflamatoria (véase, por ejemplo, Kaneko *et al.*, Science 313:760 (2006)), mientras que la eliminación de la fucosa de la IgG da lugar a actividad ADCC potenciada (véase, por ejemplo, Shoji-Hosaka, *et al.*, J. Biochem., 140:777 (2006)).

En realizaciones alternativas, los anticuerpos de la invención pueden tener una secuencia Fc con funciones efectoras potenciadas, por ejemplo, al aumentar sus capacidades de unión a FcγRIIIA y al aumentar la actividad ADCC. Por ejemplo, la fucosa unida al glucano ligado a N^{en} Asn-297 del Fc impide estéricamente la interacción del Fc con FcγRIIIA, y la eliminación de la fucosa mediante glucomanipulación puede aumentar la unión a FcγRIIIA, lo que se traduce en una actividad ADCC >50 veces mayor en comparación con los controles de IgG1 naturales. La manipulación proteínica, mediante mutaciones aminoacídicas en la parte Fc de IgG1, ha generado múltiples variantes que aumentan la afinidad de la unión de Fc a FcγRIIIA. En particular, el mutante triple de alanina S298A/E333A/K334A presenta un aumento de 2 veces en la unión a FcγRIIIA y a la función ADCC. Las variantes S239D/I332E (2X) y S239D/I332E/A330L (3X) tienen un aumento significativo en la afinidad de unión a FcγRIIIA y un aumento de la capacidad de ADCC *in vitro* e *in vivo*. En modelos de xenoinjerto de ratón, otras variantes de Fc identificadas por presentación en levadura también mostraron una unión mejorada a FcγRIIIA y una destrucción potenciada de células tumorales. Véase, por ejemplo, Liu *et al.* (2014) JBC 289(6):3571-90.

La expresión "anticuerpo que comprende región Fc" se refiere a un anticuerpo que comprende una región Fc. La lisina C terminal (residuo 447 según el sistema de numeración EU) de la región Fc puede eliminarse, por ejemplo, durante la purificación del anticuerpo o mediante manipulación recombinante del ácido nucleico que codifica el anticuerpo. Por consiguiente, un anticuerpo que tiene una región Fc según esta invención puede comprender un anticuerpo con o sin K447.

"Fv" es el fragmento mínimo de anticuerpo, que contiene un sitio completo de reconocimiento de antígeno y unión a antígeno. Los anticuerpos de unión a CD3 descritos en la presente memoria comprenden un dímero de un dominio variable de la cadena pesada y uno de la cadena ligera en asociación estrecha, no covalente; sin embargo, anticuerpos adicionales, por ejemplo, para su uso en una configuración multiespecífica, pueden comprender un VH en ausencia de una secuencia VL. Incluso un solo dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solo tres regiones hipervariables específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque la afinidad puede ser menor que la del sitio de unión de dos dominios.

El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' se diferencian de los fragmentos Fab por la adición de unos pocos residuos en el extremo carboxílico del dominio CH1 de la cadena pesada incluyendo una o más cisteínas de la región de bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la denominación en la presente memoria para Fab', en la que el residuo o residuos de cisteína de los dominios constantes contienen al menos un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas de bisagra entre ellos. También se

conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

Formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, roedores), incluyendo anticuerpos monocatenarios, son anticuerpos quiméricos (incluyendo anticuerpos monocatenarios) que contienen una secuencia mínima derivada de una inmunoglobulina no humana. Véase, por ejemplo, Jones *et al.*, (1986) *Nature* 321:522-525; Chothia *et al.* (1989) *Nature* 342:877; Riechmann *et al.* (1992) *J. Mol. Biol.* 224, 487-499; Foote y Winter, (1992) *J. Mol. Biol.* 224:487-499; Presta *et al.* (1993) *J. Immunol.* 151, 2623-2632; Werther *et al.* (1996) *J. Immunol. Methods* 157:4986-4995; y Presta *et al.* (2001) *Thromb. Haemost.* 85:379-389. Para más detalles, véanse las patentes de EE. UU. n.º 5,225,539; 6,548,640; 6,982,321; 5,585,089; 5,693,761; 6,407,213; Jones *et al.* (1986) *Nature*, 321:522-525; y Riechmann *et al.* (1988) *Nature* 332:323-329.

La expresión "anticuerpo monocatenario", como se usa en la presente memoria, significa una sola cadena polipeptídica que contiene uno o más dominios de unión a antígeno que se unen a un epítipo de un antígeno, donde dichos dominios derivan de o tienen identidad de secuencia con la región variable de la cadena pesada o ligera de un anticuerpo. Partes de dicha región variable pueden estar codificadas por segmentos génicos V_H o V_L, segmentos génicos D y J_H o segmentos génicos J_L. La región variable puede estar codificada por segmentos génicos V_HDJ_H, V_LDJ_L, V_HJ_L o V_LJ_L reordenados. Los segmentos génicos V, D y J pueden derivar de seres humanos y varios animales incluyendo aves, peces, tiburones, mamíferos, roedores, primates no humanos, camélidos, lamas, conejos y similares.

Los anticuerpos de unión a CD3 encuentran utilidad particular en configuraciones multiespecíficas, que incluyen, sin limitación, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos trifuncionales, etc. Se conoce una gran variedad de métodos y configuraciones proteínicas y se usan en anticuerpos monoclonales biespecíficos (BsMAb), anticuerpos triespecíficos, etc.

Los BsMAb de primera generación consistían en dos cadenas pesadas y dos ligeras, cada una de dos anticuerpos diferentes. Las dos regiones Fab están dirigidas contra dos antígenos. La región Fc está formada por las dos cadenas pesadas y forma el tercer sitio de unión con el receptor de Fc en los inmunocitos (véase, por ejemplo, Lindhofer *et al.*, *The Journal of Immunology*, vol. 155, pág. 219-225, 1995). Los anticuerpos pueden ser de la misma especie o de especies diferentes. Por ejemplo, las líneas celulares que expresan anticuerpos de rata y ratón secretan Ab biespecíficos funcionales debido al emparejamiento preferencial de cadenas pesadas y ligeras restringido por especie. En otros ejemplos, las regiones Fc están diseñadas para que solo acoplen juntas de maneras específicas.

Otros tipos de anticuerpos biespecíficos incluyen Fab unidos químicamente, que consisten solo en las regiones Fab. Dos fragmentos Fab o Fab2 unidos químicamente forman un anticuerpo artificial que se une a dos antígenos diferentes, lo que lo convierte en un tipo de anticuerpo biespecífico. Los fragmentos de unión a antígeno (Fab o Fab2) de dos anticuerpos monoclonales diferentes se producen y se unen por medios químicos como un tioéter (véase Glennie, M J *et al.*, *Journal of immunology* 139, pág. 2367-75, 1987; Peter Borchmann *et al.*, *Blood*, vol. 100, n.º 9, pág. 3101-3107, 2002).

Se han desarrollado otros diversos métodos para la producción de anticuerpos artificiales multivalentes fusionando de forma recombinante dominios variables de dos anticuerpos. Un fragmento variable monocatenario (scFv) es una proteína de fusión de las regiones variables de la cadena pesada (VH) y la ligera (VL) de las inmunoglobulinas, conectadas con un péptido conector corto de diez a aproximadamente 25 aminoácidos. El conector habitualmente es rico en glicina para mayor flexibilidad, así como en serina o treonina para su solubilidad, y puede conectar el extremo N del VH con el extremo C del VL, o viceversa. Los fragmentos variables monocatenarios biespecíficos (di-scFv, bi-scFv) pueden manipularse mediante unión de dos scFv con diferentes especificidades. Se produce una sola cadena peptídica con dos regiones VH y dos VL, lo que produce scFv bivalentes.

Los scFv biespecíficos en tándem también se conocen como acopladores de linfocitos T biespecíficos (BiTE). Los scFv biespecíficos se pueden crear con péptidos conectores que son demasiado cortos para que las dos regiones variables se plieguen juntas (aproximadamente cinco aminoácidos), lo que obliga a los scFv a dimerizar. Este tipo se conoce como diacuerpos (Adams *et al.*, *British journal of cancer* 77, pág. 1405-12, 1998). La tecnología de plataforma de redirección de doble afinidad (DART) (MacroGenics, Rockville, Md.). Esta tecnología de proteínas de fusión usa dos fragmentos variables monocatenarios (scFv) de diferentes anticuerpos en una sola cadena peptídica de aproximadamente 55 kilodalton. SCORPION Therapeutics (Emergent Biosolutions, Inc., Seattle, Wash.) combina dos dominios de unión a antígeno en una proteína monocatenaria. Un dominio de unión está en el extremo C y un segundo dominio de unión en el extremo N de un dominio efector, basándose en las regiones Fc de inmunoglobulina.

Las proteínas similares a anticuerpos tetravalentes y biespecíficos también incluyen DVD-Ig que se manipulan a partir de dos anticuerpos monoclonales (Wu, C. *et al.*, *Nature Biotechnology*, 25, pág. 1290-1297, 2007). Para construir la molécula DVD-Ig, los dominios V de los dos mAb se fusionan en tándem mediante un conector corto (TVAAP) con el dominio variable de la primera cadena ligera (VL) del anticuerpo en el extremo N, seguido de VL y Ck del otro anticuerpo para formar la cadena ligera de la proteína DVD-Ig. De manera similar, las regiones variables de la cadena pesada (VH) de los dos mAb se fusionan en tándem mediante un conector corto (ASTKGP) con el primer anticuerpo en el extremo N, seguido del otro anticuerpo y los dominios constantes de la cadena pesada para formar la cadena pesada de la proteína DVD-Ig (VH1/VL1). Todos los dominios constantes de la cadena ligera y la cadena pesada se conservan en el diseño DVD-Ig, ya que son cruciales para la formación de una molécula similar a IgG completa unida

por disulfuro. La cotransfección de células de mamífero con vectores de expresión que codifican la cadena ligera y la cadena pesada de DVD-Ig da lugar a la secreción de una sola especie de una molécula similar a IgG con un peso molecular de aproximadamente 200 kDa. Esta molécula tiene ahora cuatro sitios de unión, 2 de cada mAb.

La expresión "molécula similar a anticuerpo de trícatenario biespecífico" o "TCA" se usa en la presente memoria para referirse a moléculas similares a anticuerpo que comprenden, que consisten esencialmente en o que consisten en tres subunidades polipeptídicas, de las que dos comprenden, consisten esencialmente en o consisten en una cadena pesada y una ligera de un anticuerpo monoclonal, o fragmentos funcionales de unión a antígeno de dichas cadenas de anticuerpo, que comprenden una región de unión a antígeno y al menos un dominio CH. Este par de cadena pesada/cadena ligera tiene especificidad de unión por un primer antígeno. La tercera subunidad polipeptídica comprende, consiste esencialmente en o consiste en un anticuerpo solo de cadena pesada que comprende una parte Fc que comprende dominios CH2 y/o CH3 y/o CH4, en ausencia de un dominio CH1, y un dominio de unión a antígeno que se une a un epítipo de un segundo antígeno o un epítipo diferente del primer antígeno, donde dicho dominio de unión deriva de o tiene identidad de secuencia con la región variable de una cadena pesada o ligera de anticuerpo. Partes de dicha región variable pueden estar codificadas por segmentos génicos V_H y/o V_L, segmentos génicos D y J_H o segmentos génicos J_L. La región variable puede estar codificada por segmentos génicos V_HDJ_H, V_LDJ_L, V_HJ_L o V_LJ_L reordenados.

Una proteína TCA hace uso de un "anticuerpo solo de cadena pesada" o "anticuerpo de cadena pesada" o "polipéptido de cadena pesada", como se usa en la presente memoria, significa un anticuerpo monocatenario que comprende las regiones constantes de la cadena pesada CH2 y/o CH3 y/o CH4, pero no el dominio CH1. En una realización, el anticuerpo de cadena pesada está compuesto por un dominio de unión a antígeno, al menos parte de una región de bisagra y los dominios CH2 y CH3. En otra realización, el anticuerpo de cadena pesada está compuesto por un dominio de unión a antígeno, al menos parte de una región de bisagra y un dominio CH2. En una realización adicional, el anticuerpo de cadena pesada está compuesto por un dominio de unión a antígeno, al menos parte de una región de bisagra y un dominio CH3. Los anticuerpos de cadena pesada en los que el dominio CH2 y/o CH3 está truncado también se incluyen en la presente memoria. En una realización adicional, la cadena pesada está compuesta por un dominio de unión a antígeno y al menos un dominio CH (CH1, CH2, CH3 o CH4), pero no una región de bisagra. El anticuerpo solo de cadena pesada puede estar en forma de dímero, en el que dos cadenas pesadas están unidas por disulfuro, de lo contrario, unidas covalentemente o no covalentemente entre sí. El anticuerpo de cadena pesada puede pertenecer a la subclase IgG, pero los anticuerpos que pertenecen a otras subclases, tales como las subclases IgM, IgA, IgD e IgE, también se incluyen en la presente memoria. En una realización particular, el anticuerpo de cadena pesada es del subtipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, en particular del subtipo IgG1.

Los anticuerpos de cadena pesada constituyen aproximadamente una cuarta parte de los anticuerpos IgG producidos por los camélidos, por ejemplo, camellos y llamas (Hamers-Casterman C., *et al.* *Nature* 363, 446-448 (1993)). Estos anticuerpos están formados por dos cadenas pesadas, pero carecen de cadenas ligeras. Como consecuencia, la parte variable de unión a antígeno se denomina dominio VHH y representa el sitio de unión a antígeno intacto de origen natural más pequeño, con solo aproximadamente 120 aminoácidos de longitud (Desmyter, A., *et al.* *J. Biol. Chem.* 276, 26285-26290 (2001)). Los anticuerpos de cadena pesada con una alta especificidad y afinidad pueden generarse contra una variedad de antígenos mediante inmunización (van der Linden, R. H., *et al.* *Biochim. Biophys. Acta* 1431, 37-46 (1999)) y la parte VHH se puede clonar y expresar fácilmente en levaduras (Frenken, L. G. J., *et al.* *J. Biotechnol.* 78, 11-21 (2000)). Sus niveles de expresión, solubilidad y estabilidad son significativamente más altos que los de los fragmentos F(ab) o Fv clásicos (Ghahroudi, M. A. *et al.* *FEBS Lett.* 414, 521-526 (1997)). También se ha demostrado que los tiburones tienen un solo dominio similar a VH en sus anticuerpos denominado VNAR. (Nuttall *et al.* *Eur. J. Biochem.* 270, 3543-3554 (2003); Nuttall *et al.* *Function and Bioinformatics* 55, 187-197 (2004); Dooley *et al.*, *Molecular Immunology* 40, 25-33 (2003)).

Un anticuerpo o una molécula de unión a antígeno, incluyendo los anticuerpos solo de cadena pesada y las moléculas similares a anticuerpo trícatenario biespecífico (ATC), en la presente memoria, "que se une" a un antígeno de interés, es una que se une al antígeno con suficiente afinidad de modo que el anticuerpo o molécula de unión sea útil como agente de diagnóstico y/o terapéutico para abordar el antígeno, y no reaccione de forma cruzada significativamente con otras proteínas. En dichas realizaciones, el grado de unión del anticuerpo u otra molécula de unión a un antígeno no diana no será superior a un 10 %, determinado por análisis de clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) o radioinmunoprecipitación (RIA).

Proteínas

La presente invención proporciona un anticuerpo biespecífico, que comprende:

(a) un primer resto de unión específico para CD3 humano; en donde el primer resto de unión comprende:

(i) una primera subunidad polipeptídica que comprende un dominio variable de la cadena pesada (VH) que comprende una CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de GFTFDDYA (SEQ ID NO: 29), una CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de ISWNSGSI (SEQ ID NO: 24) y una CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de AKDSRGYGDYRLGGAY (SEQ ID NO: 41) en una región flanqueante humana; y

(ii) una segunda subunidad polipeptídica que comprende un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende una CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de QSVSSN (SEQ ID NO: 35), una CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de GAS (SEQ ID NO: 38) y una CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de QQYNNWPWT (SEQ ID NO: 45); y

5 (b) un segundo resto de unión específico para BCMA humano, en donde el segundo resto de unión comprende:

(i) una tercera subunidad polipeptídica que comprende un dominio VH que comprende una CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de GFTVSSYG (SEQ ID NO: 36), una CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de IRGSDGST (SEQ ID NO: 39) y una CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de AKQGENDGPFDH (SEQ ID NO: 46).

10 En algunas realizaciones, las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 en el dominio VL de la segunda subunidad polipeptídica están presentes en una región flanqueante de VL humana. En algunas realizaciones, la primera subunidad polipeptídica comprende un dominio VH que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, o la segunda subunidad polipeptídica comprende un dominio VL que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19. En algunas realizaciones, la primera subunidad polipeptídica comprende un dominio VH que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y la segunda subunidad polipeptídica comprende un dominio VL que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19. En algunas realizaciones, la tercera subunidad polipeptídica comprende un dominio VH que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21. En algunas realizaciones, la tercera subunidad polipeptídica tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20.

La presente invención proporciona además un anticuerpo biespecífico, que comprende:

20 (a) un primer resto de unión específico para CD3 humano; en donde el primer resto de unión comprende una primera subunidad polipeptídica que comprende un dominio VH que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una segunda subunidad polipeptídica que comprende un dominio VL que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19; y

25 (b) un segundo resto de unión específico para BCMA humano, en donde el segundo resto de unión comprende una tercera subunidad polipeptídica que comprende un dominio VH que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21.

En algunas realizaciones, la tercera subunidad polipeptídica comprende un primer dominio VH que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 y un segundo dominio VH que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21, en donde el primer dominio VH y el segundo dominio VH están dispuestos en una configuración en tándem.

30 En algunas realizaciones, el primer dominio VH y el segundo dominio VH de la tercera subunidad polipeptídica están dispuestos en una configuración en tándem y se unen mediante un conector.

La presente invención proporciona además un anticuerpo biespecífico, que comprende:

35 (a) un primer resto de unión específico para CD3 humano; en donde el primer resto de unión comprende una primera subunidad polipeptídica que comprende un dominio VH que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una segunda subunidad polipeptídica que comprende un dominio VL que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19; y

(b) un segundo resto de unión específico para BCMA humano, en donde el segundo resto de unión comprende una tercera subunidad polipeptídica que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20.

40 Se describe una familia de anticuerpos muy relacionados que se unen a y activan la señalización a través de CD3, por ejemplo, la activación de linfocitos T CD3⁺. Los anticuerpos dentro de la familia comprenden un conjunto de secuencias CDR como se definen en la presente memoria, y se ejemplifican mediante las secuencias de VH proporcionadas de SEQ ID NO: 1-18. La familia de anticuerpos proporciona varios beneficios que contribuyen a la utilidad como agente o agentes terapéuticos clínicos. Los anticuerpos dentro de la familia incluyen miembros con un intervalo de afinidades de unión, lo que permite la selección de una secuencia específica con una afinidad deseada. La capacidad de ajustar la afinidad es de particular importancia para controlar el nivel de activación de CD3 en un individuo que se esté tratando, y reducir de ese modo la toxicidad. Por ejemplo, si se abordan antígenos tumorales poco abundantes (menos de 10 000 moléculas por célula), se cuanta con que se prefieren aglutinantes de CD3 de alta afinidad (<30 nM). Si se abordan antígenos tumorales muy abundantes (más de 50 000 moléculas por célula), se prefieren aglutinantes de CD3 de baja afinidad (>50 nM). Se puede evaluar, por separado de la afinidad, la propensión del anticuerpo a inducir la liberación de citocinas cuando se une a un linfocito T, por ejemplo, la liberación de IL-2, IFN γ , etc., donde puede ser deseable una liberación reducida de citocinas.

55 Se puede seleccionar un anticuerpo adecuado de los proporcionados en la presente memoria para su desarrollo y uso, incluyendo, sin limitación, su uso como anticuerpo biespecífico. La determinación de la afinidad por una proteína candidata se puede realizar usando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediciones de Biacore, etc. Los miembros de la familia de anticuerpos pueden tener una afinidad por CD3 con una K_d de aproximadamente 10⁻⁶ a aproximadamente 10⁻¹¹, incluyendo, sin limitación: de aproximadamente 10⁻⁶ a aproximadamente 10⁻¹⁰; de

aproximadamente 10^{-6} a aproximadamente 10^{-9} ; de aproximadamente 10^{-6} a aproximadamente 10^{-8} ; de aproximadamente 10^{-8} a aproximadamente 10^{-11} ; de aproximadamente 10^{-8} a aproximadamente 10^{-10} ; de aproximadamente 10^{-8} a aproximadamente 10^{-9} ; de aproximadamente 10^{-9} a aproximadamente 10^{-11} ; de aproximadamente 10^{-9} a aproximadamente 10^{-10} ; o cualquier valor dentro de estos intervalos. La selección por afinidad puede confirmarse con una evaluación biológica para la activación de linfocitos T en, por ejemplo, un modelo in vitro o preclínico, y evaluación de la posible toxicidad. La determinación de la liberación de citocinas se puede evaluar usando cualquier método conveniente, incluyendo, sin limitación, los ensayos descritos en los ejemplos.

La participación del receptor de linfocitos T (TCR), por la unión de complejos MH-péptido o de anticuerpos anti-TCR/CD3, inicia la activación de linfocitos T. Ejemplos de anticuerpos anti-TCR/CD3 que activan los linfocitos T son OKT3 y UCHT1. Estos anticuerpos anti-CD3 compiten de forma cruzada por la unión a CD3 en linfocitos T y se usan de forma rutinaria en ensayos de activación de linfocitos T. Los anticuerpos anti-CD3 de esta invención compiten de forma cruzada con OKT3 por la unión a CD3 humano. Dependiendo de la afinidad de unión por CD3 y el epítipo en CD3, los anticuerpos anti-CD3 activaron los linfocitos T con diferentes resultados funcionales. La incubación in vitro de linfocitos T humanos con anticuerpos anti-CD3 de baja afinidad provocó una activación incompleta de los linfocitos T y una baja producción de IL-2 e IL-10. Por el contrario, los aglutinantes de CD3 de alta afinidad activaron los linfocitos T para producir significativamente más IL-2 y otras citocinas. Los anticuerpos anti-CD3 de baja afinidad se consideran agonistas parciales que inducen selectivamente algunas funciones efectoras, una potente destrucción del tumor y una regulación por aumento de CD69, sin inducir otras, tales como la producción de IL-2 e IL-10. Los aglutinantes de alta afinidad de esta invención son agonistas completos que activan muchas funciones efectoras inmunitarias de los linfocitos T. La fuerza de la interacción con CD3 y el epítipo reconocido provocó una activación cualitativamente diferente de los linfocitos T. La producción máxima de citocinas por parte de los linfocitos T activados por anticuerpos anti-CD3 de baja afinidad fue inferior a la activación máxima por anticuerpos anti-CD3 de alta afinidad. En algunas realizaciones, un anticuerpo de la invención provoca una liberación menor de una de IL-2 e IL-10 o ambas cuando se combina con linfocitos T en un ensayo de activación, en comparación con un anticuerpo anti-CD3 de referencia en el mismo ensayo, donde el anticuerpo de referencia puede ser ID 304703 (SEQ ID NO: 22) o un anticuerpo de afinidad equivalente. La liberación máxima de IL-2 y/o IL-10 puede ser inferior a aproximadamente un 75 % de la liberación por el anticuerpo de referencia, inferior a aproximadamente un 50 % de la liberación por el anticuerpo de referencia, inferior a aproximadamente un 25 % de la liberación por el anticuerpo de referencia y puede ser inferior a aproximadamente un 10 % de la liberación por un anticuerpo de referencia.

Los anticuerpos biespecíficos o multiespecíficos, que pueden tener cualquiera de las configuraciones analizadas en la presente memoria, incluyen, sin limitación, uno biespecífico tricatenario. Los anticuerpos biespecíficos comprenden al menos la región variable de la cadena pesada de un anticuerpo específico para una proteína distinta de CD3, y pueden comprender una región variable de la cadena pesada y ligera. En algunas de dichas realizaciones, el segundo anticuerpo se une con especificidad a un antígeno asociado a tumor, un antígeno diana, por ejemplo, integrinas, etc., un antígeno patógeno, una proteína de punto de control y similares. Diversos formatos de anticuerpos biespecíficos están dentro del ámbito de la invención, incluyendo, sin limitación, polipéptidos monocatenarios, polipéptidos bicatenarios, polipéptidos tricatenarios, polipéptidos tetracatenarios y múltiplos de los mismos.

La familia de anticuerpos específicos de CD3 comprende un dominio VH, que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 en una región flanqueante de VH humana. Las secuencias de CDR pueden estar situadas, como ejemplo, en la región de alrededor de los residuos aminoácidos 26-33, 51-58 y 97-112 para CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, de las secuencias de la región variable ejemplares proporcionadas expuestas en SEQ ID NO: 1-18. Un experto en la técnica entenderá que las secuencias de CDR pueden estar en una posición diferente si se selecciona una secuencia flanqueante diferente, aunque en general el orden de las secuencias seguirá siendo el mismo.

Las secuencias de CDR para un anticuerpo de la familia 2 pueden tener las siguientes fórmulas de secuencia. Una X indica un aminoácido variable, que pueden ser aminoácidos específicos como se indica a continuación.

CDR1 G₁ F₂ T₃ F₄ X₅ X₆ Y₇ A₈

donde:

X₅ puede ser cualquier aminoácido; por ejemplo, X₅ puede ser D, A o H; según la invención, X₅ es D.

X₆ puede ser cualquier aminoácido; por ejemplo, X₆ puede ser D o N; según la invención, X₆ es D.

Una secuencia CDR1 de un anticuerpo anti-CD3 de la familia 2 puede comprender la secuencia expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 1-18, residuos 26-33.

CDR2 I₁' S₂' W₃' N₄' S₅' G₆' S₇' I₈'

Una secuencia CDR2 de un anticuerpo anti-CD3 de la familia 2 puede comprender la secuencia expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 1-18, residuos 51-58.

CDR3 A₁' K₂' D₃' S₄' R₅' G₆' Y₇' G₈' X₉' Y₁₀' X₁₁' X₁₂' G₁₃' G₁₂' A₁₅' Y₁₆'

donde:

X₉ puede ser cualquier aminoácido, por ejemplo, X₉ puede ser D o S; según la invención, X₉ es D;

X₁₁ puede ser cualquier aminoácido, por ejemplo, X₁₁ puede ser R o S;

X₁₂ puede ser cualquier aminoácido, por ejemplo, X₁₂ puede ser L o R.

- 5 Una secuencia de CD3 de un anticuerpo anti-CD3 de la familia 2 puede tener la fórmula A K D S R G Y G D Y X₁₁ X₁₂ G G A Y donde X₁₁ y X₁₂ son como se definen anteriormente. Una secuencia CDR3 de un anticuerpo anti-CD3 de la familia 2 puede comprender la secuencia expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 1-18, residuos 97-112.

- 10 El dominio VH de unión a CD3 puede emparejarse con un dominio de región variable de la cadena ligera. En algunas de dichas realizaciones, la cadena ligera es una cadena ligera fija. En algunas realizaciones, la cadena ligera comprende un dominio VL con secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 en una región flanqueante de VL humana. Las secuencias de CDR pueden ser las de SEQ ID NO: 19. En algunas realizaciones, la secuencia CDR1 comprende los residuos aminoácidos 27-32; 50-52; 89-97 para CDR1, CDR2, CDR3, respectivamente.

- 15 Las secuencias de CDR de un anticuerpo de la familia 2 pueden tener una secuencia con al menos un 85 % de identidad, al menos un 90 % de identidad, al menos un 95 % de identidad, al menos un 99 % de identidad con respecto a una secuencia de CDR o conjunto de secuencias de CDR en una cualquiera de SEQ ID NO: 1-18. En algunos ejemplos, una secuencia de CDR comprende una, dos, tres o más sustituciones aminoácidas con respecto a una secuencia de CDR o conjunto de secuencias de CDR en una cualquiera de SEQ ID NO: 1-18. En algunos ejemplos, dicha una o más sustituciones aminoácidas son una o más de la posición 5 o 10 de CDR1, la posición 2, 6 o 7 de CDR2, la posición 1, 8, 9 o 10 de CDR3, con respecto a las fórmulas proporcionadas anteriormente.

- 20 En un anticuerpo biespecífico descrito en la presente memoria, un resto de unión, es decir, la combinación de VH/VL o solo VH, es específico para CD3 humano, mientras que el otro brazo puede ser específico para células diana, incluyendo células cancerosas, tales como células de cáncer de ovario, mama, gastrointestinal, cerebro, cabeza y cuello, próstata, colon y pulmón, y similares, así como tumores hemáticos tales como tumores de linfocitos B, incluyendo leucemias, linfomas, sarcomas, carcinomas, tumores de células neurales, carcinomas escamocelulares, tumores de células germinativas, metástasis, tumores indiferenciados, seminomas, melanomas, mielomas, neuroblastomas, tumores de células mixtas, neoplasias provocadas por agentes infecciosos y otras neoplasias malignas, células infectadas por un patógeno, células autorreactivas que provocan inflamación y/o autoinmunidad. El resto que no es CD3 también puede ser específico para una proteína inmunorreguladora, como se describirá en la presente memoria.

- 30 Los antígenos asociados a tumor (TAA) están relativamente restringidos a células tumorales, mientras que los antígenos específicos de tumor (TSA) son exclusivos de células tumorales. Los TSA y los TAA típicamente son partes de moléculas intracelulares expresadas en la superficie celular como parte del complejo principal de histocompatibilidad.

- 35 Los antígenos de diferenciación específicos de tejido son moléculas presentes en células tumorales y sus homólogos celulares normales. Los antígenos asociados a tumor que se sabe que los reconocen los mAb terapéuticos se clasifican en varias categorías diferentes. Los antígenos de diferenciación hematopoyética son glucoproteínas que habitualmente se asocian con agrupaciones de grupos de diferenciación (CD) e incluyen CD20, CD30, CD33 y CD52. Los antígenos de diferenciación de superficie celular son un grupo diverso de glucoproteínas y lípidos que se encuentran en la superficie tanto de células normales como tumorales. Los antígenos que intervienen en la señalización del crecimiento y la diferenciación son con frecuencia factores de crecimiento y receptores de factores de crecimiento. Los factores de crecimiento que son dianas de los anticuerpos en pacientes con cáncer incluyen CEA, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR; también conocido como ERBB1), ERBB2 (también conocido como HER2), ERBB3, MET (también conocido como HGFR), receptor del factor 1 de crecimiento insulínico (IGF1R), receptor de efrina A3 (EPHA3), receptor 1 de ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (TNF) (TRAILR1; también conocido como TNFRSF10A), TRAILR2 (también conocido como TNFRSF10B) y activador receptor del ligando de factor-κB nuclear (RANKL; también conocido como TNFSF11). Los antígenos implicados en la angiogénesis habitualmente son proteínas o factores de crecimiento que sustentan la formación de microvasculatura nueva, incluyendo factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), receptor de VEGF (VEGFR), integrina αVβ3 e integrina α5β1. El estroma tumoral y la matriz extracelular son estructuras de soporte indispensables para un tumor.
- 50 Los antígenos del estroma y la matriz extracelular, que son dianas terapéuticas, incluyen proteína de activación de fibroblastos (FAP) y tenascina.

- 55 Ejemplos de anticuerpos terapéuticos útiles en configuraciones biespecíficas incluyen, sin limitación, rituximab; ibritumomab; tiuxetan; tositumomab; brentuximab; vedotina; gemtuzumab; ozogamicina; alemtuzumab; IGN101; adecatumumab; labetuzumab; huA33; pemtumomab; oregovomab; CC49 (minretumomab); cG250; J591; MOv18; MORAb-003 (farletuzumab); 3F8, ch14.18; KW-2871; hu3S193; IgN311; bevacizumab; IM-2C6; CDP791; etaracizumab; volociximab; cetuximab, panitumumab, nimotuzumab; 806; trastuzumab; pertuzumab; MM-121; AMG 102, METMAB; SCH 900105; AVE1642, IMC-A12, MK-0646, R1507; CP 751871; KB004; IIIA4; mapatumumab (HGS-ETR1); HGS-ETR2; CS-1008; denosumab; sibrotuzumab; F19; y 81C6.

Los receptores de punto de control inmunitario que se han estudiado más activamente en el contexto de inmunoterapia clínica contra el cáncer, el antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA4; también conocido como CD152) y la proteína 1 de muerte celular programada (PD1; también conocida como CD279), son receptores inhibidores. La actividad clínica de los anticuerpos que bloquean cualquiera de estos receptores implica que la inmunidad antitumoral se puede potenciar en múltiples niveles y que se pueden diseñar estrategias combinatorias de forma inteligente, guiándose por consideraciones mecanicistas y modelos preclínicos.

Los dos ligandos de PD1 son el ligando 1 de PD1 (PDL1; también conocido como B7-H1 y CD274) y PDL2 (también conocido como B7-DC y CD273). PDL1 se expresa en células cancerosas y, a través de la unión a su receptor PD1 en linfocitos T, inhibe la activación/función de los linfocitos T.

El gen 3 de activación linfocítica (LAG3; también conocido como CD223), 2B4 (también conocido como CD244), el atenuador de linfocitos B y T (BTLA; también conocido como CD272), la proteína 3 de membrana de linfocitos T (TIM3; también conocida como HAVcr2), el receptor de adenosina A2a (A2aR) y la familia de receptores inhibidores de destrucción se han asociado cada uno con la inhibición de la actividad de los linfocitos, y en algunos casos, la inducción de anergia linfocítica. La dirección a anticuerpos de estos receptores puede usarse en los métodos de la invención.

Los agentes que agonizan una molécula coestimuladora inmunitaria también son útiles en los métodos de la invención. Dichos agentes incluyen agonistas de CD40 y OX40. CD40 es una proteína coestimuladora encontrada en células presentadoras de antígeno (APC) y es necesaria para su activación. Estas APC incluyen fagocitos (macrófagos y células dendríticas) y linfocitos B. CD40 forma parte de la familia de receptores de TNF. Las principales moléculas de señalización activadoras de CD40 son IFN γ y el ligando de CD40 (CD40L). La estimulación a través de CD40 activa los macrófagos.

Los anticuerpos anti-CCR4 (CD194) de interés incluyen anticuerpos monoclonales humanizados dirigidos contra el receptor 4 de quimiocinas C-C (CCR4) con posibles actividades antiinflamatorias y antineoplásicas. CCR2 se expresa en macrófagos inflamatorios que se pueden encontrar en diversas afecciones inflamatorias, por ejemplo, artritis reumatoide; y también se ha identificado que se expresa en macrófagos promotores de tumores. CCR2 también se expresa en linfocitos T reguladores, y el ligando de CCR2, CCL2, media el reclutamiento de linfocitos T reguladores en tumores. Los linfocitos T reguladores suprimen la respuesta de los linfocitos T antitumorales y, por tanto, se desea su inhibición o agotamiento.

Producción de proteínas de la invención

La presente invención proporciona además uno o más polinucleótidos que codifican el anticuerpo biespecífico de la invención.

La presente invención proporciona además uno o más vectores que comprenden el uno o más polinucleótidos de la invención.

La presente invención proporciona además una célula que comprende el uno o más vectores de la invención.

La presente invención proporciona además un método de producción de un anticuerpo biespecífico, que comprende cultivar la célula de la invención en condiciones permisivas para la expresión del anticuerpo biespecífico y aislar el anticuerpo biespecífico de la célula.

Aunque los anticuerpos pueden prepararse por síntesis química, típicamente se producen por métodos de tecnología de ADN recombinante, tales como la coexpresión de todas las cadenas que forman la proteína en una sola célula hospedadora recombinante, o la coexpresión de un polipéptido de la cadena pesada y un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo humano. Además, las cadenas pesada y ligera del anticuerpo también se pueden expresar usando un solo vector de expresión policistrónico. La purificación de polipéptidos individuales se consigue usando tecnologías convencionales de purificación de proteínas tales como cromatografía de afinidad (proteína A), cromatografía de exclusión por tamaño y/o cromatografía de interacción hidrofoba. Los biespecíficos son lo suficientemente diferentes en tamaño e hidrofobia como para que la purificación pueda realizarse usando procedimientos convencionales.

La cantidad de anticuerpo y polipéptido de la cadena pesada producida en una sola célula hospedadora se puede minimizar a través de manipulación de las regiones constantes del anticuerpo y la cadena pesada de modo que se favorezca la homodimerización sobre la heterodimerización, por ejemplo, al introducir interacciones autocomplementarias (véase, por ejemplo, el documento WO 98/50431 para conocer las posibilidades, tales como las estrategias de "protuberancia en cavidad" (véase el documento WO 96/27011)). Por lo tanto, otro aspecto de la presente invención es proporcionar un método para producir un biespecífico en un hospedador recombinante, incluyendo el método la etapa de: expresar en una célula hospedadora recombinante secuencias de ácido nucleico que codifican al menos dos polipéptidos de la cadena pesada, en donde dichos polipéptidos de la cadena pesada difieren en sus regiones constantes lo suficiente como para reducir o evitar la formación de homodímeros, pero aumentar la formación de biespecíficos.

Cuando la proteína comprende tres cadenas, por ejemplo, FlicAb, puede producirse por coexpresión de las tres cadenas (2 cadenas pesadas y una cadena ligera) que forman la molécula en una sola célula hospedadora

recombinante.

Para la producción recombinante de las proteínas de la presente memoria, se aíslan uno o más ácidos nucleicos que codifican todas las cadenas, por ejemplo, 2, 3, 4, etc., y se insertan en un vector replicable para su posterior clonación (amplificación del ADN) o para su expresión. Hay muchos vectores disponibles. Los componentes del vector en general incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción.

En una realización preferida, la célula hospedadora según el método de la invención puede expresar a alto nivel la inmunoglobulina humana, es decir, al menos 1 pg/célula/día, preferiblemente al menos 10 pg/célula/día e incluso más preferiblemente al menos 20 pg/célula/día o más sin la necesidad de amplificar las moléculas de ácido nucleico que codifican las cadenas individuales en dicha célula hospedadora.

Composición farmacéutica

Otro aspecto de la presente invención es proporcionar composiciones farmacéuticas que comprendan una o más proteínas de la presente invención en mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado. Por tanto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo biespecífico de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos farmacéuticamente aceptables, como se usan en la presente memoria, se ejemplifican, pero no se limitan a, adyuvantes, vehículos sólidos, agua, tampones u otros vehículos usados en la técnica para contener componentes terapéuticos, o combinaciones de los mismos.

Las formulaciones terapéuticas de las proteínas usadas según la presente invención se preparan para su almacenamiento mezclando proteínas que tienen el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables opcionales (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences 16.^a edición Osol, A. Ed. (1980)), tal como en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables son atóxicos para los destinatarios en las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo 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 glúcidos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sal tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN[™], PLURONICS[™] o polietilenglicol (PEG).

Se describen formulaciones de anticuerpo anti-CD3, por ejemplo, en la publicación de patente de EE. UU. n.º 20070065437. Se pueden usar formulaciones similares para las proteínas de la presente invención. Los componentes principales de dichas formulaciones son un agente tamponante del pH eficaz en el intervalo de 3,0 a 6,2, una sal, un tensioactivo y una cantidad eficaz de un biespecífico con especificidad anti-CD3.

Métodos de uso

Se describen métodos para tratar o reducir enfermedades, incluyendo, sin limitación, infección, enfermedad autoinmunitaria, cáncer primario o metastásico, etc. en una pauta que comprende poner en contacto las células diana con una composición de unión a antígeno, particularmente cuando la composición de unión a antígeno es un anticuerpo multiespecífico adecuado para la afección que se está tratando, por ejemplo, cuando un resto de unión se une específicamente a un antígeno asociado a tumor para el tratamiento de las células cancerosas relevantes; un resto de unión específico para un patógeno de interés para el tratamiento de la infección relevante, y similares. Dichos métodos incluyen administrar a un sujeto que necesita tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz o una dosis eficaz de los agentes, incluyendo, sin limitación, combinaciones del reactivo con un fármaco quimioterápico, radioterapia o cirugía.

La presente invención proporciona un anticuerpo biespecífico de la invención para su uso en el tratamiento de un cáncer que expresa BCMA en un sujeto humano que lo necesite.

Las dosis eficaces de las composiciones de la presente invención para el tratamiento de enfermedades varían dependiendo de muchos factores diferentes, incluyendo el medio de administración, el sitio diana, el estado fisiológico del paciente, si el paciente es un ser humano o un animal, otros medicamentos administrados y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Habitualmente, el paciente es un ser humano, pero también se pueden tratar mamíferos no humanos, por ejemplo, animales de compañía tales como perros, gatos, caballos, etc., mamíferos de laboratorio tales como conejos, ratones, ratas, etc., y similares. Las dosis de tratamiento se pueden ajustar para optimizar la seguridad y la eficacia.

Los niveles de dosis pueden determinarse fácilmente por un médico experto en la técnica y pueden modificarse según lo necesario, por ejemplo, según lo necesario para modificar la respuesta de un sujeto al tratamiento. La cantidad de

ingrediente activo que se puede combinar con los materiales de vehículo para producir una sola forma farmacéutica varía dependiendo del hospedador tratado y del modo particular de administración. Las formas farmacéuticas unitarias en general contienen de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 500 mg de un ingrediente activo.

En algunas realizaciones, la dosis terapéutica del agente puede variar de aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg, y más habitualmente de 0,01 a 5 mg/kg, del peso corporal del hospedador. Por ejemplo, las dosis pueden ser de 1 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal o dentro del intervalo de 1-10 mg/kg. Una pauta de tratamiento ejemplar implica la administración una vez cada dos semanas o una vez al mes o una vez cada 3 a 6 meses. Las entidades terapéuticas de la presente invención se administran habitualmente en múltiples ocasiones. Los intervalos entre dosis individuales pueden ser semanales, mensuales o anuales. Los intervalos también pueden ser irregulares, según se indique al medir los niveles en sangre de la entidad terapéutica en el paciente. Como alternativa, las entidades terapéuticas de la presente invención pueden administrarse como una formulación de liberación mantenida, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente. La dosis y la frecuencia varían dependiendo de la semivida del polipéptido en el paciente.

En aplicaciones profilácticas, se puede administrar una dosis relativamente baja a intervalos relativamente poco frecuentes durante un largo periodo de tiempo. Algunos pacientes siguen recibiendo tratamiento durante el resto de sus vidas. En otras aplicaciones terapéuticas, a veces se requiere una dosis relativamente alta a intervalos relativamente cortos hasta que se reduce o detiene la progresión de la enfermedad, y preferiblemente hasta que el paciente muestra una mejoría parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. Después de ello, se puede administrar al paciente una pauta profiláctica.

Otros aspectos incluyen métodos para tratar, reducir o prevenir el crecimiento tumoral, la metástasis tumoral o la invasión tumoral de los cánceres incluyendo carcinomas, cánceres hemáticos tales como leucemias y linfomas, melanomas, sarcomas, gliomas, etc. Para aplicaciones profilácticas, se administran composiciones farmacéuticas o medicamentos a un paciente susceptible a o, de lo contrario, en riesgo de padecer la enfermedad en una cantidad suficiente para eliminar o reducir el riesgo, disminuir la gravedad o retardar el inicio de la enfermedad, incluyendo síntomas bioquímicos, histológicos y/o conductuales de la enfermedad, sus complicaciones y los fenotipos patológicos intermedios que se presentan durante el desarrollo de la enfermedad.

Las composiciones para el tratamiento de la enfermedad se pueden administrar por medio parenteral, tópico, intravenoso, intratumoral, oral, subcutáneo, intraarterial, intracraneal, intraperitoneal, intranasal o intramuscular. Una vía de administración típica es la intravenosa o intratumoral, aunque otras vías pueden ser igual de eficaces.

Típicamente, las composiciones se preparan como inyectables, como soluciones o suspensiones líquidas; también se pueden preparar formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en vehículos líquidos antes de su inyección. La preparación también se puede emulsionar o encapsular en liposomas o micropartículas tales como poliláctido, poliglicólico o copolímero para potenciar el efecto adyuvante, como analiza anteriormente. Langer, Science 249: 1527, 1990 y Hanes, Advanced Drug Delivery Reviews 28: 97-119, 1997. Los agentes de esta invención se pueden administrar en forma de una inyección de liberación prolongada o preparación de implante que se puede formular de tal manera que permita una liberación mantenida o pulsátil del ingrediente activo. Las composiciones farmacéuticas se formulan en general como estériles, sustancialmente isotónicas y en total conformidad con todas las normas de buenas prácticas de fabricación (GMP) de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos.

La toxicidad de las proteínas descritas en la presente memoria puede determinarse por procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales de experimentación, por ejemplo, determinando la DL_{50} (la dosis mortal para un 50 % de la población) o la DL_{100} (la dosis mortal para el 100 % de la población). La relación de dosis entre el efecto tóxico y el terapéutico es el índice terapéutico. Los datos obtenidos de estos ensayos de cultivo celular y estudios en animales pueden usarse para formular un intervalo de dosis que sea atóxico para su uso en seres humanos. La dosis de las proteínas descritas en la presente memoria se encuentra preferiblemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la dosis eficaz con poca o ninguna toxicidad. La dosis puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma farmacéutica empleada y de la vía de administración utilizada. La formulación exacta, la vía de administración y la dosis puede elegirlas el médico individual en vista del estado del paciente.

Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar en una diversidad de formas farmacéuticas unitarias dependiendo del método de administración. Por ejemplo, las formas farmacéuticas unitarias adecuadas para administración oral incluyen, pero no se limitan a, polvo, comprimidos, pastillas, cápsulas y pastillas para chupar. Se reconoce que las composiciones de la invención, cuando se administran por vía oral, deben protegerse de la digestión. Esto se logra típicamente formando complejos de las moléculas con una composición para hacerlas resistentes a la hidrólisis ácida y enzimática, o empaquetando las moléculas en un vehículo adecuadamente resistente, tal como un liposoma o una barrera de protección. Los medios para proteger los agentes de la digestión son bien conocidos en la técnica.

Las composiciones para administración comprenderán comúnmente un anticuerpo u otro agente ablativo disuelto en un vehículo farmacéuticamente aceptable, preferiblemente un vehículo acuoso. Se puede usar una diversidad de vehículos acuosos, por ejemplo, solución salina tamponada y similares. Estas soluciones son estériles y en general

- están exentas de materia indeseable. Estas composiciones pueden esterilizarse por técnicas de esterilización convencionales bien conocidas. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según lo necesario para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes de ajuste y tamponamiento del pH, agentes de ajuste de la toxicidad y similares, por ejemplo, acetato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, lactato de sodio y similares. La concentración del agente activo en estas formulaciones puede variar ampliamente y se seleccionará principalmente en función de los volúmenes de líquido, las viscosidades, el peso corporal y similares según el modo particular de administración seleccionado y las necesidades del paciente (por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Science (15.^a ed., 1980) y Goodman y Gillman, The Pharmacological Basis of Therapeutics (Hardman *et al.*, eds., 1996)).
- 10 También están dentro del alcance de la invención los kits que comprenden los agentes activos y formulaciones de los mismos, de la invención e instrucciones de uso. El kit puede contener además al menos un reactivo adicional, por ejemplo, un fármaco quimioterápico etc. Los kits típicamente incluyen una etiqueta que indica el uso previsto del contenido del kit. El término etiqueta incluye cualquier material escrito o grabado suministrado en o con el kit, o que acompañe al kit de otro modo.
- 15 Las composiciones se pueden administrar para tratamiento terapéutico. Las composiciones se administran a un paciente en una cantidad suficiente para extirpar sustancialmente las células diana, como se describe anteriormente. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como una "dosis terapéuticamente eficaz", que puede proporcionar una mejora en las tasas de supervivencia global. Se pueden administrar administraciones únicas o múltiples de las composiciones dependiendo de la dosis y la frecuencia según lo requiera y tolere el paciente. La dosis particular
- 20 requerida para un tratamiento dependerá del estado médico y los antecedentes del mamífero, así como de otros factores tales como la edad, el peso, el sexo, la vía de administración, la eficacia, etc.

Ejemplos

Ejemplo 1 Ratas genomanipuladas que expresan anticuerpos solo de cadena pesada

- Se construyó un locus de IgH humano y se ensambló en varias partes, lo que implicó la modificación y unión de los genes de la región C de rata, que luego se unieron posteriores a la región V_H6-D-J_H humana. A continuación, se coinyectaron dos BAC con grupos separados de genes de V_H humano con un BAC que codificaba el fragmento ensamblado (V_H6-D-J_H humano-C de rata).
- Se generaron ratas transgénicas portadoras de locus artificiales de inmunoglobulina de cadena pesada en una configuración no reordenada. Los genes de la región constante incluidos codifican el potenciador de IgM, IgD, IgG2b, IgE, IgA y 3'. La RT-PCR y el análisis sérico (ELISA) de ratas transgénicas revelaron un reordenamiento productivo de los locus de inmunoglobulina transgénicos y la expresión de anticuerpos solo de cadena pesada de diversos isotipos en el suero. Las ratas transgénicas se cruzaron con ratas con locus de la cadena pesada y la cadena ligera endógenos mutados descritos previamente en la publicación de patente de EE. UU. 2009/0098134 A1. El análisis de dichos animales demostró la inactivación de la expresión de la cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina de rata y la expresión de alto nivel de anticuerpos de cadena pesada con regiones variables codificadas por genes V, D y J humanos. La inmunización de ratas transgénicas provocó la producción de respuestas séricas de alta concentración de anticuerpos de cadena pesada específicos de antígeno. Estas ratas transgénicas que expresaban anticuerpos de cadena pesada con una región VDJ humana se denominaron UniRats.

Ejemplo 2 Ratas genomanipuladas que expresan anticuerpos de cadena ligera fija

- Se generaron repertorios de anticuerpos humanos transgénicos a partir de cadenas H con diversos reordenamientos (V_H-D-J_H)_n en combinación con una cadena L única. Para esto, se integró una cadena L reordenada, V_k-J_k1-C_k humana, en la línea germinal de la rata mediante microinyección de ADN y los animales transgénicos obtenidos se cruzaron con una cepa de rata descrita previamente que expresa un repertorio de cadenas H humanas de forma natural (Osborn *et al.*, 2013). Esta nueva cepa de rata se denominó OmniFlic.
- Las inmunizaciones de ratas OmniFlic, usando muchos antígenos diferentes, produjeron niveles altos de IgG específica de antígeno, similar a la de otras ratas transgénicas que portan el mismo locus de IgH. El análisis del repertorio mediante RT-PCR identificó reordenamientos altamente variables del gen V_H a niveles altos de transcrito y proteína. Además, solo se identificó un producto de cadena L, también expresado a niveles altos.
- Los aglutinantes específicos de antígeno de OmniFlic se obtuvieron mediante NGS y selección de colecciones de ADNc (levaduras, *E. coli*, fagos) que, tras la secuenciación, identificaron transcritos de la cadena H variados. Para la expresión en células de mamífero, se transfectaron construcciones de la cadena H hipermutadas en combinación con la secuencia de Igk transgénica original. En esta V_k-J_k1-C_k reordenada no se permitieron cambios mutacionales y siempre se expresó la misma cadena L con diversos productos de la cadena H para generar IgG humana monoclonal.

Ejemplo 3 Generación de anticuerpos específicos de antígeno en ratas transgénicas

- Para la generación de anticuerpos de cadena pesada específicos de antígeno en ratas, las ratas genomanipuladas de expresión se inmunizaron de dos maneras.

Inmunización con dominios extracelulares recombinantes de PD-L1 y BCMA. Los dominios extracelulares recombinantes de PD-L1 y BCMA se adquirieron de R&D Systems y se diluyeron con solución salina estéril y se combinaron con adyuvante. Los inmunógenos se combinaron con adyuvante completo de Freund (CFA) y adyuvante incompleto de Freund (IFA) o con los adyuvantes Titermax y Ribi. La primera inmunización (sensibilización) con inmunógeno en CFA o Titermax se administró en las patas izquierda y derecha. Después de la primera inmunización con inmunógenos en CFA, se administraron dos inmunizaciones más en IFA (refuerzos) o 4 inmunizaciones más en Ribi y una más en Titermax en cada pata. Esta secuencia de inmunizaciones da lugar al desarrollo de linfocitos B que producen anticuerpos de alta afinidad. Las concentraciones de inmunógeno fueron de 10 microgramos por pata. Se recogió el suero de las ratas en la exanguinación final para determinar las concentraciones séricas.

- 10 Para la generación de anticuerpos anti-CD3 δ humano, se inmunizaron ratas genomanipuladas usando protocolos de inmunización basados en ADN.

Se inmunizaron ratas OmniFlic con construcciones de CD3- ϵ /delta humanas y de macaco en Aldevron, Inc. (Fargo, ND) usando la tecnología de anticuerpos GENOVAC. Se extrajeron los ganglios linfáticos drenantes después del refuerzo final y se aisló el ARN. Después de la síntesis del ADNc, el repertorio de anticuerpos de cadena pesada IgH se caracterizó mediante secuenciación de nueva generación y nuestro programa informático interno patentado. Se seleccionaron secuencias de VH específicas de antígeno candidatas que mostraban evidencias de una selección positiva específica de antígeno. Se seleccionaron varios cientos de secuencias de VH que codificaban FlicAb para el ensamblaje génico y se clonaron en un vector de expresión. Posteriormente, los anticuerpos IgG1 FlicAb completamente humanos se expresaron en células HEK para su análisis mediante flujo y ELISA. Los FlicAb humanos se sometieron a prueba para determinar su unión a linfocitos T humanos primarios y a células Jurkat por flujo. Además, los FlicAb humanos se sometieron a prueba usando proteínas CD3 $\delta\epsilon$ recombinantes en ELISA. Todos los FlicAb con unión positiva a linfocitos T humanos se enumeran en las figuras 1 y 2. Las secuencias seleccionadas se caracterizaron adicionalmente en ensayos de activación de linfocitos T.

Ejemplo 4 Caracterización de anticuerpos

25 La tabla de datos de la figura 3 resume el comportamiento de los anticuerpos anti-CD3 de la familia 2 en formato monoespecífico y biespecífico. La columna 1 muestra la ID de secuencia para la secuencia de VH anti-CD3. La columna 2 muestra el valor de MFI para la unión a células Jurkat del anticuerpo monoespecífico anti-CD3 precursor. La columna 3 muestra el valor de MFI para la unión a linfocitos T de macaco del anticuerpo monoespecífico anti-CD3 precursor. La columna 4 muestra el nombre del anticuerpo biespecífico α CD3: α BCMA. La columna 5 muestra los picogramos de IL-2 liberados por linfocitos panT estimulados por el anticuerpo biespecífico que se une a la proteína BCMA recubierta sobre plástico a la dosis indicada. La columna 6 muestra los picogramos de IL-6 liberados por linfocitos panT estimulados por el anticuerpo biespecífico que se une a la proteína BCMA recubierta sobre plástico a la dosis indicada. La columna 7 muestra los picogramos de IL-10 liberados por linfocitos panT estimulados por el anticuerpo biespecífico que se une a la proteína BCMA recubierta sobre plástico a la dosis indicada. La columna 8 muestra los picogramos de IFN- γ liberados por linfocitos panT estimulados por el anticuerpo biespecífico que se une a la proteína BCMA recubierta sobre plástico a la dosis indicada. La columna 9 muestra los picogramos de TNF α liberados por linfocitos panT estimulados por el anticuerpo biespecífico que se une a la proteína BCMA recubierta sobre plástico a la dosis indicada. La columna 10 muestra la CE₅₀ de lisis de células tumorales U266 mediada por anticuerpos biespecíficos en presencia de linfocitos pan-T humanos. La columna 11 muestra el porcentaje de lisis de células tumorales U266 en presencia de anticuerpos biespecíficos y linfocitos pan-T humanos a una dosis de 333 ng/ml de anticuerpo biespecífico. La columna 12 muestra la afinidad de unión a proteína del brazo anti-CD3 del anticuerpo biespecífico medida por Octet. La columna 13 muestra el valor de MFI para la unión del anticuerpo biespecífico a células Jurkat.

Ejemplo 5 Caracterización de anticuerpos biespecíficos

45 Se sometieron a prueba siete anticuerpos biespecíficos α CD3_fam2: α BCMA, cada uno con un brazo anti-CD3 único y un brazo anti-BCMA común, para determinar su capacidad de destruir células tumorales U266 BCMA+ a través de redirección de los linfocitos T primarios activados. En este experimento, las células U266 que expresan BCMA se mezclaron con linfocitos pan-T activados en una relación de E:T de 10:1 junto con la adición de anticuerpo biespecífico. Mostrado en la figura 4, el eje de abscisas muestra la concentración de anticuerpo usada y el eje de ordenadas muestra el % de lisis de células tumorales 6 horas después de la adición del anticuerpo.

En el diagrama de dispersión de la figura 5 se muestra una comparación de la actividad de lisis de células tumorales mediada por anticuerpos biespecíficos con la liberación de citocinas IL-2. La correlación entre la producción de IL-2 y la lisis de células tumorales U266 es $R^2 = 0,37$. En el diagrama de dispersión de la figura 6 se muestra una comparación de la actividad de lisis de células tumorales mediada por anticuerpos biespecíficos con la liberación de citocinas IFN- γ . La correlación entre la producción de IFN- γ y la lisis de células tumorales U266 es $R^2 = 0,53$. En el diagrama de dispersión de la figura 7 se muestra una comparación de la actividad de lisis de células tumorales U266 mediada por anticuerpos biespecíficos con la afinidad de unión anti-CD3. La correlación entre la CE50 de destrucción de U266 y la afinidad de unión a proteína es $R^2 = 0,93$.

Ejemplo 6 Lisis de células tumorales

Se ensayaron anticuerpos biespecíficos α CD3_F1F: α BCMA para determinar la capacidad de destruir tres células tumorales BCMA+ diferentes y una línea celular BCMA negativa a través de redirección de los linfocitos T primarios activados. En este experimento, las células tumorales se mezclaron con linfocitos pan-T activados en una relación de E:T de 10:1 junto con la adición de anticuerpo biespecífico. Los resultados se muestran en las figuras 8A-6D. El panel A muestra la destrucción de células RPMI-8226, el panel B muestra la destrucción de células NCI-H929, el panel C muestra la destrucción de células U-266 y el panel D muestra la destrucción de células K562, un control negativo. El eje de abscisas muestra la concentración de anticuerpo usada y el eje de ordenadas muestra el % de lisis de células tumorales 6 horas después de la adición del anticuerpo.

- 5
- 10 El nivel de liberación de citocinas IL-2 se midió después de cultivar linfocitos T humanos en reposo con diversas líneas celulares tumorales y dosis crecientes del anticuerpo biespecífico α CD3_F1F: α BCMA. La figura 9A muestra la liberación de IL-2 estimulada por células RPMI-8226, la figura 9B muestra la liberación de IL-2 estimulada por células NCI-H929, la figura 9C muestra la liberación de IL-2 estimulada por células U-266 y la figura 9D muestra la liberación de IL-2 estimulada por células K562, un control negativo.
- 15 El nivel de liberación de citocinas IFN- γ se midió después de cultivar linfocitos T humanos en reposo con diversas líneas celulares tumorales y dosis crecientes del anticuerpo biespecífico α CD3_F1F: α BCMA. La figura 10A muestra la liberación de IFN- γ estimulada por células RPMI-8226, la figura 10B muestra la liberación de IFN- γ estimulada por células NCI-H929, la figura 10C muestra la liberación de IFN- γ estimulada por células U-266 y la figura 10D muestra la liberación de IFN- γ estimulada por células K562, un control negativo.
- 20 Los ejemplos se presentan para proporcionar a los expertos en la técnica una divulgación y descripción completas de cómo hacer y usar la presente invención, y no pretenden limitar el alcance de lo que los autores de la invención consideran su invención, ni pretenden representar que los experimentos siguientes sean todos o los únicos experimentos realizados. Se han realizado esfuerzos por garantizar la precisión con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.), pero deben tenerse en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso
- 25 molecular promedio en peso, la temperatura está en grados Celsius y la presión es igual o cercana a la atmosférica.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo biespecífico que comprende:

(a) un primer resto de unión específico para CD3 humano; en donde el primer resto de unión comprende:

(i) una primera subunidad polipeptídica que comprende un dominio variable de la cadena pesada (VH) que comprende una CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de GFTFDDYA (SEQ ID NO: 29), una CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de ISWNSGSI (SEQ ID NO: 24) y una CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de AKDSRGYGDYRLGGAY (SEQ ID NO: 41) en una región flanqueante humana; y

(ii) una segunda subunidad polipeptídica que comprende un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende una CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de QSVSSN (SEQ ID NO: 35), una CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de GAS (SEQ ID NO: 38) y una CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de QQYNNWPWT (SEQ ID NO: 45); y

(b) un segundo resto de unión específico para BCMA humano, en donde el segundo resto de unión comprende:

(i) una tercera subunidad polipeptídica que comprende un dominio VH que comprende una CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de GFTVSSYG (SEQ ID NO: 36), una CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de IRGSDGST (SEQ ID NO: 39) y una CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de AKQGENDGPFDPH (SEQ ID NO: 46).

2. El anticuerpo biespecífico de la reivindicación 1, en donde las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 en el dominio VL de la segunda subunidad polipeptídica están presentes en una región flanqueante de VL humana.

3. El anticuerpo biespecífico de la reivindicación 1, en donde la primera subunidad polipeptídica comprende un dominio VH que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, o en donde la segunda subunidad polipeptídica comprende un dominio VL que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19.

4. El anticuerpo biespecífico de la reivindicación 1, en donde la primera subunidad polipeptídica comprende un dominio VH que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y la segunda subunidad polipeptídica comprende un dominio VL que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19.

5. El anticuerpo biespecífico de la reivindicación 1 o reivindicación 3, en donde la tercera subunidad polipeptídica comprende un dominio VH que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21.

6. El anticuerpo biespecífico de la reivindicación 1 o reivindicación 3, en donde la tercera subunidad polipeptídica tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20.

7. El anticuerpo biespecífico según las reivindicaciones 4 y 5, que comprende:

(a) un primer resto de unión específico para CD3 humano; en donde el primer resto de unión comprende una primera subunidad polipeptídica que comprende un dominio VH que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una segunda subunidad polipeptídica que comprende un dominio VL que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19; y

(b) un segundo resto de unión específico para BCMA humano, en donde el segundo resto de unión comprende una tercera subunidad polipeptídica que comprende un dominio VH que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21.

8. El anticuerpo biespecífico de la reivindicación 7, en donde la tercera subunidad polipeptídica comprende un primer dominio VH que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 y un segundo dominio VH que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21, en donde el primer dominio VH y el segundo dominio VH están dispuestos en una configuración en tándem.

9. El anticuerpo biespecífico de la reivindicación 8, en donde el primer dominio VH y el segundo dominio VH de la tercera subunidad polipeptídica están dispuestos en una configuración en tándem y se unen mediante un conector.

10. El anticuerpo biespecífico según las reivindicaciones 4 y 6, que comprende:

(a) un primer resto de unión específico para CD3 humano; en donde el primer resto de unión comprende una primera subunidad polipeptídica que comprende un dominio VH que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una segunda subunidad polipeptídica que comprende un dominio VL que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19; y

(b) un segundo resto de unión específico para BCMA humano, en donde el segundo resto de unión comprende una tercera subunidad polipeptídica que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20.

11. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo biespecífico de una cualquiera de las reivindicaciones

- 1 a 10, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
12. Uno o más polinucleótidos que codifican el anticuerpo biespecífico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
13. Uno o más vectores que comprenden uno o más polinucleótidos de la reivindicación 12.
- 5 14. Una célula que comprende el uno o más vectores de la reivindicación 13.
15. Un método de producción de un anticuerpo biespecífico, que comprende cultivar la célula de la reivindicación 14 en condiciones permisivas para la expresión del anticuerpo biespecífico y aislar el anticuerpo biespecífico de la célula.
16. Un kit que comprende el anticuerpo biespecífico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, e instrucciones de uso.
- 10 17. El anticuerpo biespecífico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para su uso en el tratamiento de un cáncer que expresa BCMA en un sujeto humano que lo necesite.

FIG. 1A

ID interna		CDR1	CDR2	CDR3
312557	SEQ ID NO: 1	GFTFDQYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYRLGGAY
308261	SEQ ID NO: 2	GFTFDQYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYRLGGAY
308159	SEQ ID NO: 3	GFTFDQYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYRLGGAY
308160	SEQ ID NO: 4	GFTFDQYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYRLGGAY
308254	SEQ ID NO: 5	GFTFDQYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYRLGGAY
312585	SEQ ID NO: 6	GFTFDQYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYRLGGAY
312614	SEQ ID NO: 7	GFTFDQYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYRLGGAY
312583	SEQ ID NO: 8	GFTFDQYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYRLGGAY
312584	SEQ ID NO: 9	GFTFDQYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYRLGGAY
312624	SEQ ID NO: 10	GFTFDQYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYRLGGAY
312578	SEQ ID NO: 11	GFTFDQYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYRLGGAY
312620	SEQ ID NO: 12	GFTFDQYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYRLGGAY
312634	SEQ ID NO: 13	GFTFDQYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYRLGGAY
312579	SEQ ID NO: 14	GFTFDQYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYRLGGAY
312636	SEQ ID NO: 15	GFTFDQYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYRLGGAY
312570	SEQ ID NO: 16	GFTFDQYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYRLGGAY
312567	SEQ ID NO: 17	GFTFDQYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYRLGGAY
312569	SEQ ID NO: 18	GFTFDQYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYRLGGAY

FIG. 1B

312325	SEQ ID NO: 19	QSVSSN	GAS	QQNNWPWT
308902-bivalente	SEQ ID NO: 20	GFTVSSYG	IRGSDGST	AKQGENDGPFDH
308902	SEQ ID NO: 21	GFTVSSYG	IRGSDGST	AKQGENDGPFDH

FIG. 1C

304703	SEQ ID NO: 22	GGGIGGGG	IRGSDGST	AKQGENDGPFDH
--------	---------------	----------	----------	--------------

FIG. 2A

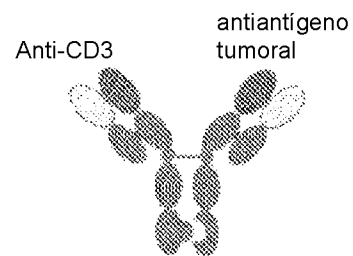


FIG. 2B

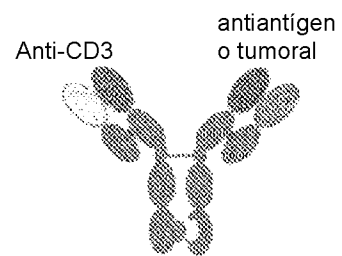


FIG. 2C

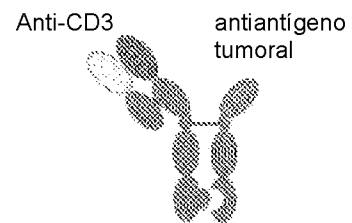


FIG. 2D

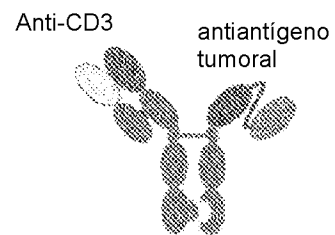
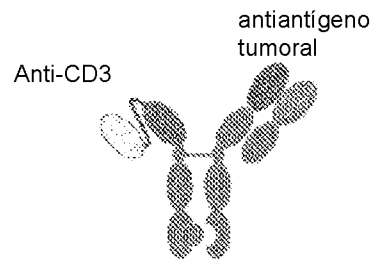


FIG. 2E



ES 2 980 623 T3

FIG. 3

Columna

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
ANTICUERPO ANTI-CD3 PRECURSOR			ANTICUERPO BIESPECÍFICO ANTI-CD3:ANTI-BCMA									
ID anti-CD3	Unión de células Jurkat (MFI)	Unión de linfocitos T de macaco (MFI)	a dosis de BsAb en ng/ml	IL-2 37	IL-6 111	IL-10 111	IFNg 12	TNFa 12	CE50 de destrucción (ng/ml)	% de destrucción (333 ng/ml)	KD (nM)	Unión de células Jurkat (MFI)
312624	30,5	1,4	CD3_F2E_BCMA	130	1,0	24,1	705	1787	2,0	63	227	296
312585	32,7	0,9	CD3_F2C_BCMA	93	0,5	19,2	752	1821	2,1	68	44	513
312614	32,4	0,9	CD3_F2D_BCMA	294	1,5	89,9	1189	2387	6,1	63	86	357
312634	21,4	1,1	CD3_F2F_BCMA	44	0,5	2,4	333	485	9,8	51	714	67
312608	25,9	1,0	CD3_F2A_BCMA	96	0,5	3,3	505	1161	22,2	59	199	110
312557	6,1	1,0	CD3_F2B_BCMA	8	0,5	0,6	154	553	150,1	38	1000	32
312568	4,1	1,2	CD3_F2G_BCMA	3	0,5	0,5	49	231	352,0	12	ND	9
304703	15,9	26,2	CD3_F1A_BCMA	212	0,5	48,5	746	1844	6,4	71	98	149

FIG. 4

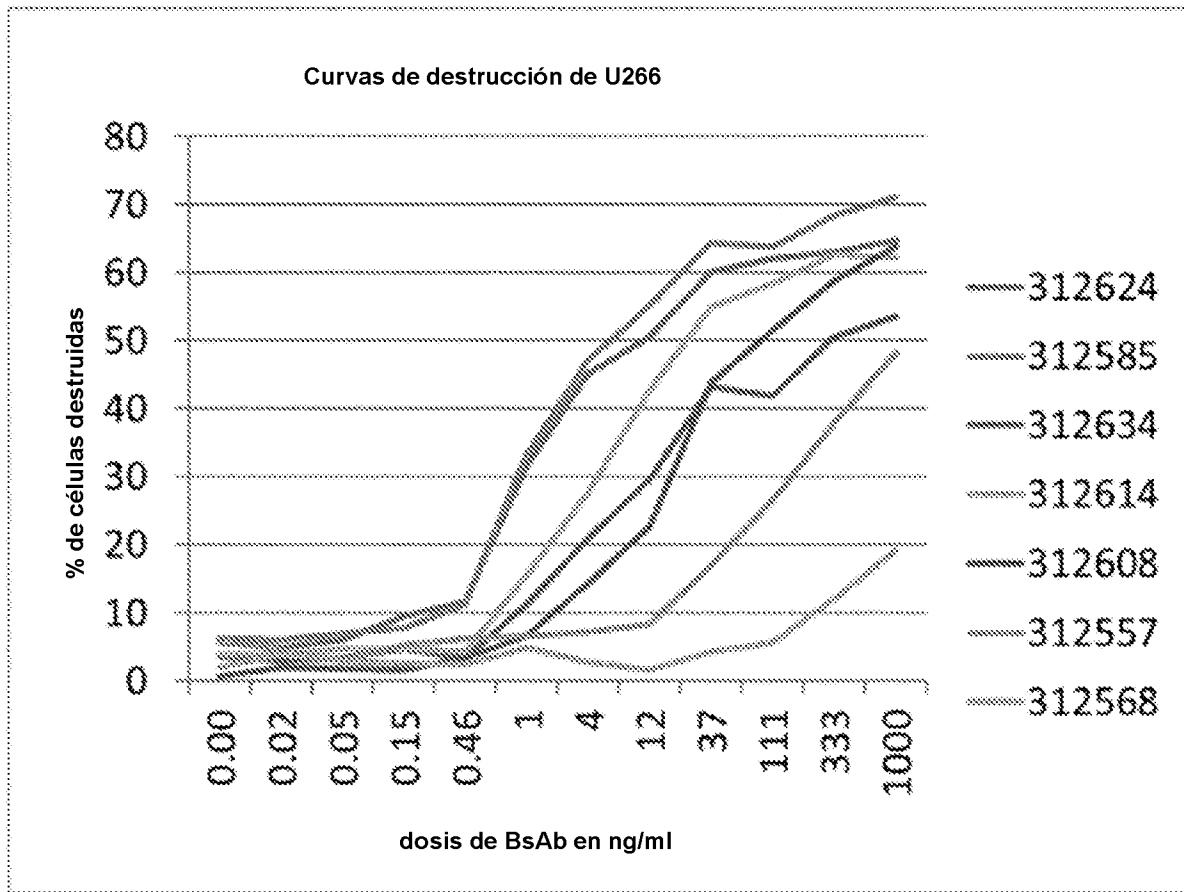


FIG. 5

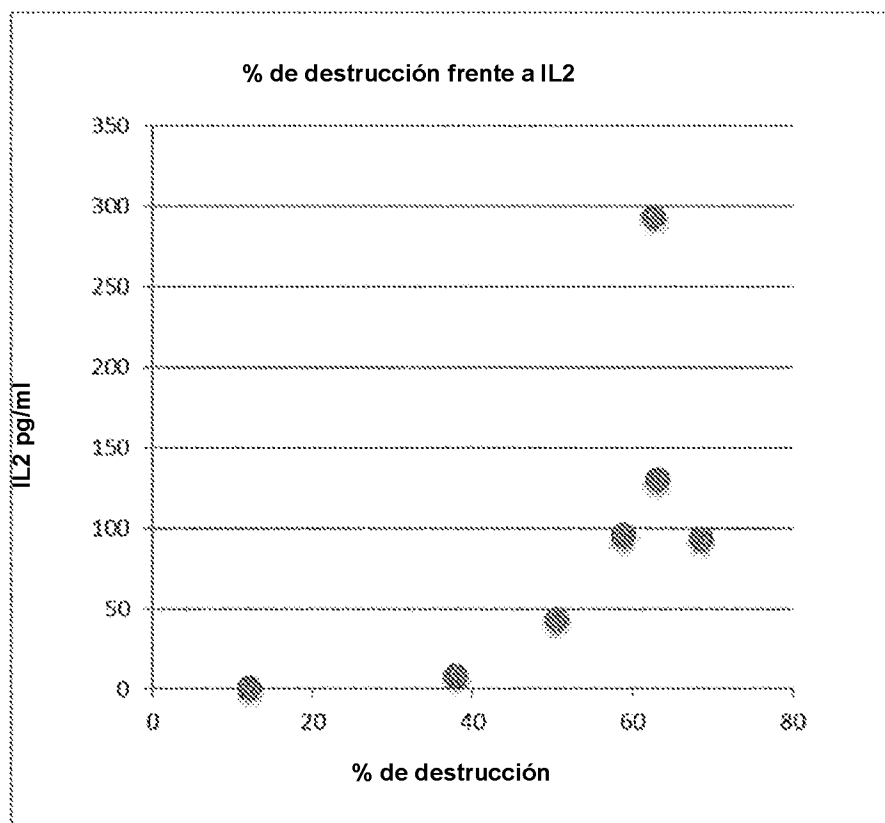


FIG. 6

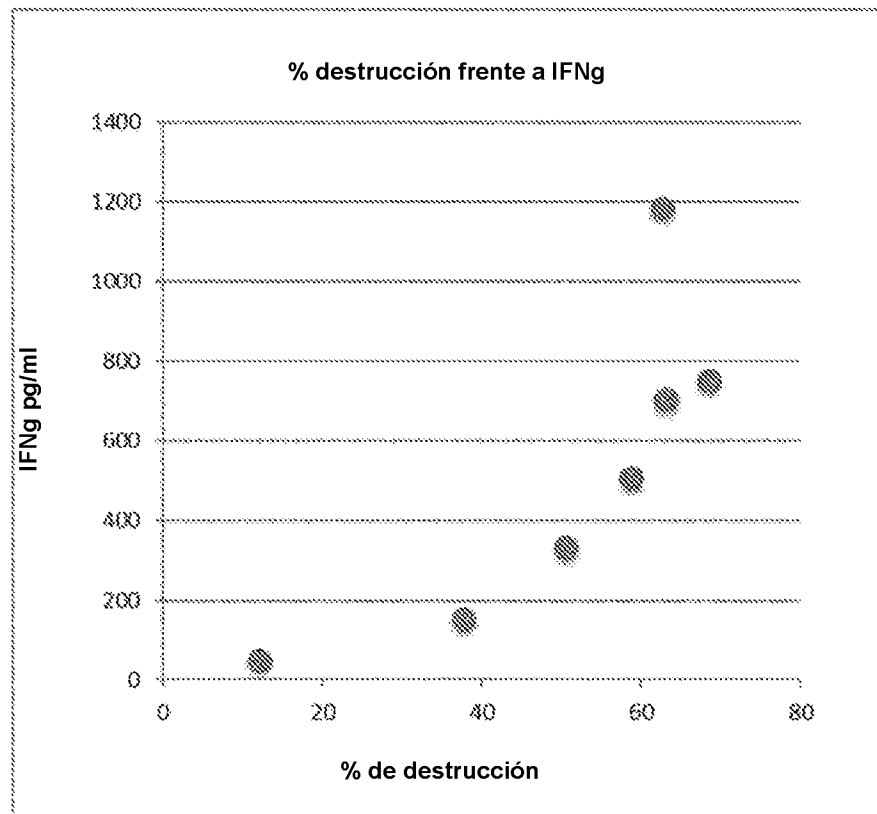


FIG. 7

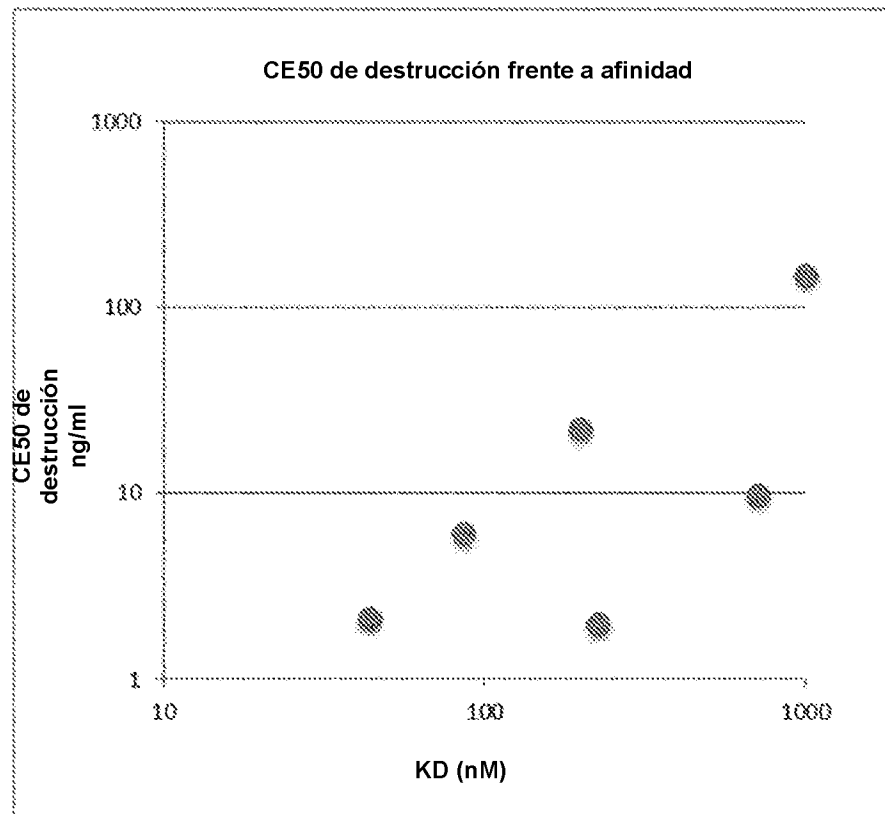


FIG. 8A

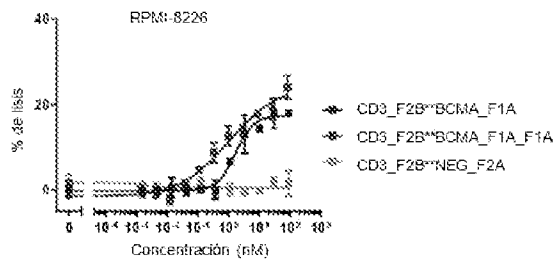


FIG. 8B

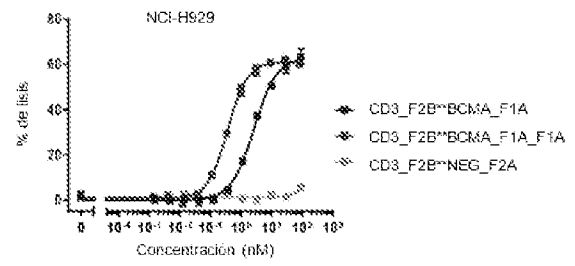


FIG. 8C

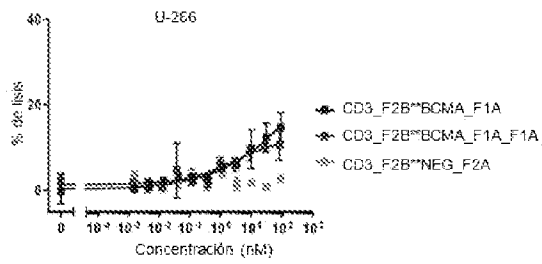
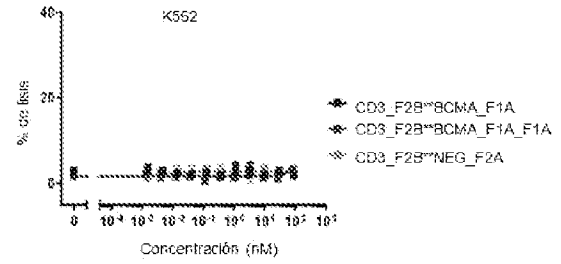


FIG. 8D



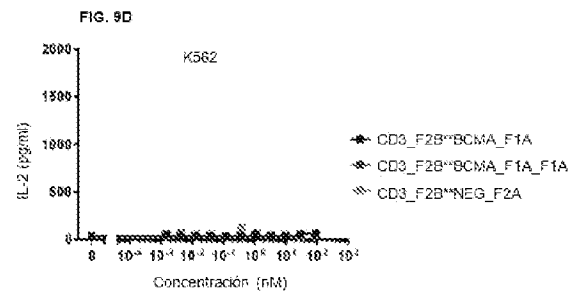
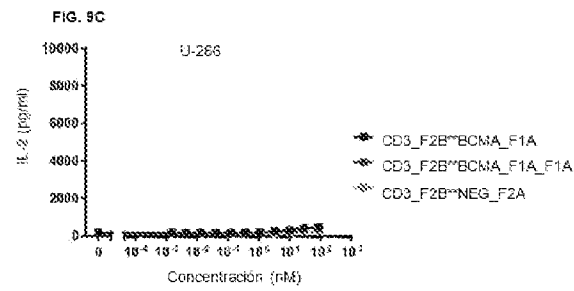
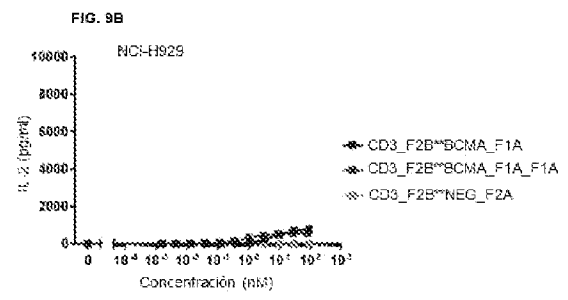
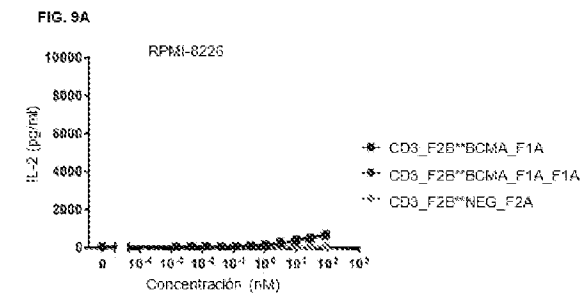


FIG. 10A

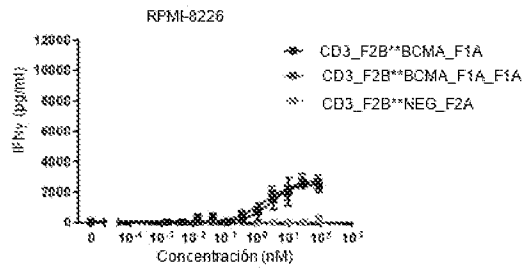


FIG. 10B

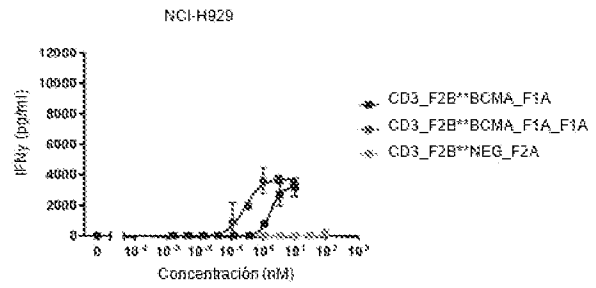


FIG. 10C

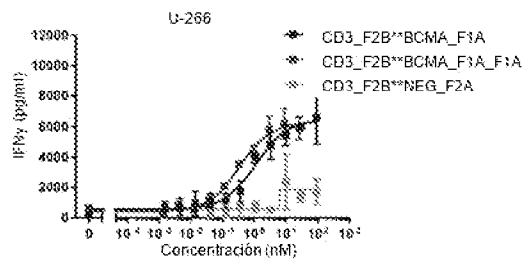


FIG. 10D

