

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 978 993**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395	(2006.01) A61P 13/10	(2006.01)
C07K 16/00	(2006.01) A61P 13/12	(2006.01)
C07K 16/28	(2006.01) A61P 15/00	(2006.01)
C07K 16/30	(2006.01) A61P 37/04	(2006.01)
A61K 39/00	(2006.01) A61P 43/00	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01)	
A61P 1/04	(2006.01)	
A61P 1/18	(2006.01)	
A61P 11/00	(2006.01)	
A61P 13/08	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.01.2015** **PCT/US2015/012010**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.08.2015** **WO15126548**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.01.2015** **E 15752087 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2024** **EP 3107577**

54 Título: **Terapia de enfermedades mediante la inducción de la respuesta inmunitaria a las células que expresan Trop-2**

30 Prioridad:

21.02.2014 US 201461942752 P
12.09.2014 US 201462049826 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.09.2024

73 Titular/es:

IBC PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
300 American Road
Morris Plains, NJ 07950, US

72 Inventor/es:

CHANG, CHIEN-HSING;
GOLDENBERG, DAVID M.;
ROSSI, EDMUND A. y
ROSSI, DIANE

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 978 993 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

Terapia de enfermedades mediante la inducción de la respuesta inmunitaria a las células que expresan Trop-2

5 CAMPO

[0001] La presente invención está relacionada con un anticuerpo biespecífico para su uso en un método de tratamiento por inducción de una respuesta inmunitaria frente a un cáncer que expresa Trop-2, en el que el método comprende administrar el anticuerpo biespecífico y un anticuerpo inhibidor de puntos de control a un sujeto con un cáncer que expresa Trop-2. Preferiblemente, el anticuerpo anti-Trop-2 es un anticuerpo hRS7. El anticuerpo biespecífico redirige las células T efectoras, los monocitos, las células NK o los neutrófilos hacia células o tejidos enfermos e induce una respuesta inmunitaria contra la diana.

FONDO

[0002] El uso de anticuerpos biespecíficos (bsAbs) para redirigir las células T efectoras para la eliminación selectiva de células tumorales ha demostrado ser muy prometedor tanto preclínica como clínicamente (véase, por ejemplo, Topp et al., 2012, Blood 120:5185-87; Bargou et al., 2008, Science 321:974-77). Los anticuerpos biespecíficos desarrollados hasta la fecha contienen un primer sitio de unión específico para CD3 para el reclutamiento y la activación de células T y un segundo sitio de unión para un antígeno específico asociado a la enfermedad, como CD19 (Bassan, 2012, Blood 120:5094-95). El anticuerpo biespecífico pone a las células T CD3⁺ en contacto directo con las células de la enfermedad diana e induce citotoxicidad mediada por células (Bassan, 2012). Se ha notificado que los anticuerpos biespecíficos anti-CD3 X anti-CD19 producen una remisión molecular completa y duradera a concentraciones muy bajas en aproximadamente el 70% de los pacientes adultos con ALL MRD⁺ (Topp et al., 2012, Blood 120:5185-87). Los anticuerpos biespecíficos que reconocen los gliomas y el epítipo CD3 de las células T se han utilizado con éxito en el tratamiento de tumores cerebrales en pacientes humanos (Nitta, et al. Lancet 1990; 355:368-371).

[0003] Los bsAbs redireccionadores de leucocitos no se limitan a las células T. Los activadores biespecíficos de células asesinas (BiKEs) que comprenden scFvs contra el antígeno de células NK CD16 y un antígeno asociado a tumor (por ejemplo, CD19, CD22, CD33) también han demostrado una potente actividad anticancerígena (por ejemplo, Miller, Hematology Soc Hematol Educ Program 2013:247-53). Otras alternativas son los activadores asesinos trispecíficos (TriKE), como anti-CD 16 x anti-CD 19 x anti-CD22 (Miller, 2013; Gleason et al., 2012, Mol Cancer Ther 11:2674-84). Se utilizó un BiKE anti-CD16 x anti-CD33 para tratar la AML y el síndrome mielodisplásico (Miller, 2013; Wiernik et al., 2013, Clin Cancer Res 19:3844-55). En la AML refractaria, un BiKE CD16 x CD33 condujo a una potente destrucción de células tumorales y producción de citoquinas por las células NK. La inhibición de ADAM17 potenció la respuesta CD16 x CD33 BiKE (Miller, 2013). Se han descrito otros constructos trispecíficos trivalentes, por ejemplo contra CD16/CD19/HLA-DR (Schubert et al., 2012, mAbs 4:45-56).

[0004] Se conocen numerosos métodos para producir anticuerpos biespecíficos (véase, por ejemplo, Patente de EE. UU. N.º 7,405,320.) Los anticuerpos biespecíficos pueden producirse por el método del cuádrima, que implica la fusión de dos hibridomas diferentes, cada uno de los cuales produce un anticuerpo monoclonal que reconoce un sitio antigénico diferente (Milstein y Cuello, Nature, 1983; 305:537-540). Los hibridomas fusionados son capaces de sintetizar dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras diferentes, que pueden asociarse aleatoriamente para dar lugar a una población heterogénea de 10 estructuras de anticuerpos diferentes, de las cuales sólo una de ellas, que representa 1/8 del total de moléculas de anticuerpos, será biespecífica y, por lo tanto, deberá purificarse aún más a partir de las otras formas. Los hibridomas fusionados suelen ser menos estables citogenéticamente que los hibridomas parentales, lo que hace más problemática la generación de una línea celular de producción.

[0005] Otro método para producir anticuerpos biespecíficos utiliza reticulantes heterobifuncionales para unir químicamente dos anticuerpos monoclonales diferentes, de modo que el conjugado híbrido resultante se una a dos dianas diferentes (Staerz, et al. Nature 1985; 314:628-631; Perez, et al. Nature 1985 (316:354-356)). Los anticuerpos biespecíficos generados por este método son esencialmente heteroconjugados de dos moléculas IgG, que se difunden lentamente en los tejidos y se eliminan rápidamente de la circulación. Los anticuerpos biespecíficos también pueden producirse mediante la reducción de cada uno de los dos anticuerpos monoclonales parentales a las respectivas medias moléculas, que luego se mezclan y se dejan reoxidar para obtener la estructura híbrida (Staerz y Bevan. Proc Natl Acad Sci USA 1986; 83:1453-1457). Un enfoque alternativo consiste en entrecruzar químicamente dos o tres fragmentos Fab' purificados por separado utilizando los engarces apropiados. Todos estos métodos químicos son indeseables para el desarrollo comercial debido al alto coste de fabricación, el laborioso proceso de producción, los extensos pasos de purificación, los bajos rendimientos (<20%) y los productos heterogéneos.

[0006] Los dominios V_H y V_L discretos de anticuerpos producidos mediante tecnología de ADN recombinante pueden emparejarse entre sí para formar un dímero (fragmento Fv recombinante) con capacidad de unión (Pat. de EE. UU. N.º 4,642,334). Sin embargo, estas moléculas no asociadas covalentemente no son lo suficientemente estables en condiciones fisiológicas como para tener una utilidad práctica. Los dominios V_H y V_L afines pueden unirse con un engarce peptídico de composición y longitud apropiadas (normalmente de más de 12 residuos de aminoácidos) para formar un Fv de cadena única (scFv) con actividad de unión. Los métodos de fabricación de agentes basados en scFv de multivalencia

y multiespecificidad variando la longitud del engarce se divulgaron en Pat. de EE. UU. N.º 5.844.094; Pat. de EE. UU. N.º 5,837,242 y WO 98/44001. Los problemas comunes que se han asociado con frecuencia a la generación de agentes basados en scFv de multivalencia y multiespecificidad son los bajos niveles de expresión, los productos heterogéneos, la inestabilidad en solución que da lugar a agregados, la inestabilidad en suero y la afinidad deficiente.

[0007] Varios anticuerpos biespecíficos de redireccionamiento de CD3 y CD19 se encuentran en fase de desarrollo clínico. Un constructo de anticuerpo biespecífico basado en scFv, conocido como BITE® (Bispecific T-cell Engager), emplea un único polipéptido que contiene 2 especificidades de unión a antígeno, cada una aportada por un VH y un VL afines, unidos en tándem mediante un engarce flexible (véanse, por ejemplo, Nagorsen et al., 2009, *Leukemia & Lymphoma* 50:886-91; Amann et al., 2009, *J Immunother* 32:453-64; Baeuerle and Reinhardt, 2009, *Cancer Res* 69:4941-44). Otro anticuerpo biespecífico denominado DART® (Dual-Affinity Re-Targeting) utiliza un diseño de diacuerpo estabilizado con disulfuro (véanse, por ejemplo, Moore et al., 2011, *Blood* 117:4542-51; Veri et al., 2010, *Arthritis Rheum* 62:1933-43). Tanto BITE® como DART™ presentan un rápido aclaramiento sanguíneo debido a su pequeño tamaño (~55 kDa), lo que requiere una administración frecuente para mantener los niveles terapéuticos de los anticuerpos biespecíficos.

[0008] Los interferones son actores críticos en la defensa antitumoral y antimicrobiana del huésped, y se han explorado ampliamente como agentes terapéuticos para el cáncer y las enfermedades infecciosas (Billiau et al., 2006, *Cytokine Growth Factor Rev* 17:381-409; Pestka et al., 2004, *Immunol Rev* 202:8-32). A pesar de los considerables esfuerzos realizados con los interferones de tipo I y II (IFN- α/β y γ), su uso en entornos clínicos ha sido limitado debido a la corta vida media en circulación, la toxicidad sistémica y las respuestas subóptimas en los pacientes (Pestka et al., 2004, *Immunol Rev* 202:8-32; Miller et al., 2009, *Ann N Y Acad Sci* 1182:69-79). El descubrimiento de la familia IFN- λ a principios de 2003 brindó una nueva y apasionante oportunidad de desarrollar agentes IFN alternativos para estas indicaciones clínicas no cubiertas (Kotenko et al., 2003, *Nat Immunol* 4:69-77; Sheppard et al., 2003, *Nat Immunol* 4:63-8).

[0009] La eficacia terapéutica de los IFN ha sido validada hasta la fecha por la aprobación del IFN- $\alpha 2$ para tratar la leucemia de células pilosas, la leucemia mielógena crónica, el melanoma maligno, el linfoma folicular, el condiloma acuminado, el sarcoma de Kaposi relacionado con el sida y las hepatitis B y C crónicas; el IFN- β para tratar la esclerosis múltiple; y el IFN- γ para tratar la enfermedad granulomatosa crónica y la osteopetrosis maligna. A pesar de que existe una amplia bibliografía sobre este grupo de citocinas autocrinas y paracrinas, sus funciones en la salud y la enfermedad se siguen dilucidando, incluso se están introduciendo clínicamente formas más eficaces y novedosas (Pestka, 2007, *J. Biol. Chem* 282:20047-51; Vilcek, 2006, *Immunity* 25:343-48). También se siguen investigando los efectos de la combinación de diversos interferones con terapias basadas en anticuerpos.

[0010] Los conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) son una clase potente de constructos terapéuticos que permiten la administración dirigida de agentes citotóxicos a células diana, como las células cancerosas. Debido a la función de focalización, estos compuestos muestran un índice terapéutico mucho mayor en comparación con los mismos agentes administrados sistémicamente. Las ADC se han desarrollado como anticuerpos intactos o fragmentos de anticuerpos, como los scFv. El anticuerpo o fragmento está unido a una o más copias del fármaco mediante un engarce que es estable en condiciones fisiológicas, pero que puede escindirse una vez dentro de la célula diana. Los ADC aprobados para uso terapéutico incluyen gemtuzumab ozogamicina para la AML (posteriormente retirado del mercado), brentuximab vedotin para el ALCL y el linfoma de Hodgkin, y trastuzumab emtansina para el cáncer de mama metastásico HER2-positivo (Verma et al., 2012, *N Engl J Med* 367: 1783-91; Bross et al., 2001, *Clin Cancer Res* 7:1490-96; Francisco et al., 2003, *Blood* 102:1458-65). Otros numerosos candidatos a ADC se encuentran actualmente en fase de ensayo clínico, como inotuzumab ozogamicina (Pfizer), glembatumomab vedotin (Celldex Therapeutics), SAR3419 (Sanofi-Aventis), SAR56658 (Sanofi-Aventis), AMG-172 (Amgen), AMG-595 (Amgen), BAY-94-9343 (Bayer), BIIB015 (Biogen Idec), BT062 (Biotest), SGN-75 (Seattle Genetics), SGN-CD19A (Seattle Genetics), vorsetuzumab mafodotin (Seattle Genetics), ABT-414 (AbbVie), ASG-SME (Agensys), ASG-22ME (Agensys), ASG-16M8F (Agensys), IMGN-529 (ImmunoGen), IMGN-853 (ImmunoGen), MDX-1203 (Medarex), MLN-0264 (Millenium), RG-7450 (Roche/Genentech), RG-7458 (Roche/Genentech), RG-7593 (Roche/Genentech), RG-7596 (Roche/Genentech), RG-7598 (Roche/Genentech), RG-7599 (Roche/Genentech), RG-7600 (Roche/Genentech), RG-7636 (Roche/Genentech), ADC anti-PSMA (Progenics), lorvotuzumab mertansina (ImmunoGen), milatuzumab-doxorrubicina (Immunomedics), IMMU-130 (Immunomedics), IMMU-132 (Immunomedics) y conjugados de anticuerpos de pro-2-pirrolinodoxorrubicina. (Véanse, por ejemplo, Li et al., 2013, *Drug Disc Ther* 7:178-84; Firer & Gellerman, *J Hematol Oncol* 5:70; Beck et al., 2010, *Discov Med* 10:329-39; Mullard, 2013, *Nature Rev Drug Discovery* 12:329, Solicitud de Patente Provisional de EEUU. N.º 61/761.845). Debido al potencial de los ADC para actuar como potentes agentes anticancerígenos con toxicidad sistémica reducida, pueden utilizarse solos o como terapia complementaria para reducir la carga tumoral.

[0011] Otro enfoque prometedor de la inmunoterapia se refiere al uso de anticuerpos antagonistas contra proteínas de punto de control inmunitario (por ejemplo, Pardoll, 2012, *Nature Reviews Cancer* 12:252-64). Los puntos de control inmunitario funcionan como vías inhibitorias endógenas de la función del sistema inmunitario que actúan para mantener la autotolerancia y modular la duración y el alcance de la respuesta inmunitaria a la estimulación antigénica (Pardoll, 2012). Sin embargo, parece que los tejidos tumorales y posiblemente ciertos patógenos pueden cooptar el sistema de puntos de control para reducir la eficacia de la respuesta inmunitaria del huésped, lo que resulta en el crecimiento del tumor y/o la infección crónica (véase, por ejemplo, Pardoll, 2012, *Nature Reviews Cancer* 12:252-64; Nirschl & Drake, 2013, *Clin Cancer Res* 19:4917-24). Las moléculas de punto de control incluyen CTLA4 (antígeno citotóxico de linfocitos T-4), PD1 (proteína de muerte celular programada 1), PD-L1 (ligando de muerte celular programada 1), LAG-3 (gen de

activación de linfocitos-3), TIM-3 (inmunoglobulina de células T y proteína mucina-3) y varias otras (Pardoll, 2012, Nature Reviews Cancer 12:252-64; Nirschl & Drake, 2013, Clin Cancer Res 19:4917-24). Los anticuerpos contra varias de las proteínas de los puntos de control (CTLA4, PD1, PD-L1) están en fase de ensayo clínico y han demostrado una eficacia inesperada contra tumores que eran resistentes a los tratamientos estándar.

[0012] Los documentos WO 2014/163684 A1 y WO 2014/028560 están relacionados con una terapia combinada para inducir la respuesta inmunitaria a una enfermedad. Los agentes adecuados pueden incluir complejos redireccionadores de leucocitos, conjugados anticuerpo-fármaco, interferones y/o anticuerpos inhibidores de puntos de control.

[0013] Chang C-H et al. (Cancer Res; 77(19) 1 de octubre de 2017, pp. 5384-5394) informan sobre una terapia combinada con anticuerpos biespecíficos y bloqueo PD-1 que potencia la potencia antitumoral de las células T.

[0014] Existe la necesidad de métodos y composiciones para generar complejos de anticuerpos biespecíficos mejorados con $T_{1/2}$ más largo, mejores propiedades farmacocinéticas, mayor estabilidad *in vivo* y/o mayor eficacia *in vivo*. Existe otra necesidad de terapias combinadas para mejorar la eficacia de los tratamientos dirigidos a inducir la respuesta inmunitaria contra diversas enfermedades, como el cáncer Trop-2⁺.

RESUMEN

[0015] El problema subyacente a la presente invención se resuelve mediante el objeto de la reivindicación independiente adjunta. Las realizaciones preferidas pueden extraerse de las reivindicaciones dependientes adjuntas.

[0016] Más específicamente, el problema subyacente a la presente invención se resuelve mediante un anticuerpo biespecífico para su uso en un método de tratamiento mediante la inducción de una respuesta inmunitaria frente a un cáncer que expresa Trop-2, en el que el método comprende administrar el anticuerpo biespecífico y un anticuerpo inhibidor del punto de control a un sujeto con un cáncer que expresa Trop-2, en el que el anticuerpo biespecífico comprende un primer fragmento de anticuerpo y un segundo fragmento de anticuerpo, en el que tanto el primer fragmento de anticuerpo como el segundo fragmento de anticuerpo son cada uno un scFv y, en el que el anticuerpo biespecífico comprende un sitio de unión para Trop-2 y un sitio de unión para CD3, y en el que el anticuerpo biespecífico comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 107 uniéndose a Trop-2.

[0017] En una realización, el método comprende además administrar al sujeto al menos un agente terapéutico seleccionado del grupo que consiste en (i) un interferón seleccionado del grupo que consiste en interferón- α , interferón- β , interferón- λ 1, interferón- λ 2 e interferón- λ 3; y (ii) un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC).

[0018] En una realización preferida, el interferón es interferón- α .

[0019] En una realización, el anticuerpo inhibidor del punto de control se selecciona del grupo que consiste en lambrolizumab (MK-3475), nivolumab (BMS-936558), pidilizumab (CT-011), AMP-224, MDX-1105, MEDI4736, MPDL3280A, BMS-936559, ipilimumab, liriumab, IPH2101 y tremelimumab.

[0020] En una realización, el anticuerpo inhibidor del punto de control se une a un antígeno seleccionado del grupo que consiste en CTLA4, PD1, PD-L1, LAG3, B7-H3, B7-H4, KIR y TIM3.

[0021] En una realización, el conjugado anticuerpo-fármaco se selecciona del grupo que consiste en hLL1-doxorrubicina, hRS7-SN-38, hMN-14-SN-38, hLL2-SN-38, hA20-SN-38, hPAM4-SN-38, hLL1-SN-38, hRS7-Pro-2-P-Dox, hMN-14-Pro-2-P-Dox, hLL2-Pro-2-P-Dox, hA20-Pro-2-P-Dox, hPAM4-Pro-2-P-Dox, hLL1-Pro-2-P-Dox, P4/D10-doxorrubicina, gemtuzumab ozogamicina, brentuximab vedotin, trastuzumab emtansina, inotuzumab ozogamicina, glembatumomab vedotina, SAR3419, SAR566658, BIIB015, BT062, SGN-75, SGN-CD19A, AMG-172, AMG-595, BAY-94-9343, ASG-5ME, ASG-22ME, ASG-16M8F, MDX-1203, MLN-0264, ADC anti-PSMA, RG-7450, RG-7458, RG-7593, RG-7596, RG-7598, RG-7599, RG-7600, RG-7636, ABT-414, IMGN-853, IMGN-529, vorsetuzumab mafodotin y lorvotuzumab mertansine.

[0022] En una realización, un ADC se administra antes que cualquier otro agente.

[0023] En una realización, el interferón se administra como interferón libre, interferón PEGilado, una proteína de fusión de interferón o interferón conjugado con un anticuerpo.

[0024] En una realización, el cáncer que expresa Trop-2 es un carcinoma de esófago, páncreas, pulmón, estómago, colon, recto, vejiga urinaria, mama, ovario, útero, riñón o próstata.

[0025] En una realización, el método comprende además administrar al sujeto un agente terapéutico seleccionado del grupo que consiste en un segundo anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, un fármaco, una toxina, una enzima, un agente citotóxico, un agente antiangiogénico, un agente proapoptótico, un antibiótico, una hormona, un inmunomodulador, una citocina, una quimiocina, un oligonucleótido antisentido, un ARN interferente pequeño (ARNsi), un compuesto de boro y un radioisótopo.

[0026] En una realización, el anticuerpo biespecífico induce una respuesta inmunitaria contra un cáncer que expresa Trop-2 sin aumentar la producción de citocinas a niveles capaces de inducir el síndrome de liberación de citocinas (CRS).

[0027] La presente invención, tal como se define en las reivindicaciones, se refiere a anticuerpos biespecíficos para su uso en el tratamiento de células cancerosas Trop-2⁺ mediante la inducción de una respuesta inmunitaria contra dichas células cancerosas Trop-2⁺. Trop-2 se sobreexpresa en numerosos tipos de tumores sólidos, como los carcinomas de esófago, páncreas, pulmón, estómago, colon y recto, vejiga urinaria, mama, ovario, útero, cuello uterino, riñón y próstata. Preferiblemente, el anticuerpo biespecífico se utiliza para tratar el cáncer gástrico o el cáncer de páncreas. La administración del anticuerpo biespecífico induce una respuesta inmunitaria frente a las células Trop-2⁺. Aunque Trop-2 también se expresa en algunos tejidos normales (por ejemplo, Stepan et al., 2011, J Histochem Cytochem 59:701-10), los Ejemplos siguientes demuestran que los anticuerpos anti-Trop-2 pueden administrarse *in vivo* tanto en sistemas de modelos animales como en sujetos humanos, con toxicidades únicamente tolerables. En otras realizaciones preferidas, la administración del anticuerpo biespecífico a un sujeto induce una respuesta inmunitaria contra las células cancerosas Trop-2⁺ sin elevar los niveles de citocinas que inducirían el síndrome de liberación de citocinas (CRS). En realizaciones preferidas alternativas, el anticuerpo biespecífico induce la trogocitosis de antígenos de superficie celular entre células cancerosas Trop-2⁺ y células T.

[0028] También se divulga un anticuerpo biespecífico dirigido además de a CD3 a otros antígenos de células T o leucocitos. Los antígenos de células T ejemplares se seleccionan del grupo formado por CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD40L, CD44, CD45, CD69 y CD90. Los antígenos ejemplares expresados en las células NK se seleccionan del grupo formado por CD8, CD16, CD56, CD57, ADAM17, KIR y CD137. Los antígenos monocitarios ejemplares se seleccionan del grupo que consiste en CD74, cadena alfa HLA-DR, CD14, CD16, CD64 y CD89. Los antígenos neutrófilos ejemplares se seleccionan del grupo que consiste en CEACAM6, CEACAM8, CD16b, CD32a, CD89, CD177, CD11a, CD11b y SLC44A2. Preferiblemente, el antígeno de células T es CD3, o el antígeno de células NK es CD16.

[0029] También se divulga un anticuerpo biespecífico dirigido además de Trop-2 a otros antígenos asociados a tumores. Los antígenos asociados a tumores a los que puede dirigirse incluyen, entre otros, alfa-fetoproteína (AFP), α -actinina-4, A3, antígeno específico para el anticuerpo A33, ART-4, B7, Ba 733, BAGE, antígeno BrE3, CA125, CAMEL, CAP-1, anhidrasa carbónica IX, CASP-8/m, CCCL19, CCCL21, CD1, CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD11A, CD14, CD15, CD16, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD29, CD30, CD32b, CD33, CD37, CD38, CD40, CD40L, CD44, CD45, CD46, CD52, CD54, CD55, CD59, CD64, CD66a-e, CD67, CD70, CD70L, CD74, CD79a, CD79b, CD80, CD83, CD95, CD126, CD132, CD133, CD138, CD147, CD154, CDC27, CDK-4/m, CDKN2A, CTLA4, CXCR4, CXCR7, CXCL12, HIF-1 α , antígeno específico de colon-p (CSAp), CEA (CEACAM5), CEACAM6, c-Met, DAM, EGFR, EGFRvIII, EGP-1 (TROP-2), EGP-2, ELF2-M, Ep-CAM, factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), Flt-1, Flt-3, receptor de folato, antígeno G250, GAGE, gp100, GRO- β , HLA-DR, HM1.24, gonadotropina coriónica humana (HCG) y sus subunidades, HER2/neu, HMGB-1, factor inducible por hipoxia (HIF-1), HSP70-2M, HST-2, Ia, IGF-1R, IFN- γ , IFN- α , IFN- β , IFN- λ , IL-4R, IL-6R, IL-13R, IL-15R, IL-17R, IL-18R, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-23, IL-25, factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGF-1), antígeno KC4, antígeno KS-1, KS1-4, Le-Y, LDR/FUT, factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF), MAGE, MAGE-3, MART-1, MART-2, NY-ESO-1, TRAG-3, mCRP, MCP-1, MIP-1A, MIP-1B, MIF, MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5ac, MUC13, MUC16, MUM-1/2, MUM-3, NCA66, NCA95, NCA90, antígeno PAM4, mucina del cáncer de páncreas, receptor PD1, factor de crecimiento placentario, p53, PLAGL2, fosfatasa ácida prostática, PSA, PRAME, PSMA, PIGF, ILGF, ILGF-1R, IL-6, IL-25, RS5, RANTES, T101, SAGE, S100, survivina, survivina-2B, TAC, TAG-72, tenascina, receptores TRAIL, TNF- α , antígeno Tn, antígenos Thomson-Friedenreich, antígenos de necrosis tumoral, VEGFR, fibronectina ED-B, WT-1, antígeno 17-1A, factores del complemento C3, C3a, C3b, C5a, C5, un marcador de angiogénesis, bcl-2, bcl-6, Kras, un marcador oncogénico y un producto oncogénico (véanse, por ej.g., Sensi et al., Clin Cancer Res 2006, 12:5023-32; Parmiani et al., J Immunol 2007, 178:1975-79; Novellino et al. Cancer Immunol Immunother 2005, 54:187-207).

[0030] Los anticuerpos anti-TAA ejemplares que pueden utilizarse incluyen, entre otros, hA19 (anti-CD19, Patente de EE. UU. N.º. 7,109,304), hR1 (anti-IGF-1R, Solicitud de Patente de EE. UU. N.º. Serie 12/722.645, depositada el 3/12/10), hPAM4 (anti-MUC5ac, Patente de EE. UU. N.º. 7,282,567), hA20 (anti-CD20, Patente de EE. UU. N.º. 7.251.164), hIMMU31 (anti-AFP, Patente de EE. UU. N.º. 7,300,655), hLL1 (anti-CD74, Patente de EE. UU. N.º. 7,312,318), hLL2 (anti-CD22, Patente de EE. UU. N.º. 7.074.403), hMu-9 (anti-CSAp, Patente de EE. UU. N.º. 7,387,773), hL243 (anti-HLA-DR, Patente de EE. UU. N.º. 7.612.180), hMN-14 (anti-CEACAM5, Patente de EE. UU. N.º. 6.676.924), hMN-15 (anti-CEACAM6, Patente de EE. UU. N.º. 7,541,440), hRS7 (anti-EGP-1, Patente de EE. UU. N.º. 7.238.785), hMN-3 (anti-CEACAM6, Patente de EE. UU. N.º. 7.541.440), Ab124 y Ab125 (anti-CXCR4, Patente de EE. UU. N.º. 7,138,496).

[0031] Los anticuerpos alternativos que pueden utilizarse para el tratamiento de diversos estados patológicos incluyen, entre otros, abciximab (antiglicoproteína IIb/IIIa), alemtuzumab (anti-CD52), bevacizumab (anti-VEGF), cetuximab (anti-EGFR), gemtuzumab (anti-CD33), ibritumomab (anti-CD20), panitumumab (anti-EGFR), rituximab (anti-CD20), tositumomab (anti-CD20), trastuzumab (anti-ErbB2), lambrolizumab (anti-receptor PD1), nivolumab (anti-receptor PD1), ipilimumab (anti-CTLA4), abagovomab (anti-CA-125), adecatumumab (anti-EpCAM), atlizumab (anti-receptor IL-6), benralizumab (anti-CD125), obinutuzumab (GA101, anti-CD20), CC49 (anti-TAG-72), AB-PG1-XG1-026 (anti-PSMA, Solicitud de patente 11/983.372, depositada como ATCC PTA-4405 y PTA-4406), D2/B (anti-PSMA, WO 2009/130575), tocilizumab (anti-receptor IL-6), basiliximab (anti-CD25), daclizumab (anti-CD25), efalizumab (anti-CD11a), GA101 (anti-

CD20; Glycart Roche), atalizumab (anti- $\alpha 4$ integrina), omalizumab (anti-IgE); anticuerpos anti-TNF- α como CDP571 (Ofei et al., 2011, Diabetes 45:881-85), MTNFAI, M2TNFAI, M3TNFAI, M3TNFABI, M302B, M303 (Thermo Scientific, Rockford, IL), infliximab (Centocor, Malvern, PA), certolizumab pegol (UCB, Bruselas, Bélgica), anti-CD40L (UCB, Bruselas, Bélgica), adalimumab (Abbott, Abbott Park, IL), BENLYSTA® (Human Genome Sciences); anticuerpos anti-CD38 como MOR03087 (MorphoSys AG), MOR202 (Celgene), HuMax-CD38 (Genmab) o daratumumab (Johnson & Johnson).

[0032] Un diseño ejemplar para un bsAb redireccionador de leucocitos divulgado en los Ejemplos a continuación combinó un scFv anti-CD3 con un F(ab)₂ anti-CD19 para formar un constructo designado (19)-3s, que se dirigió específicamente a las células B. Otros bsAbs que combinan anti-CD3 con fragmentos de anticuerpos contra otros antígenos asociados a tumores, de los que se habla con más detalle a continuación, son de utilidad en la inmunoterapia leucocitaria dirigida de diversos tumores sólidos. Las ventajas de este diseño incluyen la unión bivalente a las células tumorales, un mayor tamaño (~130 kDa) para impedir la rápida eliminación renal, y una potente citotoxicidad mediada por leucocitos. Los bsAbs median en la formación de sinapsis inmunológicas entre leucocitos y células diana afines, inducen la activación y proliferación de leucocitos en presencia de células diana, redirigen una potente destrucción de células diana mediada por leucocitos *in vitro* e inhiben el crecimiento de tumores humanos *in vivo*.

[0033] Los anticuerpos biespecíficos redireccionadores de leucocitos pueden producirse como complejos DNL™ trivalentes, con T_{1/2} más largo, mejores propiedades farmacocinéticas y mayor estabilidad *in vivo*. Los métodos para la producción y el uso de complejos DNL™, que comprenden dímeros de moléculas DDD de subunidades reguladoras de PKA humanas RI α , RI β , RII α o RII β , unidos a moléculas AD de AKAPs, son bien conocidos (véase, por ejemplo, Patentes de EE.UU. N.º 7,550,143; 7,521,056; 7,534,866; 7,527,787; 7,666,400; 7,906,118; 7,901,680; 8,003,111 y 8,034,352.) Mediante la unión de diferentes fracciones efectoras, como anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, a las fracciones DDD y AD, se pueden construir y utilizar complejos DNL™ que comprenden prácticamente cualquier combinación de efectores.

[0034] Los anticuerpos pueden ser de varios isotipos, preferiblemente IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humanos, y más preferiblemente comprender secuencias de región constante y bisagra IgG1 humanas. Los anticuerpos o fragmentos de los mismos pueden ser quiméricos humano-ratón, humanizados (marco humano y regiones hipervariables (CDR) murinas), o totalmente humanos, así como variaciones de los mismos, como los anticuerpos medio-IgG4 (denominados "unibodies"), descritos por van der Neut Kofschoten et al. (Science 2007; 317:1554-1557). Los anticuerpos o fragmentos de los mismos pueden diseñarse o seleccionarse para comprender secuencias de regiones constantes humanas que pertenezcan a alotipos específicos, lo que puede dar lugar a una inmunogenicidad reducida cuando se administran a un sujeto humano. Los alotipos preferidos para la administración incluyen un alotipo no-G1m1 (nG1m1), como G1m3, G1m3,1, G1m3,2 o G1m3,1,2. Más preferiblemente, el alotipo se selecciona del grupo formado por los alotipos nG1m1, G1m3, nG1m1,2 y Km3.

[0035] Según la presente invención tal como se define en las reivindicaciones, el método comprende administrar un anticuerpo inhibidor del punto de control. Dicho anticuerpo es antagonista de la función de los inhibidores de puntos de control. Muchos de estos anticuerpos son conocidos en la técnica, como el lambrolizumab (MK-3475, Merck), el nivolumab (BMS-936558, Bristol-Myers Squibb), el pidilizumab (CT-011, CureTech Ltd.), el AMP-224 (Merck), el MDX-1105 (Medarex), el MEDI4736 (MedImmune), el MPDL326580A (Genentech), el BMS-93651 (Genentech) y el AMP-224 (Merck), AMP-224 (Merck), MDX-1105 (Medarex), MEDI4736 (MedImmune), MPDL3280A (Genentech), BMS-936559 (Bristol-Myers Squibb), ipilimumab (Bristol-Myers Squibb) y tremelimumab (Pfizer). Los anticuerpos anti-KIR como lirlumab (Innate Pharma) e IPH2101 (Innate Pharma) pueden desempeñar funciones similares en las células NK. Cualquier anticuerpo inhibidor de puntos de control conocido puede utilizarse en combinación con uno o más de los otros agentes. Se ha observado que la terapia combinada con anticuerpos inmunoestimuladores aumenta la eficacia, por ejemplo contra las células tumorales. Morales-Kastresana et al. (2013, Clin Cancer Res 19:6151-62) demostraron que la combinación del anticuerpo anti-PD-L1 (10B5) con anticuerpos anti-CD137 (1D8) y anti-OX40 (OX86) proporcionaba una eficacia mejorada en un modelo de ratón transgénico de carcinoma hepatocelular. La combinación de anticuerpos anti-CTLA4 y anti-PD1 también ha demostrado ser muy eficaz (Volchok et al., 2013, N Engl J Med 369:122-33). La combinación de rituximab con anticuerpos anti-KIR, como lirlumab (Innate Pharma) o IPH2101 (Innate Pharma), también fue más eficaz contra los tumores hematopoyéticos (Kohrt et al., 2012). La persona con conocimientos ordinarios se dará cuenta de que la terapia combinada del sujeto puede incluir combinaciones con múltiples anticuerpos que sean inmunoestimuladores, antitumorales o agentes antiinfecciosos.

[0036] Otro agente que puede utilizarse en la práctica de la invención tal como se define en las reivindicaciones es un interferón. Los interferones de uso son conocidos en la técnica y pueden incluir interferón- α , interferón- β , interferón- $\lambda 1$, interferón- $\lambda 2$ o interferón- $\lambda 3$. Preferiblemente, el interferón es interferón- α . El interferón sujeto puede administrarse como interferón libre, interferón PEGilado, una proteína de fusión de interferón o interferón conjugado con un anticuerpo.

[0037] En realizaciones alternativas de la invención como se define en las reivindicaciones, uno o más de los agentes inmunomoduladores discutidos anteriormente pueden usarse en combinación con un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC). Los ADC son particularmente eficaces para reducir la carga tumoral sin toxicidad sistémica significativa y pueden actuar para mejorar la eficacia de la respuesta inmunitaria inducida por bsAb de redireccionamiento leucocitario, interferón y/o anticuerpo inhibidor de puntos de control. Los ADC de uso ejemplar pueden incluir ADC aprobados para uso terapéutico incluyen gemtuzumab ozogamicina para AML (posteriormente retirado del mercado), brentuximab vedotin

para ALCL y linfoma de Hodgkin, y trastuzumab emtansina para el cáncer de mama metastásico HER2-positivo (Verma et al., 2012, N Engl J Med 367:1783-91; Bross et al., 2001, Clin Cancer Res 7:1490-96; Francisco et al., 2003, Blood 102:1458-65). Otros numerosos candidatos a ADC se encuentran actualmente en fase de ensayo clínico, como inotuzumab ozogamicina (Pfizer), glembatumomab vedotin (Celldex Therapeutics), SAR3419 (Sanofi-Aventis), SAR56658 (Sanofi-Aventis), AMG-172 (Amgen), AMG-595 (Amgen), BAY-94-9343 (Bayer), B1B015 (Biogen Idec), BT062 (Biotest), SGN-75 (Seattle Genetics), SGN-CD19A (Seattle Genetics), vorsetuzumab mafodotin (Seattle Genetics), ABT-414 (AbbVie), ASG-5ME (Agensys), ASG-22ME (Agensys), ASG-16M8F (Agensys), IMGN-529 (ImmunoGen), IMGN-853 (ImmunoGen), MDX-1203 (Medarex), MLN-0264 (Millenium), RG-7450 (Roche/Genentech), RG-7458 (Roche/Genentech), RG-7593 (Roche/Genentech), RG-7596 (Roche/Genentech), RG-7598 (Roche/Genentech), RG-7599 (Roche/Genentech), RG-7600 (Roche/Genentech), RG-7636 (Roche/Genentech), ADC anti-PSMA (Progenics), lorvotuzumab mertansina (ImmunoGen), milatuzumab-doxorrubicina (Immunomedics), IMMU-130 (Immunomedics) e IMMU-132 (Immunomedics). (Véase, por ejemplo, Li et al., 2013, Drug Disc Ther 7:178-84; Firer & Gellerman, J Hematol Oncol 5:70; Beck et al., 2010, Discov Med 10:329-39; Mullard, 2013, Nature Rev Drug Discovery 12:329). Preferiblemente, cuando se utiliza un ADC en combinación con un inmunomodulador, el ADC se administra antes del inmunomodulador.

[0038] Los agentes sujetos pueden administrarse en combinación con uno o más inmunomoduladores para mejorar la respuesta inmunitaria. Los inmunomoduladores pueden incluir, entre otros, una citoquina, una quimioquina, un factor de crecimiento de células madre, una linfoxina, un factor hematopoyético, un factor estimulante de colonias (CSF), eritropoyetina, trombopoyetina, factor de necrosis tumoral- α (TNF), TNF- β , factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF), interferón- α , interferón- β , interferón- γ , interferón- λ , factor de crecimiento de células madre denominado "factor S1", hormona de crecimiento humano, N-metilil hormona de crecimiento humano, hormona de crecimiento bovina, hormona paratiroidea, tiroxina, insulina, proinsulina, relaxina, prorelaxina, hormona foliculoestimulante (FSH), hormona estimulante del tiroides (TSH), hormona luteinizante (LH), factor de crecimiento hepático, prostaglandina, factor de crecimiento de fibroblastos, prolactina, lactógeno placentario, proteína OB, sustancia inhibidora de la mulleriana, péptido asociado a la gonadotropina de ratón, inhibina, activina, factor de crecimiento endotelial vascular, integrina, NGF- β , factor de crecimiento plaquetario, TGF- α , TGF- β , factor de crecimiento similar a la insulina-I, factor de crecimiento similar a la insulina-II, macrófago-CSF (M-CSF), IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-21, IL-25, LIF, FLT-3, angiostatina, trombospodina, endostatina o linfoxina. En ciertas realizaciones, un anticuerpo biespecífico redireccionador de leucocitos o un fragmento de anticuerpo puede estar unido a un inmunomodulador, como una citoquina. Los complejos de citoquinas se divulgan, por ejemplo, en Patentes de EE.UU. N.º 7,906,118 y 8,034,3522.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0039]

FIG. 1. Diagrama esquemático de la formación del complejo DOCK-AND-LOCK™ que comprende anti-CD 19 F(ab)₂ x scFv anti-CD3.

FIG. 2A. Formación de sinapsis inmunitarias entre el linfoma de Burkitt Daudi y las células T, mediada por (19)-3s. Se combinaron células T recién aisladas con células Daudi en una proporción E:T de 2,5:1. Las células se trataron con 0, 1 o 5 μ g/mL de (19)-3s durante 30 min a temperatura ambiente antes del análisis por citometría de flujo. Se utilizaron anti-CD20-FITC y anti-CD7-APC para identificar células Daudi y T, respectivamente. La co-vinculación se indicó como el % de eventos CD20⁺/CD7⁺. Tras el tratamiento con (19)-3s, el 45,5% de los eventos de flujo fueron doblemente positivos para CD20/CD7, lo que indica sinapsis de células Daudi y T.

FIG. 2B. Las condiciones fueron las de la FIG. 2(A), excepto por la ausencia del anticuerpo (19)-3s. En comparación con FIG. 2(A), sólo el 2% de los eventos de flujo fueron CD20/CD7 doblemente positivos sin anticuerpos.

FIG. 2C. La adición de (19)-3s dio lugar a la asociación de >90% de los Daudi con células T.

FIG. 3A. Jurkat (células T) y Daudi (células B) se combinaron en una proporción de 1:1, se trataron con 0,1 μ g/mL de (19)-3s durante 30 minutos y se tiñeron con anti-CD20-FITC, antes del análisis mediante microscopía de fluorescencia.

FIG. 3B. Jurkat (células T) y Daudi (células B) se combinaron en una proporción de 1:1, se trataron con 0,1 μ g/mL de (19)-3s durante 30 minutos y se tiñeron con anti-CD20-FITC y anti-CD3-PE, antes de su análisis mediante microscopía de fluorescencia.

FIG. 3C. La imagen fusionada de FIG. 3A y 3B revelan la formación de sinapsis entre células Daudi teñidas de verde y células Jurkat teñidas de rojo.

FIG. 3D. La formación de sinapsis no fue evidente en ausencia de (19)-3s.

FIG. 4. Análisis dosis-respuesta de la asociación célula-célula mediada por (19)-3s de células Daudi y Jurkat en función de concentraciones crecientes de (19)-3s.

FIG. 5A. Comparación de la asociación célula a célula mediada por BITE® y DART™. Los datos de BITE® y DART™ se tomaron de Moore et al. (2011) Blood, 117:4542-4551).

FIG. 5B. Comparación de la asociación célula-célula mediada por (19)-3s.

FIG. 6A. Formación de sinapsis entre células T y células de cáncer de páncreas Capan-1 mediada por bsAb de control (19)-3s. Las células Capan-1 marcadas con CFSE se incubaron con Jurkat marcadas con PKH26 en presencia del bsAb.

FIG. 6B. Formación de sinapsis entre células T y células de cáncer de páncreas Capan-1 mediada por (M1)-3s MUC5AC bsAb. Las células Capan-1 marcadas con CFSE se coincubaron con Jurkat marcadas con PKH26 en presencia del bsAb.

FIG. 6C. Formación de sinapsis entre células T y células de cáncer de páncreas Capan-1 mediada por (E1)-3s TROP-2 targeting bsAb. Las células Capan-1 marcadas con CFSE se coincubaron con Jurkat marcadas con PKH26 en presencia del bsAb.

FIG. 7A. Activación de células T por (19)-3s. El aumento de la expresión de CD69 es un acontecimiento temprano en la activación de las células T. Las células Daudi combinadas con PBMC se trataron durante la noche con los anticuerpos indicados, y se tiñeron con anti-CD3-PE y anti-CD69-APC, antes del análisis por citometría de flujo. La expresión de CD69 se evaluó tras la separación de las células T mediante dispersión frontal frente a dispersión lateral y tinción anti-CD3. La combinación de células Daudi con un número igual de PBMC dio como resultado un 1,6% de células T CD69+. La adición de 3 ng/mL de (19)-3s indujo un 27% de células T CD69+. Ni el constructo de control [(M1)-3s], que comprende el módulo Okt3-scFv-AD2 fusionado con un F(ab)₂ no diana, ni el módulo hA19-Fab-DDD2, indujeron la activación de células T.

FIG. 7B. Activación de células T por (19)-3s. Las células Daudi combinadas con células T purificadas se trataron durante la noche con los anticuerpos indicados, y se tiñeron con anti-CD3-PE y anti-CD69-APC, antes del análisis por citometría de flujo. La expresión de CD69 se evaluó tras la separación de las células T mediante dispersión frontal frente a dispersión lateral y tinción anti-CD3. El tratamiento de células T Daudi y purificadas con (M1)-3s o hA19-Fab-DDD2 no aumentó el número de células T CD69+ (<4%), en comparación con la mezcla celular no tratada. Alternativamente, (19)-3s indujo una activación robusta de las células T, produciendo un 80% de células CD69+.

FIG. 7C. Activación de células T por (19)-3s. Las células T purificadas solas se trataron durante la noche con los anticuerpos indicados y se tiñeron con anti-CD3-PE y anti-CD69-APC, antes del análisis por citometría de flujo. La expresión de CD69 se evaluó tras la separación de las células T mediante dispersión frontal frente a dispersión lateral y tinción anti-CD3. Sin la adición de células Daudi (diana), (19)-3s no indujo la expresión de CD69 ni la activación de células T. Estos resultados demuestran que la formación de sinapsis mediada por (19)-3s entre las células T y las células diana es necesaria y suficiente para la activación de las células T.

FIG. 8A. Inducción de la proliferación de células T por (19)-3s. Las PBMC se incubaron con 3 nM o 30pM de (19)-3s, en comparación con el control positivo IL-2/PHA y (14)-3s (control de no unión a diana).

FIG. 8B. Inducción de la proliferación de células T por (19)-3s. La proliferación de células T no se observó en PBMC desprovistas de células B, lo que indica que las células diana (células B) son necesarias para la activación y proliferación de las células T.

FIG. 9A. Citotoxicidad *in vitro* de bsAbs redireccionadores de células T (19)-3s. Se determinaron las curvas dosis-respuesta de citotoxicidad para las células cancerosas Nalm-6, Raji, Ramos y Namalwa para el complejo bsAb DNL™ (19)-3s.

FIG. 9B. Citotoxicidad *in vitro* de bsAbs redireccionadores de células T (19)-3s. Se determinaron las curvas dosis-respuesta de citotoxicidad para las células cancerosas Nalm-6, Raji, Ramos y Namalwa para el complejo bsAb DNL™ (14)-3s (no diana).

FIG. 9C. Se observaron resultados coherentes utilizando PBMC, o células T, obtenidas de dos donantes diferentes y células cancerosas Nalm-6.

FIG. 10A. Citotoxicidad *in vitro* de los bsAbs redireccionadores de células T (20)-3s, (22)-3s y (C2)-3s. Se determinaron las curvas dosis-respuesta para la citotoxicidad inducida por los bsAbs redireccionadores de células T (20)-3s, (22)-3s y (C2)-3s en células Namalwa.

FIG. 10B. Citotoxicidad *in vitro* de los bsAbs redireccionadores de células T (20)-3s, (22)-3s y (C2)-3s. Se determinaron las curvas dosis-respuesta para la citotoxicidad inducida por los bsAbs redireccionadores de células T (20)-3s, (22)-3s y (C2)-3s en las células Jeko.

FIG. 10C. Citotoxicidad *in vitro* de los bsAbs redireccionadores de células T (20)-3s, (22)-3s y (C2)-3s. Se determinaron curvas dosis-respuesta para la citotoxicidad inducida por los bsAbs (20)-3s, (22)-3s y (C2)-3s redireccionadores de células T en células Daudi.

FIG. 11A. Citotoxicidad *in vitro* de bsAbs redireccionadores de células T en líneas celulares de tumores sólidos. Se determinaron curvas dosis-respuesta para la citotoxicidad de la línea celular de adenocarcinoma de colon LS174T para el bsAb (14)-3s, en comparación con el bsAb no diana (19)-3s.

FIG. 11B. Citotoxicidad *in vitro* de bsAbs redireccionadores de células T en líneas celulares de tumores sólidos. Se determinaron curvas dosis-respuesta para la citotoxicidad en la línea celular de adenocarcinoma pancreático Capan-1 para el bsAb (E1)-3s, en comparación con el bsAb no diana (19)-3s.

FIG. 11C. Citotoxicidad *in vitro* de bsAbs redireccionadores de células T en líneas celulares de tumores sólidos. Se determinaron las curvas dosis-respuesta para la citotoxicidad de los bsAbs (E1)-3s y (15)-3s en la línea celular de carcinoma gástrico NCI-N87, en comparación con el bsAb no diana (19)-3s.

FIG. 12. Resumen de los datos de citotoxicidad *in vitro* de los bsAbs redireccionadores de células T en líneas celulares cancerosas.

FIG. 13A. Redireccionamiento *in vivo* de xenoinjertos de linfoma Raji mediante (19)-3s bsAb. Ratones NOD/SCID portadores de xenoinjertos de linfoma de Burkitt Raji (1 x10⁶ células), reconstituidos con

PBMC humanas (5×10^6 células) y tratados con (19)-3s durante sólo 1 semana, administrados como indican las flechas. Control con células no tratadas.

FIG. 13B. Redireccionamiento *in vivo* de xenoinjertos de linfoma Raji mediante (19)-3s bsAb. Ratones NOD/SCID portadores de xenoinjertos de linfoma de Burkitt Raji (1×10^6 células), reconstituidos con PBMC humanas (5×10^6 células) y tratados con (19)-3s durante sólo 1 semana, administrados como indican las flechas. Las células se trataron con una dosis única de 130 µg.

FIG. 13C. Redireccionamiento *in vivo* de xenoinjertos de linfoma Raji mediante (19)-3s bsAb. Ratones NOD/SCID portadores de xenoinjertos de linfoma de Burkitt Raji (1×10^6 células), reconstituidos con PBMC humanas (5×10^6 células) y tratados con (19)-3s durante sólo 1 semana, administrados como indican las flechas. Las células se trataron 3 veces con 43 µg por dosis.

FIG. 13D. Redireccionamiento *in vivo* de xenoinjertos de linfoma Raji mediante (19)-3s bsAb. Ratones NOD/SCID portadores de xenoinjertos de linfoma de Burkitt Raji (1×10^6 células), reconstituidos con PBMC humanas (5×10^6 células) y tratados con (19)-3s durante sólo 1 semana, administrados como indican las flechas. Las células se trataron 5 veces con 26 µg por dosis.

FIG. 14A. Efecto de la dosificación repetida en el redireccionamiento *in vivo* de xenoinjertos de linfoma Raji utilizando bsAb (19)-3s. Se prepararon xenoinjertos de ratón NOD/SCID como se indica en la leyenda de la FIG. 13. El (19)-3s se administró como indican las flechas. FIG. 14A muestra el control no tratado.

FIG. 14B. Efecto de la dosificación repetida en el redireccionamiento *in vivo* de xenoinjertos de linfoma Raji utilizando bsAb (19)-3s. El (19)-3s se administró como indican las flechas. Las células se trataron 2 veces con 130 µg por dosis de (19)-3s administrado i.v.

FIG. 14C. Efecto de la dosificación repetida en el redireccionamiento *in vivo* de xenoinjertos de linfoma Raji utilizando bsAb (19)-3s. El (19)-3s se administró como indican las flechas. Las células se trataron 2 veces con 130 µg por dosis de (19)-3s administrado s.c.

FIG. 14D. Efecto de la dosificación repetida en el redireccionamiento *in vivo* de xenoinjertos de linfoma Raji utilizando bsAb (19)-3s. El (19)-3s se administró como indican las flechas. Las células se trataron 4 veces con 65 µg por dosis de (19)-3s administrado i.v.

FIG. 14E. Efecto de la dosificación repetida en el redireccionamiento *in vivo* de xenoinjertos de linfoma Raji utilizando bsAb (19)-3s. El (19)-3s se administró como indican las flechas. Las células se trataron 6 veces con 43 µg por dosis de (19)-3s administrado i.v.

FIG. 14F. Efecto de la dosificación repetida en el redireccionamiento *in vivo* de xenoinjertos de linfoma Raji utilizando bsAb (19)-3s. El (19)-3s se administró como indican las flechas. Las células se trataron 6 veces con 43 µg por dosis de control (M1)-3s administrado i.v.

FIG. 15A. Eficacia *in vivo* de los bsAbs de redireccionamiento de células T en xenoinjertos de tumores sólidos. Se prepararon xenoinjertos de ratón NOD/SCID con adenocarcinoma de colon LS174T. A los ratones sólo se les administraron células T sin bsAb.

FIG. 15B. Eficacia *in vivo* de los bsAbs de redireccionamiento de células T en xenoinjertos de tumores sólidos. Se prepararon xenoinjertos de ratón NOD/SCID con adenocarcinoma de colon LS174T. Los ratones fueron tratados con (E1)-3s bsAb según se indica.

FIG. 15C. Eficacia *in vivo* de los bsAbs de redireccionamiento de células T en xenoinjertos de tumores sólidos. Se prepararon xenoinjertos de ratón NOD/SCID con carcinoma pancreático Capan-1. A los ratones sólo se les administraron PBMC sin bsAb.

FIG. 15D. Eficacia *in vivo* de los bsAbs de redireccionamiento de células T en xenoinjertos de tumores sólidos. Se prepararon xenoinjertos de ratón NOD/SCID con carcinoma pancreático Capan-1. Los ratones fueron tratados con (14)-3s bsAb según se indica.

FIG. 16A. Inhibición *in vivo* del crecimiento tumoral por el complejo DNL™ (E1)-3s en presencia o ausencia de interferón-α. Se trataron xenoinjertos de carcinoma pancreático Capan-1 en ratones NOD/SCID con bsAb anti-TROP-2 x anti-CD3 con o sin interferón-α añadido. El interferón-α se añadió en forma de un complejo TROP-2 dirigido a DNL™.

FIG. 16B. Inhibición *in vivo* del crecimiento tumoral por el complejo DNL™ (E1)-3s en presencia o ausencia de interferón-α. Se trataron xenoinjertos de carcinoma pancreático Capan-1 en ratones NOD/SCID con bsAb anti-TROP-2 x anti-CD3 con o sin interferón-α añadido. El interferón-α se añadió en forma de PEGASYS® (peginterferón alfa-2a), disponible en el mercado.

FIG. 17. Curvas de supervivencia de ratones NOD/SCID tratados con (E1)-3s con o sin interferón-α. Los controles no se trataron o se trataron sólo con interferón-α.

FIG. 18. Inhibición *in vivo* del crecimiento tumoral por el complejo DNL™ (E1)-3s en presencia o ausencia de interferón-α, en comparación con el control TF12. Se trataron xenoinjertos de carcinoma pancreático Capan-1 en ratones NOD/SCID con bsAb anti-TROP-2 x anti-CD3 con o sin interferón-α añadido, añadido como PEGASYS®, en comparación con el control no tratado, el control TF12 o PEGASYS® solo.

FIG. 19. Curvas de supervivencia de ratones NOD/SCID tratados con (E1)-3s con o sin interferón-α (PEGASYS®). Los controles no se trataron o se trataron sólo con PEGASYS® o sólo con TF12.

FIG. 20. Inhibición *in vivo* del crecimiento tumoral por el complejo DNL™ (E1)-3s en presencia o ausencia de interferón-α, en comparación con el control TF12. Se trataron xenoinjertos de cáncer gástrico humano NCI-N87 en ratones NOD/SCID con bsAb anti-TROP-2 x anti-CD3 con o sin interferón-α añadido, añadido como PEGASYS®, en comparación con el control no tratado, el control TF12 o

PEGASYS® solo.

FIG. 21. Curvas de supervivencia de ratones NOD/SCID con xenoinjertos de cáncer gástrico NCI-N87 tratados con (E1)-3s con o sin interferón- α (PEGASYS®). Los controles no se trataron o se trataron sólo con PEGASYS® o sólo con TF12.

FIG. 22. Representación esquemática del polipéptido naciente E1-3. LP, péptido líder que se elimina en la proteína madura; VH, dominio variable de cadena pesada, VK, dominio variable de cadena ligera kappa, L1, péptido de engarce 1; L2, péptido de engarce 2; L3, péptido de engarce 3; 6H, hexa-histidina.

FIG. 23A. Eliminación ex vivo redirigida por células T de la línea celular de tumores sólidos de cáncer de páncreas humano BxPC3.

FIG. 23B. Eliminación ex vivo redirigida por células T de la línea celular de tumor sólido de cáncer de páncreas humano Capan-1.

FIG. 23C. Eliminación ex vivo redirigida por células T de la línea celular de tumores sólidos de cáncer gástrico humano NCI-N87.

FIG. 24. Terapia *in vivo* redirigida por células T del carcinoma gástrico NCI-N87 en ratones NOD-SCID.

FIG. 25. Formación de sinapsis inmunológicas y trogocitosis bidireccional mediada por (E1)-3s. Las células T purificadas se mezclaron con células BxPC3 en una proporción de 5:1 y se incubaron durante 60 minutos con 0,1 nmol/L del bsAb indicado antes de la tinción con MAb anti-Trop-2 C518 y GAM-Fc-FITC. Las células se analizaron por citometría de flujo, separando primero las células T no conjugadas y las células BxPC3 por dispersión frontal frente a dispersión lateral. La trogocitosis de Trop-2 desde las células BxPC3 a las células T se hizo evidente mediante la detección de Trop-2 en células T, específicamente en mezclas de células con (E1)-3s, mostrada como el porcentaje de células T no conjugadas Trop-2-positivas.

FIG. 26. Formación de sinapsis inmunológicas y trogocitosis bidireccional mediada por (E1)-3s. Las células T purificadas se mezclaron con células BxPC3 en una proporción de 5:1 y se incubaron durante 60 minutos con 0,1 nmol/L del bsAb indicado antes de la tinción con MAb anti-Trop-2 C518 y GAM-Fc-FITC. Las células se analizaron por citometría de flujo, separando primero las células T no conjugadas y las células BxPC3 por dispersión frontal frente a dispersión lateral. La trogocitosis dio lugar a una reducción de Trop-2 en las células BxPC3, mostrada como MFI geométrica.

FIG. 27A. Inducción de citoquinas. (A) Las PBMC (6×10^6 células/pocillo) se combinaron con Raji (5×10^5 células/pocillo) y se trataron durante 20 h con 0,1 nM 19-3 BiTE (a cuadros), (19)-3s (negro), o se incubaron sin bsAb (blanco, no probado para D-5). Las concentraciones de TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-6 e IL-10 en los fluidos sobrenadantes se determinaron utilizando kits ELISA comerciales. D-1 a D-8 son donantes de sangre independientes, mientras que sólo D-5 se utilizó en A y B al mismo tiempo.

FIG. 27B. Las células NCI-N87 (5×10^5 células/0,5 ml/pocillo) se cultivaron durante la noche en placas de 24 pocillos para permitir la adhesión celular. Se añadieron PBMC a pocillos que contenían células NCI-N87 adheridas (proporción 10:1) y se trataron durante 20 h con 0,1 nM de (E1)-3s (negro), peginterferonalfa-2a (blanco), (E1)-3s más peginterferonalfa-2a (a cuadros), o sin tratar (gris). Las concentraciones de TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-6 e IL-10 en los fluidos sobrenadantes se determinaron utilizando kits ELISA comerciales. D-1 a D-8 son donantes de sangre independientes, mientras que sólo D-5 se utilizó en A y B al mismo tiempo.

FIG. 28A. Citotoxicidad *in vitro*. Las células T CD8⁺ purificadas aisladas de un primer donante se pretrataron durante 24 h con peginterferonalfa-2a 0,1 nM (\blacktriangle , discontinuo), 20*-2b 0,1 nM (\bullet , gris) o medio (\blacksquare , negro) antes de combinarlas con células NCI-N87 marcadas con fluorescencia verde PKH-67 en una proporción 5:1. Las mezclas celulares se trataron con titulaciones de (E1)-3s durante dos días antes de contar el número de células NCI-N87 vivas mediante citometría de flujo. Análisis de regresión no lineal (dosis-respuesta sigmoidal) del porcentaje de lisis, que se calculó para cada muestra mediante la fórmula $[1-(A_1/A_2)] \times 100$, donde A_1 y A_2 representan el número de células diana viables en las muestras de ensayo y no tratadas, respectivamente, frente al logaritmo de la concentración molar de (E1)-3 s.

FIG. 28B. Citotoxicidad *in vitro*. Las células T CD8⁺ purificadas aisladas de un segundo donante se pretrataron durante 24 h con peginterferonalfa-2a 0,1 nM (\blacktriangle , discontinuo), 20*-2b 0,1 nM (\bullet , gris) o medio (\blacksquare , negro) antes de combinarlas con células NCI-N87 marcadas con fluorescencia verde PKH-67 en una proporción de 5:1. Las mezclas celulares se trataron con titulaciones de (E1)-3s durante dos días antes de contar el número de células NCI-N87 vivas mediante citometría de flujo. Análisis de regresión no lineal (dosis-respuesta sigmoidal) del porcentaje de lisis, que se calculó para cada muestra mediante la fórmula $[1-(A_1/A_2)] \times 100$, donde A_1 y A_2 representan el número de células diana viables en las muestras de ensayo y no tratadas, respectivamente, frente al logaritmo de la concentración molar de (E1)-3 s.

FIG. 29A. Activación de las células T. Las células T purificadas se mezclaron 5:1 con células NCI-N87 y se trataron durante 18 h con (E1)-3s antes de medir la expresión de CD69 mediante citometría de flujo. Análisis de regresión no lineal (dosis-respuesta sigmoidal) del porcentaje de células T CD4⁺ (\bullet) o CD8⁺ (\blacksquare) CD69-positivas frente al logaritmo de la concentración molar de (E1)-3s, en presencia (línea discontinua) o ausencia (línea continua) de 0,1 nM de peginterferonalfa-2a.

FIG. 29B. Activación de las células T. Las células T purificadas se mezclaron 5:1 con células NCI-N87 y se trataron durante 18 h con (E1)-3s antes de medir la expresión de CD69 mediante citometría de flujo. Histograma que muestra la tinción anti-CD69-APC de células T CD8⁺ tras el tratamiento con 0,1

nM (E1)-3s (punteado), 0,1 nM peginterferonalfa-2a (gris), o una combinación de ambos agentes (negro), en presencia de células NCI-N87.

FIG. 29C. Activación de las células T. Las células T purificadas se mezclaron 5:1 con células NCI-N87 y se trataron durante 18 h con (E1)-3s antes de medir la expresión de CD69 mediante citometría de flujo. Porcentaje de células T CD8⁺ CD69-positivas tras incubación con 0,1 nM (E1)-3s (E) y/o 0,1 nM peginterferonalfa-2a (P), en ausencia o presencia de células diana NCI-N87 (T). Cada tratamiento se ensayó por triplicado. Barras de error, S.D.*, P<0,001.

FIG. 29D. Activación de las células T. Las células T purificadas se mezclaron 5:1 con células NCI-N87 y se trataron durante 18 h con (E1)-3s antes de medir la expresión de CD69 mediante citometría de flujo. Fluorescencia media geométrica de las células CD69⁺ tras incubación con 0,1 nM (E1)-3s (E) y/o 0,1 nM peginterferonalfa-2a (P), en ausencia o presencia de células diana NCI-N87 (T). Cada tratamiento se ensayó por triplicado. Barras de error, S.D.*, P<0,001.

FIG. 30A. Eficacia *in vivo* con xenoinjertos humanos de cáncer de páncreas y gástrico. Grupos de 8 ratones inoculados con células T humanas y células de cáncer de páncreas Capan-1 fueron tratados diariamente durante cinco días con 50 µg de (E1)-3s (▲, negro sólido) o 60 µg de TF12 (▼, gris), una vez por semana durante cuatro semanas con 0,6 µg de peginterferonalfa-2a (*, negro sólido), una combinación de regímenes con (E1)-3s y peginterferonalfa-2a (●, negro sólido) o con solución salina (●, negro discontinuo). Un grupo adicional fue inoculado con Capan-1, pero no con células T, y tratado con peginterferonalfa-2a (0, negro discontinuo). Panel superior, gráficos de supervivencia de Kaplan-Meier. Panel inferior, volúmenes tumorales medios (+S.D.) frente a días. Los datos marcados con un asterisco se han adaptado de la Fig. 6C de Rossi et al. (2014, MAbs 6:381-91).

FIG. 30B. Eficacia *in vivo* con xenoinjertos humanos de cáncer de páncreas y gástrico. Grupos de 8 ratones inoculados con células T humanas y células de cáncer de páncreas Capan-1 fueron tratados diariamente durante cinco días con 50 µg de (E1)-3s (A, negro sólido) o 60 µg de TF12 (▼, gris), una vez por semana durante cuatro semanas con 0,6 µg de peginterferonalfa-2a (*, negro sólido), una combinación de regímenes de (E1)-3s y peginterferonalfa-2a (●, negro sólido) o con solución salina (●, negro discontinuo). Un grupo adicional fue inoculado con Capan-1, pero no con células T, y tratado con peginterferonalfa-2a (0, negro discontinuo). Panel superior, gráficos de supervivencia de Kaplan-Meier. Panel inferior, volúmenes tumorales medios (+S.D.) frente a días. Los datos marcados con un asterisco se han adaptado de la Fig. 6C de Rossi et al. (2014, MAbs 6:381-91).

FIG. 30C. Eficacia *in vivo* con xenoinjertos humanos de cáncer de páncreas y gástrico. Grupos de 8 ratones inoculados con células de cáncer gástrico NCI-N87 fueron tratados diariamente durante cinco días con 50 µg de (E1)-3s (A, negro sólido) o 60 µg de TF12 (▼, gris), una vez por semana durante cuatro semanas con 0,6 µg de peginterferonalfa-2a (*, negro sólido), una combinación de regímenes de (E1)-3s y peginterferonalfa-2a (●, negro sólido) o con solución salina (●, negro discontinuo). Un grupo adicional fue inoculado con Capan-1, pero no con células T, y tratado con peginterferonalfa-2a (0, negro discontinuo). Panel superior, gráficos de supervivencia de Kaplan-Meier. Panel inferior, volúmenes tumorales medios (+S.D.) frente a días. Los datos marcados con un asterisco se han adaptado de la Fig. 6C de Rossi et al. (2014, MAbs 6:381-91).

FIG. 31. Producción de citoquinas inducida por E1-3. Se combinaron PBMC en una proporción de 5:1 con células BxPC-3 y se trataron con una titulación de E1-3 durante 24 h. Las concentraciones de citoquinas se midieron utilizando kits ELISArray de analito único (Qiagen). Todos los niveles de citoquinas fueron <10 pg/mL en ausencia de E1-3.

FIG. 32. Eliminación *in vitro* de líneas celulares de cáncer gástrico y de páncreas por células T redirigidas. Células T CD8⁺ purificadas (1,2 x10⁵/pocillo) se mezclaron 6:1 con células diana (2 x10⁴/pocillo) y se trataron con titulaciones de E1-3 en una placa de 96 pocillos. Tras 48 h, se lavaron los pocillos para eliminar las células T y se determinaron las densidades de células diana viables con un ensayo MTS. Ejemplo de resultados de uno de varios donantes de células T.

FIG. 33A. Terapia *in vivo* de xenoinjertos tumorales gástricos humanos. Las PBMC se mezclaron 2:1 con células NCI-N87 y se inyectaron s.c. con matrigel en ratones NOD-SCID. Los animales recibieron 50 µg de E1-3 i.v. los días 0 y 3. Los ratones fueron controlados diariamente para detectar signos de crecimiento tumoral, tras lo cual se midieron los tumores dos veces por semana con un criterio de valoración de >1,0 cm³. Después de 176 días, 7 de los 8 ratones del grupo de tratamiento con E1-3 no habían alcanzado el criterio de valoración y 6 animales permanecían libres de tumores.

FIG. 33B. Terapia *in vivo* de xenoinjertos tumorales gástricos humanos. Las PBMC se mezclaron 2:1 con células NCI-N87 y se inyectaron s.c. con matrigel en ratones NOD-SCID. Los animales recibieron 50 µg de E1-3 i.v. los días 0 y 3. Los ratones fueron controlados diariamente para detectar signos de crecimiento tumoral, tras lo cual se midieron los tumores dos veces por semana con un criterio de valoración de >1,0 cm³. Los tumores del grupo de control compuesto únicamente por PBMC y NCI-87 alcanzaron el punto final con una mediana de tiempo de 39,5 días.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Definiciones

[0040] A menos que se especifique lo contrario, un/una significa "uno o más".

[0041] Tal y como se utilizan en el presente documento, los términos "y" y "o" pueden emplearse en sentido conjuntivo o disyuntivo. Es decir, ambos términos deben entenderse como equivalentes a "y/o" salvo que se indique lo contrario.

[0042] Un "agente terapéutico" es un átomo, molécula o compuesto que es útil en el tratamiento de una enfermedad. Entre los ejemplos de agentes terapéuticos se incluyen anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, péptidos, fármacos, toxinas, enzimas, nucleasas, hormonas, inmunomoduladores, oligonucleótidos antisentido, ARN interferente pequeño (ARNsi), quelantes, compuestos de boro, agentes fotoactivos, tintes y radioisótopos.

[0043] Un "anticuerpo", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una molécula de inmunoglobulina de longitud completa (es decir, de origen natural o formada por procesos recombinatorios de fragmentos de genes de inmunoglobulina normales) (*por ejemplo*, un anticuerpo IgG) o a una porción inmunológicamente activa (es decir, de unión específica) de una molécula de inmunoglobulina, como un fragmento de anticuerpo. Un "anticuerpo" incluye anticuerpos monoclonales, policlonales, biespecíficos, multiespecíficos, murinos, quiméricos, humanizados y humanos.

[0044] Un "anticuerpo desnudo" es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que no está unido a un agente terapéutico o de diagnóstico. La porción Fc de un anticuerpo desnudo intacto puede proporcionar funciones efectoras, como la fijación del complemento y la ADCC (véase, *por ejemplo*, Markrides, Pharmacol Rev 50:59-87, 1998). Otros mecanismos por los que los anticuerpos desnudos inducen la muerte celular pueden incluir la apoptosis. (Vaswani y Hamilton, Ann Allergy Asthma Immunol 81: 105-119, 1998.)

[0045] Un "fragmento de anticuerpo" es una porción de un anticuerpo intacto como F(ab')₂, F(ab)₂, Fab', Fab, Fv, scFv, dAb y similares. Independientemente de su estructura, un fragmento de anticuerpo se une al mismo antígeno reconocido por el anticuerpo completo. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos aislados consistentes en las regiones variables, como los fragmentos "Fv" consistentes en las regiones variables de las cadenas pesada y ligera o moléculas polipeptídicas recombinantes de cadena única en las que las regiones variables ligera y pesada están conectadas por un engarce peptídico ("proteínas scFv"). Los "anticuerpos de cadena simple", a menudo abreviados como "scFv", consisten en una cadena polipeptídica que comprende un dominio V_H y un dominio V_L que interactúan para formar un sitio de unión al antígeno. Los dominios V_H y V_L suelen estar unidos por un péptido de 1 a 25 residuos de aminoácidos. Los fragmentos de anticuerpos también incluyen diabodies, triabodies y anticuerpos de dominio único (dAb).

[0046] Un "anticuerpo quimérico" es una proteína recombinante que contiene los dominios variables, incluidas las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de un anticuerpo derivado de una especie, preferentemente un anticuerpo de roedor, mientras que los dominios constantes de la molécula de anticuerpo se derivan de los de un anticuerpo humano. Para aplicaciones veterinarias, los dominios constantes del anticuerpo quimérico pueden derivarse del de otras especies, como un gato o un perro.

[0047] Un "anticuerpo humanizado" es una proteína recombinante en la que las CDR de un anticuerpo de una especie; por ejemplo, un anticuerpo de roedor, se transfieren de las cadenas variables pesadas y ligeras del anticuerpo de roedor a dominios variables pesados y ligeros humanos, incluyendo secuencias de región marco (FR) humanas. Los dominios constantes de la molécula de anticuerpo se derivan de los de un anticuerpo humano. Para mantener la actividad de unión, puede sustituirse un número limitado de residuos de aminoácidos FR del anticuerpo parental (por ejemplo, murino) por los residuos FR humanos correspondientes.

[0048] Un "anticuerpo humano" es un anticuerpo obtenido a partir de ratones transgénicos que han sido modificados genéticamente para producir anticuerpos humanos específicos en respuesta a una provocación antigénica. En esta técnica, se introducen elementos de los locus humanos de cadenas pesadas y ligeras en cepas de ratones derivadas de líneas de células madre embrionarias que contienen interrupciones dirigidas de los loci endógenos de cadenas pesadas y ligeras. Los ratones transgénicos pueden sintetizar anticuerpos humanos específicos para antígenos humanos, y los ratones pueden utilizarse para producir hibridomas humanos secretores de anticuerpos. Los métodos para obtener anticuerpos humanos a partir de ratones transgénicos se describen en Green et al., Nature Genet. 7:13 (1994), Lonberg et al., Nature 368:856 (1994), y Taylor et al., Int. Immun. 6:579 (1994). Un anticuerpo humano también puede construirse por métodos de transfección genética o cromosómica, así como por tecnología de visualización de fagos, todos ellos conocidos en la técnica. (Véase, por ejemplo, McCafferty et al., 1990, Nature 348:552-553 para la producción de anticuerpos humanos y fragmentos de los mismos *in vitro*, a partir de repertorios de genes de dominio variable de inmunoglobulina de donantes no inmunizados). En esta técnica, los genes de dominio variable de los anticuerpos se clonan dentro del marco de un gen de proteína de cubierta mayor o menor de un bacteriófago filamentoso, y se expresan como fragmentos de anticuerpos funcionales en la superficie de la partícula del fago. Dado que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN monocatenario del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también dan lugar a la selección del gen que codifica el anticuerpo que presenta esas propiedades. De este modo, el fago imita algunas de las propiedades de la célula B. La expresión en fago puede realizarse en una gran variedad de formatos; para su revisión, véase, por ejemplo, Johnson and Chiswell, Current Opinion in Structural Biology 3:556-571 (1993). Los anticuerpos humanos también pueden ser generados por células B activadas *in vitro*. (Véase Pat. de EE. UU. N.º 5,567,610 y 5,229,275).

[0049] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "proteína de fusión de anticuerpos" es una molécula de

unión a antígeno producida de forma recombinante en la que un anticuerpo o fragmento de anticuerpo está unido a otra proteína o péptido, como el mismo anticuerpo o fragmento de anticuerpo o un péptido DDD o AD. La proteína de fusión puede comprender un único componente de anticuerpo, una combinación multivalente o multispecífica de diferentes componentes de anticuerpo o múltiples copias del mismo componente de anticuerpo. La proteína de fusión puede comprender además un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo y un agente terapéutico. Ejemplos de agentes terapéuticos adecuados para dichas proteínas de fusión incluyen inmunomoduladores y toxinas. Una toxina preferida comprende una ribonucleasa (RNasa), preferiblemente una RNasa recombinante. Un inmunomodulador preferido podría ser un interferón, como el interferón- α , el interferón- β o el interferón- λ .

[0050] Un "anticuerpo multispecífico" es un anticuerpo que puede unirse simultáneamente al menos a dos dianas que son de estructura diferente, por ejemplo, dos antígenos diferentes, dos epítomos diferentes en el mismo antígeno, o un hapteno y/o un antígeno o epítipo. Un "anticuerpo multivalente" es un anticuerpo que puede unirse simultáneamente al menos a dos dianas de igual o diferente estructura. La valencia indica cuántos brazos o sitios de unión tiene el anticuerpo a un único antígeno o epítipo; es decir, monovalente, bivalente, trivalente o multivalente. La multivalencia del anticuerpo significa que puede aprovechar múltiples interacciones en la unión a un antígeno, aumentando así la avidéz de unión al antígeno. La especificidad indica cuántos antígenos o epítomos es capaz de unir un anticuerpo; es decir, monoespecífico, biespecífico, triespecífico, multispecífico. Según estas definiciones, un anticuerpo natural, por ejemplo una IgG, es bivalente porque tiene dos brazos de unión, pero es monoespecífico porque se une a un epítipo. Los anticuerpos multispecíficos y multivalentes son constructos que tienen más de un sitio de unión de diferente especificidad.

[0051] Un "anticuerpo biespecífico" es un anticuerpo que puede unirse simultáneamente a dos dianas de estructura diferente. Los anticuerpos biespecíficos (bsAb) y los fragmentos de anticuerpos biespecíficos (bsFab) pueden tener al menos un brazo que se une específicamente a, por ejemplo, una célula T, una célula NK, un monocito o un neutrófilo, y al menos otro brazo que se une específicamente a un antígeno producido por o asociado a una célula, tejido, órgano o patógeno enfermo, por ejemplo un antígeno asociado a un tumor. Mediante ingeniería molecular se pueden producir diversos anticuerpos biespecíficos.

[0052] Se dice que una preparación de anticuerpos, o una composición descrita en el presente documento, se administra en una "cantidad terapéuticamente eficaz" si la cantidad administrada es fisiológicamente significativa. Un agente es fisiológicamente significativo si su presencia provoca un cambio detectable en la fisiología de un sujeto receptor. En realizaciones particulares, una preparación de anticuerpos es fisiológicamente significativa si su presencia invoca una respuesta antitumoral o mitiga los signos y síntomas de un estado de enfermedad infecciosa. Un efecto fisiológicamente significativo podría ser también la evocación de una respuesta inmunitaria humoral y/o celular en el sujeto receptor que condujera a la inhibición del crecimiento o a la muerte de las células diana.

Anticuerpos anti-Trop-2

[0053] En una realización preferida de la invención como se define en las reivindicaciones, el anticuerpo anti-Trop-2 puede ser un anticuerpo RS7 humanizado (véase, por ejemplo, Patente de EE. UU. N.º 7.238.785), que comprende las secuencias CDR de cadena ligera CDR1 (KASQDVSIIVA, SEQ ID N.º:115); CDR2 (SASYRYT, SEQ ID N.º:116); y CDR3 (QQHYITPLT, SEQ ID N.º:117) y las secuencias CDR de la cadena pesada CDR1 (NYGMN, SEQ ID N.º:118); CDR2 (WINTYTGEPTYTDDFKG, SEQ ID N.º:119) y CDR3 (GGFGSSYWFYFDV, SEQ ID N.º:120).

[0054] El anticuerpo RS7 era una IgG₁ murina criada contra una preparación de membrana cruda de un carcinoma pulmonar de células escamosas primario humano. (Stein et al., Cancer Res. 50: 1330, 1990) El anticuerpo RS7 reconoce una glicoproteína de 46-48 kDa, caracterizada como cluster 13 (Stein et al., Int. J. Cancer Supp. 8:98-102, 1994). El antígeno se designó como EGP-1 (glicoproteína epitelial-1), pero también se conoce como Trop-2.

[0055] Trop-2 es una proteína transmembrana de tipo I y se ha clonado a partir de células humanas (Fornaro et al., Int J Cancer 1995; 62:610-8) y de ratón (Sewedy et al., Int J Cancer 1998; 75:324-30). Además de su papel como transductor de señales de calcio asociado a tumores (Ripani et al., Int J Cancer 1998;76:671-6), se demostró que la expresión de Trop-2 humano era necesaria para la tumorigénesis y la invasividad de las células de cáncer de colon, que podía reducirse eficazmente con un anticuerpo policlonal contra el dominio extracelular de Trop-2 (Wang et al., Mol Cancer Ther 2008;7:280-5).

[0056] El creciente interés en Trop-2 como diana terapéutica para cánceres sólidos (Cubas et al., Biochim Biophys Acta 2009;1796:309-14) queda atestiguado por otros informes que documentan la importancia clínica de Trop-2 sobreexpresado en mama (Huang et al., Clin Cancer Res 2005;11:4357-64), colorrectal (Ohmachi et al., Clin Cancer Res 2006;12:3057-63; Fang et al., Int J Colorectal Dis 2009;24:875-84) y carcinomas de células escamosas orales (Fong et al., Modern Pathol 2008;21:186-91). Cabe destacar las últimas pruebas de que las células basales de la próstata que expresan altos niveles de Trop-2 están enriquecidas para una actividad similar a la de las células madre *in vitro* e *in vivo* (Goldstein et al., Proc Natl Acad Sci USA 2008;105:20882-7).

[0057] Los estudios de citometría de flujo y tinción inmunohistoquímica han demostrado que el MAb RS7 detecta el antígeno en una variedad de tipos de tumores, con una unión limitada al tejido humano normal (Stein et al., 1990). Trop-2 se expresa principalmente en carcinomas como los de pulmón, estómago, vejiga urinaria, mama, ovario, útero y próstata.

Los estudios de localización y terapia utilizando MAb RS7 murino radiomarcados en modelos animales han demostrado la localización en tumores y la eficacia terapéutica (Stein et al., 1990; Stein et al., 1991).

[0058] Se ha demostrado una fuerte tinción de RS7 en tumores de pulmón, mama, vejiga, ovario, útero, estómago y próstata. (Stein et al., Int. J. Cancer 55:938, 1993) Los casos de cáncer de pulmón comprendían tanto carcinomas de células escamosas como adenocarcinomas. (Stein et al., Int. J. Cancer 55:938, 1993) Ambos tipos celulares se tiñeron fuertemente, lo que indica que el anticuerpo RS7 no distingue entre clases histológicas de carcinoma pulmonar no microcítico.

[0059] El MAb RS7 se internaliza rápidamente en las células diana (Stein et al., 1993). La constante de velocidad de internalización del MAb RS7 es intermedia entre las constantes de velocidad de internalización de otros dos MAbs de internalización rápida, que han demostrado ser útiles para la producción de inmunotoxinas. (*Id.*) Está bien documentado que la internalización de los conjugados de inmunotoxinas es un requisito para la actividad antitumoral. (Pastan et al., Cell 47:641, 1986) La internalización de inmunoconjugados de fármacos se ha descrito como un factor importante en la eficacia antitumoral (Yang et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 85: 1189, 1988). Así pues, el anticuerpo RS7 presenta varias propiedades importantes para aplicaciones terapéuticas.

[0060] Aunque se prefiere el anticuerpo hRS7, se conocen y/o están disponibles públicamente otros anticuerpos anti-Trop-2 y en realizaciones alternativas pueden utilizarse en los ADCs en cuestión. Si bien se prefieren los anticuerpos humanizados o humanos para reducir la inmunogenicidad, en realizaciones alternativas puede utilizarse un anticuerpo quimérico. Como se expone más adelante, los métodos de humanización de anticuerpos son bien conocidos en la técnica y pueden utilizarse para convertir un anticuerpo murino o quimérico disponible en una forma humanizada.

[0061] Los anticuerpos anti-Trop-2 están disponibles comercialmente en varias fuentes e incluyen LS-C126418, LS-C178765, LS-C126416, LS-C126417 (LifeSpan BioSciences, Inc., Seattle, WA); 10428-MM01, 10428-MM02, 10428-R001, 10428-R030 (Sino Biological Inc., Beijing, China); MR54 (eBioscience, San Diego, CA); sc-376181, sc-376746, Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA); MM0588-49D6, (Novus Biologicals, Littleton, CO); ab79976, y ab89928 (ABCAM®, Cambridge, MA).

[0062] Se han divulgado otros anticuerpos anti-Trop-2 en la literatura de patentes. Por ejemplo, Pub. de EE. UU. N° 2013/0089872 divulga los anticuerpos anti-Trop-2 K5-70 (N° de acceso FERM BP-11251), K5-107 (N° de acceso FERM BP-11252), K5-116-2-1 (N° de acceso FERM BP-11253), T6-16 (N° de acceso FERM BP-11346) y T5-86 (N° de acceso FERM BP-11254), depositados en el Depositario Internacional de Organismos de Patentes, Tsukuba, Japón. La Patente de EE. UU. N° 5.840.854 divulga el anticuerpo monoclonal anti-Trop-2 BR110 (n° ATCC HB11698). La Patente de EE. UU. N° 7.420.040 divulga un anticuerpo anti-Trop-2 producido por la línea celular de hibridoma AR47A6.4.2, depositado en el IDAC (International Depository Authority of Canada, Winnipeg, Canadá) como número de acceso 141205-05. La Patente de EE. UU. N° 7.420.041 divulga un anticuerpo anti-Trop-2 producido por la línea celular de hibridoma AR52A301.5, depositado en el IDAC con el número de acceso 141205-03. La Pub. de EE. UU. N° 2013/0122020 divulgó los anticuerpos anti-Trop-2 3E9, 6G11, 7E6, 15E2, 18B1. Los hibridomas que codifican un anticuerpo representativo se depositaron en la American Type Culture Collection (ATCC), números de acceso. PTA-12871 and PTA-12872. La Patente de EE. UU. N° 8.715.662 divulga anticuerpos anti-Trop-2 producidos por hibridomas depositados en el AID-ICLC (Génova, Italia) con los números de depósito PD 08019, PD 08020 y PD 08021. Publ. de Solicitud de Patente de EE. UU. N° 2012037518 divulga los anticuerpos anti-Trop-2 77220, KM4097 y KM4590. Publ. de Solicitud de La patente n° 8.309.094 (Wyeth) divulga los anticuerpos A1 y A3, identificados por el listado de secuencias. Publicación no patentada Lipinski et al. (1981, Proc Natl. Acad Sci USA, 78:5147-50) reveló los anticuerpos anti-Trop-2 162-25.3 y 162-46.2.

[0063] Existen numerosos anticuerpos anti-Trop-2 conocidos en la técnica y/o disponibles públicamente. Como se discute más adelante, los métodos para preparar anticuerpos contra antígenos conocidos eran rutinarios en la técnica. La secuencia de la proteína Trop-2 humana también era conocida en la técnica (véase, por ejemplo, el número de acceso al GenBank CAA54801.1). También se conocían métodos para producir anticuerpos humanizados, humanos o quiméricos. La persona con conocimientos ordinarios, leyendo la presente divulgación a la luz de los conocimientos generales de la técnica, habría sido capaz de fabricar y utilizar el género de anticuerpos anti-Trop-2 en los ADCs objeto de estudio.

Anticuerpos anti-CD3

[0064] Una variedad de anticuerpos contra CD3 que pueden usarse en la práctica de la invención como se define en las reivindicaciones son conocidos públicamente y/o están disponibles comercialmente, tales como de LSBio (catálogo Nos. LS-B6698, LS-B8669; LS-B8765, LS-C96311, LS-C58677, etc.); ^{ABCAM®} (números de catálogo ab5690, ab16669, ab699, ab828, ab8671, etc.); Santa Cruz Biotechnology (números de catálogo sc-20047, sc-20080, sc-19590, sc-59008, sc-101442, etc.); y muchos otros proveedores.

[0065] La secuencia de aminoácidos de la fracción anti-CD3, utilizada como parte de un complejo DNL™, es como se describe a continuación en SEQ ID N°:96 a SEQ ID N°:101. Sin embargo, la persona con conocimientos ordinarios se dará cuenta de que cualquier anticuerpo anti-CD3 conocido puede utilizarse en la práctica de la invención tal como se define en las reivindicaciones. Preferiblemente, los anticuerpos utilizados son humanizados o humanos.

Complejos de anticuerpos biespecíficos redireccionadores de leucocitos

[0066] Según la invención tal como se define en las reivindicaciones, el anticuerpo biespecífico comprende un anticuerpo anti-CD3 x anti-Trop-2. Como se ha comentado anteriormente, se conocen varios anticuerpos contra CD3 o Trop-2 y puede utilizarse cualquiera de ellos. Sin embargo, tal y como se describe en el presente documento, pueden utilizarse anticuerpos contra otros antígenos leucocitarios distintos de CD3 o contra otros antígenos asociados a enfermedades distintos de Trop-2.

[0067] Los antígenos de células T ejemplares incluyen CD2, CD4, CD5, CD6, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD40L, CD44, CD45, CD69 y CD90. Otros antígenos ejemplares pueden seleccionarse entre CD8, CD16, CD56, CD57, ADAM17 y CD137 para células NK; CD74, cadena alfa HLA-DR, CD14, CD16, CD64 y CD89 para monocitos; y CEACAM6, CEACAM8, CD16b, CD32a, CD89, CD177, CD11a, CD11b y SLC44A2 para neutrófilos. Preferiblemente, el anticuerpo anti-células T se une a CD3, o el anticuerpo anti-NK se une a CD16. Como se comenta más adelante, se conocen muchos ejemplos de antígenos asociados a enfermedades, como los antígenos asociados a tumores (TAA). Un ejemplo de TAA preferido es Trop-2.

[0068] La presente divulgación se refiere a un anticuerpo biespecífico anti-CD3 x anti-CD19. Existen varios anticuerpos biespecíficos anti-CD3 x anti-CD19 conocidos en la técnica y actualmente en desarrollo clínico, como BITE® (Bispecific T-cell Engager) (p. ej., Nagorsen et al., 2009, *Leukemia & Lymphoma* 50:886-91; Amann et al., 2009, *J Immunother* 32:453-64; Baeuerle y Reinhardt, 2009, *Cancer Res* 69:4941-44) y DART™ (véase, por ejemplo, Moore et al., 2011, *Blood* 117:4542-51; Veri et al., 2010, *Arthritis Rheum* 62:1933-43). Blinatumomab es un anticuerpo BITE® que comprende dominios V_H y V_L de fragmentos de anticuerpos anti-CD3 y anti-CD19, conectados con un engarce de 5 aminoácidos y expresados como una única cadena polipeptídica que se anuda a sí misma para formar los sitios de unión al antígeno. Se cree que blinatumomab actúa acercando los antígenos CD3 específicos de células T y CD19 específicos de células B, para iniciar una respuesta citotóxica de células T contra las células B yuxtapuestas, que no requiere especificidad de células T para las células cancerosas (por ejemplo, Portell et al., 2013, *Clin Pharmacol* 5(Suppl 1): 5-11). Debido a su corta vida media, blinatumomab requiere infusión intravenosa continua para ser eficaz, (Portell et al., 2013). Un ensayo de fase II de pacientes con ALL de células B con enfermedad residual mínima persistente o recidivante informó de una tasa de remisión completa de aproximadamente el 80% (Portell et al., 2013).

[0069] Se informó que dosis de blinatumomab tan bajas como 0,005 mg/m²/día eran eficaces para eliminar células cancerosas en pacientes con linfoma no Hodgkin (Bargou et al., 2008, *Science* 321:974-77). Se observaron remisiones parciales y completas a partir de una dosis de 0,015 mg y los seis pacientes tratados con una dosis de 0,06 mg experimentaron una regresión tumoral (Bargou et al., 2008). *In vitro*, blinatumomab indujo la lisis celular del 50% de las células MEC-1 a una concentración de 10 pg/mL (Topp et al., 2012, *Blood* 120:5185-87; Bassan et al., 2012, *Blood* 120:5094-95).

[0070] La porción anti-CD19 de blinatumomab se derivó del hibridoma HD37 (véase, por ejemplo, Patente de EE. UU. N.º 7.575.923), que está a disposición del público (por ejemplo, Santa Cruz Biotechnology Cat. N.º sc-18894). La porción anti-CD3 de blinatumomab se derivó del hibridoma TR66 (Patente de EE. UU. N.º 7.575.923; Trauneker et al., 1991, *EMBO J.* 10:3655-59), también a disposición del público (por ejemplo, Enzo Life Sciences, n.º de catálogo ALX-804-822-C100).

[0071] Existe una variedad de anticuerpos contra CD19 conocidos públicamente y/o disponibles comercialmente, como los de Santa Cruz Biotechnology (números de catálogo sc-390244, sc-373897, sc-18894, sc-18896, etc.); ABCAM® (números de catálogo ab25232, ab134114, ab140981, ab1255, etc.); ABBOTEC™ (números de catálogo 252262, 252248, 250585, 251063, etc.) y muchos otros proveedores.

[0072] En un ejemplo de la presente divulgación, la fracción de anticuerpo anti-CD19 es un anticuerpo A19 humanizado, que comprende las secuencias CDR de cadena ligera CDR1 KASQSVYDYGDSYLN (SEQ ID N.º:90); CDR2 DASNLVS (SEQ ID N.º:91); y CDR3 QQSTEDPWT (SEQ ID N.º:92) y las secuencias CDR de cadena pesada CDR1 SYWMN (SEQ ID N.º:93); CDR2 QIWPQGDGTNYNGKFKG (SEQ ID N.º:94) y CDR3 RETTTVGRIYYAMDY (SEQ ID N.º:95).

[0073] Se conocen otros anticuerpos biespecíficos anti-CD3 x anti-CD19, como DART®, que también incorpora las secuencias Fv anti-CD19 de HD37 y las secuencias Fv anti-CD3 de TR66 (Moore et al., 2011, *Blood* 117:4542-51; Veri et al., 2010, *Arthritis Rheum* 62:1933-43). Moore et al. (2011) informaron de que los anticuerpos biespecíficos DART™ eran más potentes a la hora de inducir la lisis de células B que los anticuerpos biespecíficos de cadena única (BITE®) con secuencias idénticas de región variable anti-CD19 y anti-CD3, con valores de EC₅₀ en el rango de pg/mL (Moore et al., 2011). Se han descrito otros anticuerpos biespecíficos anti-CD3 x anti-CD19 además de DART™ y BITE® (véase, por ejemplo, Wei et al., 2012, *Cell Oncol* 35:423-34; Portner et al., 2012, *Cancer Immunol Immunother* 61:1869-75; Zhou et al., 2012, *Biotechnol Lett.* 34:1183-91). En ciertas realizaciones, puede utilizarse cualquier anticuerpo biespecífico anti-CD3 x anti-CD19 conocido para inducir una respuesta inmunitaria contra las células asociadas a la enfermedad.

[0074] Catumaxomab es un anticuerpo biespecífico anti-CD3 x anti-EpCAM que ha sido aprobado en Europa para el tratamiento de la ascitis maligna asociada al cáncer metastásico (Chames & Baty, 2009, *MAbs* 1:539-47). En un sistema modelo de ratón, el catumaxomab fue capaz de destruir células tumorales en un intervalo de concentración de 10 pM y se informó de que conducía a la erradicación total de los tumores de melanoma (Chames y Baty, 2009). Los ensayos

clínicos en humanos con pacientes de cáncer de ovario con ascitis maligna también mostraron una eficacia estadísticamente significativa (Chames & Baty, 2009). Sin embargo, la alta inmunogenicidad del bsAb híbrido rata/ratón puede limitar la administración i.v. del anticuerpo (Chames & Baty, 2009). El uso de bsAbs antitumorales no se limita a anti-CD3 x anti-CD19, sino que también ha incluido anti-HER2 x anti-CD64 (MDX-210, MDX-H210), anti-EGFR x anti-CD64 (MDX-447), anti-CD30 x anti-CD16 (HRS-3/A9), anti-HER2 x anti-CD3 (Her2Bi), anti-CD20 x anti-CD3 (CD20Bi, Bi20), anti-EpCAM x anti-CD3 (catumaxomab, MT110), anti-HER2 x anti-CD3 (ertumaxomab), y anti-NG2 x anti-CD28 (rM28) (Chames & Baty, 2009).

[0075] La persona con conocimientos ordinarios se dará cuenta de que los anticuerpos biespecíficos redireccionadores de leucocitos no se limitan a constructos anti-CD3 x anti-Trop-2, sino que pueden comprender anticuerpos contra cualquier antígeno conocido asociado a la enfermedad unido a una fracción de anticuerpo anti-CD3. Alternativamente, también pueden utilizarse anticuerpos contra otros antígenos de células T además del CD3, u otros antígenos expresados en células NK, monocitos o neutrófilos. Los antígenos de células T ejemplares incluyen, entre otros, CD2, CD4, CD5, CD6, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD40L, CD44, CD45, CD69 y CD90. Otros antígenos ejemplares pueden seleccionarse entre CD8, CD16, CD56, CD57, ADAM17, KIR y CD137 para células NK; CD74, cadena alfa HLA-DR, CD14, CD16, CD64 y CD89 para monocitos; y CEACAM6, CEACAM8, CD16b, CD32a, CD89, CD177, CD11a, CD11b y SLC44A2 para neutrófilos. Los anticuerpos contra cada uno de los antígenos leucocitarios son conocidos públicamente y/o están disponibles públicamente (véanse, por ejemplo, ^{ABCA}AM® números de catálogo ab131276, ab139266, ab8360, ab51312, ab846, ab133616, ab75877, ab133255, ab109217, ab93278, ab17147, ab115851, ab128955, ab13463, ab85986; Santa Cruz Biotechnology números de catálogo sc-46683, sc-59047; Enzo Life Sciences, Inc. número de catálogo ALX-805-037-C100; Sino Biological Inc. números de catálogo 12211-RP02, 11150-R074; Millipore números de catálogo 04-1102, 04-1102, MAB1406). Estos y muchos otros anticuerpos antileucocitarios estaban a disposición del público y podrían haberse utilizado en los bsAbs redireccionadores de leucocitos en cuestión. Como se expone más adelante, numerosos anticuerpos contra una amplia variedad de antígenos asociados a enfermedades eran conocidos públicamente y/o estaban disponibles comercialmente y podrían haberse utilizado en los anticuerpos biespecíficos redireccionadores de leucocitos en cuestión. Otros bsAbs leucocitarios ejemplares de uso potencial incluyen FBTA05 (anti-CD20 x anti-CD3) y TRBS07 (anti-GD2 x anti-CD3).

Terapia con interferón

[0076] En diversas realizaciones de la invención como se define en las reivindicaciones, los anticuerpos biespecíficos sujetos pueden usarse en combinación con uno o más interferones, tales como interferón- α , interferón- β o interferón- λ , preferentemente interferón- α . Los interferones humanos son bien conocidos en la técnica y las secuencias de aminoácidos de los interferones humanos pueden obtenerse fácilmente de bases de datos públicas (por ejemplo, GenBank Accession Nos. AAA52716.1; AAA52724; AAC41702.1; EAW56871.1; EAW56870.1; EAW56869.1). Los interferones humanos también pueden obtenerse comercialmente de diversos proveedores (por ejemplo, Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA; Genentech, South San Francisco, CA; EMD Millipore, Billerica, MA).

[0077] Se ha informado que el interferón- α (IFN α) tiene actividad antitumoral en modelos animales de cáncer (Ferrantini et al., 1994, J Immunol 153:4604-15) y en pacientes humanos con cáncer (Gutterman et al., 1980, Ann Intern Med 93:399-406). El IFN α puede ejercer diversos efectos antitumorales directos, como la regulación a la baja de los oncogenes, la regulación al alza de los supresores tumorales, la mejora del reconocimiento inmunitario mediante el aumento de la expresión de las proteínas MHC de clase I de la superficie tumoral, la potenciación de la apoptosis y la sensibilización a los agentes quimioterapéuticos (Gutterman et al., 1994, PNAS USA 91:1198-205; Matarrese et al., 2002, Am J Pathol 160:1507-20; Mecchia et al., 2000, Gene Ther 7:167-79; Sabaawy et al., 1999, Int J Oncol 14:1143-51; Takaoka et al., 2003, Nature 424:516-23). En algunos tumores, el IFN α puede tener un efecto antiproliferativo directo y potente a través de la activación de STAT1 (Grimley et al., 1998 Blood 91:3017-27). El interferón- α 2b se ha conjugado con anticuerpos antitumorales, como el anticuerpo hL243 anti-HLA-DR, y agota las células de linfoma y mieloma *in vitro* e *in vivo* (Rossi et al., 2011, Blood 118:1877-84).

[0078] Indirectamente, el IFN α puede inhibir la angiogénesis (Sidky y Borden, 1987, Cancer Res 47:5155-61) y estimular las células inmunitarias del huésped, lo que puede ser vital para la respuesta antitumoral global, pero ha sido muy poco apreciado (Belardelli et al., 1996, Immunol Today 17:369-72). El IFN α ejerce una influencia pleiotrópica sobre las respuestas inmunitarias a través de sus efectos sobre las células mieloides (Raefsky et al., 1985, J Immunol 135:2507-12; Luft et al., 1998, J Immunol 161:1947-53), las células T (Carrero et al., 2006, J Exp Med 203:933-40; Pilling et al., 1999, Eur J Immunol 29:1041-50) y las células B (Le et al., 2001, Immunity 14:461-70). Como importante modulador del sistema inmunitario innato, el IFN α induce la rápida diferenciación y activación de las células dendríticas (Belardelli et al., 2004, Cancer Res 64:6827-30; Paquette et al., 1998, J Leukoc Biol 64:358-67; Santini et al., 2000, J Exp Med 191:1777-88) y aumenta la citotoxicidad, la migración, la producción de citocinas y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) de las células NK (Biron et al., 1999, Ann Rev Immunol 17:189-220; Brunda et al. 1984, Cancer Res 44:597-601).

[0079] Se ha informado que el interferón- β es eficaz para la terapia de una variedad de tumores sólidos. Los pacientes tratados con 6 millones de unidades de IFN- β dos veces por semana durante 36 meses mostraron una disminución de la recurrencia del carcinoma hepatocelular tras la resección completa o ablación del tumor primario en pacientes con cáncer de hígado relacionado con el HCV (Ikeda et al., 2000, Hepatology 32:228-32). La terapia génica con interferón- β indujo la apoptosis de gliomas, melanomas y carcinomas de células renales (Yoshida et al., 2004, Cancer Sci 95:858-65). Se ha

observado que el IFN- β endógeno inhibe el crecimiento tumoral al inhibir la angiogénesis *in vivo* (Jablonska et al., 2010, J Clin Invest. 120:1151-64.)

[0080] Los IFN- λ s, designados como interferones de tipo III, son un grupo de citocinas descritas recientemente que consisten en IFN- λ 1, 2, 3 (también denominadas interleucina-29, 28A y 28B, respectivamente), que están codificadas genéticamente por tres genes diferentes localizados en el cromosoma 19 (Kotenko et al., 2003, Nat Immunol 4:69-77; Sheppard et al., 2003, Nat Immunol 4:63-8). A nivel proteico, IFN- λ 2 y - λ 3 son altamente homólogos, con un 96% de identidad de aminoácidos, mientras que IFN- λ 1 comparte aproximadamente un 81% de homología con IFN- λ 2 y - λ 3 (Sheppard et al., 2003, Nat Immunol 4:63-8). Los IFN- λ activan la transducción de señales a través de la vía JAK/STAT de forma similar a la inducida por el IFN de tipo I, incluyendo la activación de las quinasas JAK1 y TYK2, la fosforilación de las proteínas STAT y la activación del complejo de transcripción del factor génico 3 estimulado por IFN (ISGF3) (Witte et al., 2010, Cytokine Growth Factor Rev 21:237-51; Zhou et al., 2007, J Virol 81:7749-58).

[0081] Una diferencia importante entre los sistemas IFN de tipo III y de tipo I es la distribución de sus respectivos complejos receptores. El IFN- α/β señala a través de dos receptores de interferón de tipo I ampliamente expresados, y la toxicidad sistémica resultante asociada a la administración de IFN- α/β ha limitado su uso como agentes terapéuticos (Pestka et al., 2007, J Biol Chem 282:20047-51). En cambio, los IFN- λ señalan a través de un complejo receptor heterodimérico formado por el receptor único 1 de IFN- λ (IFN- λ R1) y el receptor 2 de IL-10 (IL-10R2). Como se informó anteriormente (Witte et al., 2009, Genes Immun 10:702-14), IFN- λ R1 tiene un patrón de expresión muy restringido con los niveles más altos en células epiteliales, melanocitos y hepatocitos, y el nivel más bajo en células primarias del sistema nervioso central (SNC). Las células del sistema inmunitario de la sangre expresan altos niveles de una variante corta del empalme del receptor de IFN- λ (sIFN- λ R1) que inhibe la acción de IFN- λ . La limitada capacidad de respuesta de las células neuronales y las células inmunitarias implica que la toxicidad grave frecuentemente asociada a la terapia con IFN- α puede estar ausente o reducirse significativamente con los IFN- λ (Witte et al., 2009, Genes Immun 10:702-14; Witte et al., 2010, Cytokine Growth Factor Rev 21:237-51). Una publicación reciente informó de que, si bien el IFN- α y el IFN- λ inducen la expresión de un conjunto común de ISG (genes estimulados por interferón) en los hepatocitos, a diferencia del IFN- α , la administración de IFN- λ no indujo la activación de STAT ni la expresión de ISG en linfocitos o monocitos purificados (Dickensheets et al., 2013, J Leukoc Biol. 93, publicado en línea el 20/12/12). Se sugirió que el IFN- λ podría ser superior al IFN- α para el tratamiento de la infección crónica por el HCV, ya que es menos probable que induzca las leucopenias que suelen asociarse al tratamiento con IFN- α (Dickensheets et al., 2013).

[0082] Los IFN- λ muestran características estructurales similares a las citocinas relacionadas con la IL-10, pero funcionalmente poseen actividad antiviral y antiproliferativa similar a la del IFN de tipo I (Witte et al., 2009, Genes Immun 10:702-14; Ank et al., 2006, J Virol 80:4501-9; Robek et al., 2005, J Virol 79:3851-4). Se ha demostrado que los IFN- λ 1 y - λ 2 reducen la replicación vírica o el efecto citopático de diversos virus, incluidos los virus ADN (virus de la hepatitis B (Robek et al., 2005, J Virol 79:3851-4, Doyle et al., 2006, Hepatology 44:896-906) y virus del herpes simple 2 (Ank et al., 2008, J Immunol 180:2474-85)), virus de ARN ss (+) (EMCV; Sheppard et al., 2003, Nat Immunol 4:63-8) y virus de la hepatitis C (Robek et al., 2005, J Virol 79:3851-4, Doyle et al., 2006, Hepatology 44:896-906; Marcello et al., 2006, Gastroenterol 131:1887-98; Pagliaccetti et al., 2008, J Biol Chem 283:30079-89), virus ARN ss (-) (virus de la estomatitis vesicular; Pagliaccetti et al., 2008, J Biol Chem 283:30079-89) y virus de la gripe A (Jewell et al., 2010, J Virol 84:11515-22) y virus de ARN de doble cadena, como el rotavirus (Pott et al., 2011, PNAS USA 108:7944049). El IFN- λ 3 se ha identificado a partir de estudios genéticos como una citocina clave en la infección por el HCV (Ge et al., 2009, Nature 461:399-401), y también ha mostrado una potente actividad contra el EMCV (Dellgren et al., 2009, Genes Immun 10:125-31). Se informó de que una deficiencia de la producción de IFN- λ inducida por rinovirus estaba altamente correlacionada con la gravedad de la exacerbación del asma inducida por rinovirus (Contoli et al., 2006, Nature Med 12:1023-26) y se ha sugerido la terapia con IFN- λ como un nuevo enfoque para el tratamiento del asma alérgica (Edwards y Johnston, 2011, EMBO Mol Med 3:306-8; Koltsida et al., 2011, EMBO Mol Med 3:348-61).

[0083] La actividad antiproliferativa del IFN- λ s se ha establecido en varias líneas celulares de cáncer humano, incluido el carcinoma neuroendocrino BON1 (Zitzmann et al., 2006, Biochem Biophys Res Commun 344:1334-41), el glioblastoma LN319 (Meager et al., 2005, Cytokine 31:109-18), queratinocitos inmortalizados HaCaT (Maher et al., 2008, Cancer Biol Ther 7:1109-15), melanoma F01 (Gunterberg et al., 2010, Mol Cancer Ther 9:510-20) y carcinoma esofágico TE-11 (Li et al., 2010, Eur J Cancer 46:180-90). En modelos animales, el IFN- λ induce tanto la apoptosis como la destrucción tumoral a través de respuestas inmunitarias innatas y adaptativas, lo que sugiere que la administración local de IFN- λ podría ser una estrategia complementaria útil en el tratamiento de neoplasias malignas humanas (Numasaki et al., 2007, J Immunol 178:5086-98). Se demostró que un interferón- λ ligado a Fab tiene una potente actividad antitumoral y antivírica en células diana (Liu et al., 2013, PLoS One 8:e63940).

[0084] En entornos clínicos, el IFN- λ 1 PEGilado (PEG-IFN- λ 1) se ha utilizado provisionalmente para pacientes con infección crónica por el virus de la hepatitis C. En un estudio de fase Ib (n=56), se observó actividad antiviral en todos los niveles de dosis (0,5-3,0 μ g/kg), y la carga viral se redujo de 2,3 a 4,0 logs cuando se administró PEG-IFN- λ 1 a pacientes con HCV de genotipo 1 que recayeron tras una terapia con IFN- α (Muir et al., 2010, Hepatology 52:822-32). Un estudio de fase IIb (n=526) demostró que los pacientes con genotipos 1 y 4 del HCV presentaban tasas de respuesta significativamente mayores al tratamiento con PEG-IFN- λ 1 en comparación con PEG-IFN- α . Al mismo tiempo, las tasas de acontecimientos adversos comúnmente asociados al tratamiento con interferón de tipo I fueron menores con PEG-IFN- λ 1 que con PEG-IFN- α . La neutropenia y la trombocitopenia se observaron con poca frecuencia y las tasas de

síntomas gripales, anemia y síntomas musculoesqueléticos disminuyeron a aproximadamente 1/3 de las observadas con el tratamiento con PEG-IFN- α . Sin embargo, las tasas de acontecimientos adversos graves, depresión y otros acontecimientos adversos frecuentes ($\geq 10\%$) fueron similares entre PEG-IFN- $\lambda 1$ y PEG-IFN- α . Se observaron mayores tasas de hepatotoxicidad en la dosis más alta de PEG-IFN- $\lambda 1$ en comparación con la de PEG-IFN- α ("Investigational Compound PEG-Interferon Lambda Achieved Higher Response Rates with Lesser Flu-like and Musculoskeletal Symptoms and Cytopenias Than PEG-Interferon Alfa in Phase IIb Study of 526 Treatment-Naive Hepatitis C Patients", 2 de abril de 2011, comunicado de prensa de Bristol-Myers Squibb).

[0085] En diversas realizaciones de la invención como se define en las reivindicaciones, los anticuerpos biespecíficos redireccionadores de leucocitos, ADC y/o mAbs inhibidores de puntos de control sujetos pueden usarse en combinación con uno o más interferones, tales como interferón- α , interferón- β , interferón- $\lambda 1$, interferón- $\lambda 2$ o interferón- $\lambda 3$. Cuando se utiliza con otros agentes, el interferón puede administrarse antes, simultáneamente o después del otro agente. Cuando se administra simultáneamente, el interferón puede estar conjugado con el otro agente o separado de él.

15 **Anticuerpos inhibidores de puntos de control**

[0086] Los estudios con anticuerpos inhibidores de puntos de control para la terapia del cáncer han generado tasas de respuesta sin precedentes en cánceres que anteriormente se consideraban resistentes al tratamiento del cáncer (véase, por ejemplo, Ott & Bhardwaj, 2013, *Frontiers in Immunology* 4:346; Menzies & Long, 2013, *Ther Adv Med Oncol* 5:278-85; Pardoll, 2012, *Nature Reviews Cancer* 12:252-64; Mavilio & Lugli,). La terapia con anticuerpos antagonistas bloqueantes de los puntos de control del sistema inmunitario, como CTLA4, PD1 y PD-L1, es una de las nuevas vías más prometedoras de la inmunoterapia contra el cáncer y otras enfermedades. A diferencia de la mayoría de los agentes anticancerígenos, los inhibidores de los puntos de control no se dirigen directamente a las células tumorales, sino a los receptores linfocitarios o a sus ligandos para potenciar la actividad antitumoral endógena del sistema inmunitario. (Pardoll, 2012, *Nature Reviews Cancer* 12:252-264) Dado que dichos anticuerpos actúan principalmente regulando la respuesta inmunitaria frente a células, tejidos o patógenos enfermos, pueden utilizarse en combinación con otras modalidades terapéuticas, como los anticuerpos biespecíficos redireccionadores de leucocitos, los ADC y/o los interferones para potenciar el efecto antitumoral de dichos agentes.

[0087] Ahora está claro que los tumores pueden escapar a la vigilancia inmunitaria cooptando ciertas vías de puntos de control inmunitarios, en particular en células T que son específicas para antígenos tumorales (Pardoll, 2012, *Nature Reviews Cancer* 12:252-264). Dado que muchos de estos puntos de control inmunitarios se inician mediante interacciones ligando-receptor, pueden bloquearse fácilmente mediante anticuerpos contra los ligandos y/o sus receptores (Pardoll, 2012, *Nature Reviews Cancer* 12:252-264). Aunque los anticuerpos inhibidores de puntos de control contra CTLA4, PD1 y PD-L1 son los más avanzados clínicamente, se conocen otros antígenos potenciales de puntos de control que pueden utilizarse como diana de anticuerpos terapéuticos, como LAG3, B7-H3, B7-H4 y TIM3 (Pardoll, 2012, *Nature Reviews Cancer* 12:252-264).

[0088] La proteína 1 de muerte celular programada (PD1, también conocida como CD279) codifica una proteína de membrana de la superficie celular de la superfamilia de inmunoglobulinas, que se expresa en células B y células NK (Shinohara et al., 1995, *Genomics* 23:704-6; Blank et al., 2007, *Cancer Immunol Immunother* 56:739-45; Finger et al., 1997, *Gene* 197:177-87; Pardoll, 2012, *Nature Reviews Cancer* 12:252-264). La función principal de PD1 es limitar la actividad de las células T en los tejidos periféricos durante la inflamación en respuesta a la infección, así como limitar la autoinmunidad (Pardoll, 2012, *Nature Reviews Cancer* 12:252-264). La expresión de PD1 se induce en las células T activadas y la unión de PD1 a uno de sus ligandos endógenos actúa para inhibir la activación de las células T mediante la inhibición de las quinasas estimuladoras (Pardoll, 2012, *Nature Reviews Cancer* 12:252-264). PD1 también actúa para inhibir la "señal de parada" del TCR (Pardoll, 2012, *Nature Reviews Cancer* 12:252-264). PD1 se expresa en gran medida en las células T_{reg} y puede aumentar su proliferación en presencia del ligando (Pardoll, 2012, *Nature Reviews Cancer* 12:252-264).

[0089] Los anticuerpos anti-PD1 se han utilizado para el tratamiento del melanoma, el cáncer de pulmón no microcítico, el cáncer de vejiga, el cáncer de próstata, el cáncer colorrectal, el cáncer de cabeza y cuello, el cáncer de mama triple negativo, la leucemia, el linfoma y el cáncer de células renales (Topalian et al., 2012, *N Engl J Med* 366:2443-54; Lipson et al., 2013, *Clin Cancer Res* 19:462-8; Berger et al., 2008, *Clin Cancer Res* 14:3044-51; Gildener-Leapman et al., 2013, *Oral Oncol* 49:1089-96; Menzies & Long, 2013, *Ther Adv Med Oncol* 5:278-85). Dado que PD1/PD-L1 y CTLA4 actúan por vías diferentes, es posible que la terapia combinada con anticuerpos inhibidores de puntos de control contra cada uno de ellos pueda proporcionar una respuesta inmunitaria mejorada.

[0090] Los anticuerpos anti-PD1 ejemplares incluyen lambrolizumab (MK-3475, MERCK), nivolumab (BMS-936558, BRISTOL-MYERS SQUIBB), AMP-224 (MERCK) y pidilizumab (CT-011, CURETECH LTD.). Los anticuerpos anti-PD1 están disponibles comercialmente, por ejemplo de ABCAM® (AB137132), BIOLEGEND® (EH12.2H7, RMP1-14) y AFFYMETRIX EBIOSCIENCE (J105, J116, MIH4).

[0091] El ligando 1 de la muerte celular programada (PD-L1, también conocido como CD274 y B7-H1) es un ligando de PD1 que se encuentra en células T activadas, células B, células mieloides y macrófagos. Aunque existen dos ligandos endógenos para PD1 - PD-L1 y PD-L2, las terapias antitumorales se han centrado en los anticuerpos anti-PD-L1. El

complejo de PD1 y PD-L1 inhibe la proliferación de células T CD8+ y reduce la respuesta inmunitaria (Topalian et al., 2012, N Engl J Med 366:2443-54; Brahmer et al., 2012, N Eng J Med 366:2455-65). Los anticuerpos anti-PD-L1 se han utilizado para el tratamiento del cáncer de pulmón no microcítico, el melanoma, el cáncer colorrectal, el cáncer de células renales, el cáncer de páncreas, el cáncer gástrico, el cáncer de ovario, el cáncer de mama y las neoplasias hematológicas (Brahmer et al., N Eng J Med 366:2455-65; Ott et al., 2013, Clin Cancer Res 19:5300-9; Radvanyi et al., 2013, Clin Cancer Res 19:5541; Menzies & Long, 2013, Ther Adv Med Oncol 5:278-85; Berger et al., 2008, Clin Cancer Res 14:13044-51).

[0092] Los anticuerpos anti-PD-L1 ejemplares incluyen MDX-1105 (MEDAREX), MEDI4736 (MEDIMMUNE) MPDL3280A (GENENTECH) y BMS-936559 (BRISTOL-MYERS SQUIBB). Los anticuerpos anti-PD-L1 también están disponibles comercialmente, por ejemplo de AFFYMETRIX EBIOSCIENCE (MIH1).

[0093] El antígeno citotóxico de linfocitos T 4 (CTLA4, también conocido como CD152) es también un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas que se expresa exclusivamente en las células T. CTLA4 actúa inhibiendo la activación de las células T y, según los informes, inhibe la actividad de las células T auxiliares y potencia la actividad inmunosupresora de las células T reguladoras (Pardoll, 2012, Nature Reviews Cancer 12:252-264). Aunque el mecanismo de acción exacto de CTLA-4 sigue siendo objeto de investigación, se ha sugerido que inhibe la activación de las células T superando a CD28 en la unión a CD80 y CD86, así como enviando activamente señales inhibitorias a la célula T (Pardoll, 2012, Nature Reviews Cancer 12:252-264). Los anticuerpos antiCTLA4 se han utilizado en ensayos clínicos para el tratamiento de melanoma, cáncer de próstata, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas (Robert & Ghiringhelli, 2009, Oncologist 14:848-61; Ott et al., 2013, Clin Cancer Res 19:5300; Weber, 2007, Oncologist 12:864-72; Wada et al., 2013, J Transl Med 11:89). Una característica significativa del anti-CTLA4 es la cinética del efecto antitumoral, con un período de retraso de hasta 6 meses después del tratamiento inicial necesario para la respuesta fisiológica (Pardoll, 2012, Nature Reviews Cancer 12:252-264). En algunos casos, los tumores pueden aumentar de tamaño tras el inicio del tratamiento, antes de que se observe una reducción (Pardoll, 2012, Nature Reviews Cancer 12:252-264).

[0094] Los anticuerpos anti-CTLA4 ejemplares incluyen ipilimumab (Bristol-Myers Squibb) y tremelimumab (PFIZER). Los anticuerpos anti-PD1 están disponibles comercialmente, por ejemplo de ABCAM® (AB134090), SINO BIOLOGICAL INC. (11159-H03H, 11159-H08H), y THERMO SCIENTIFIC PIERCE (PA5-29572, PA5-23967, PA5-26465, MA1-12205, MA1-35914). Ipilimumab ha recibido recientemente la aprobación de la FDA para el tratamiento del melanoma metastásico (Wada et al., 2013, J Transl Med 11:89).

[0095] La persona con conocimientos ordinarios se dará cuenta de que los métodos para determinar las dosis óptimas de anticuerpos inhibidores de puntos de control para administrar a un paciente que los necesite, ya sea solos o en combinación con uno o más agentes, pueden determinarse mediante estudios estándar de dosis-respuesta y toxicidad que son bien conocidos en la técnica. En una realización ejemplar, un anticuerpo inhibidor de puntos de control puede administrarse preferiblemente a aproximadamente 0,3-10 mg/kg, o la dosis máxima tolerada, administrada aproximadamente cada tres semanas o aproximadamente cada seis semanas. Alternativamente, el anticuerpo inhibidor de puntos de control puede administrarse mediante un régimen de dosificación escalonada que incluya la administración de una primera dosis de aproximadamente 3 mg/kg, una segunda dosis de aproximadamente 5 mg/kg y una tercera dosis de aproximadamente 9 mg/kg. Alternativamente, el régimen de dosificación escalonada incluye la administración de una primera dosis de anticuerpo inhibidor de puntos de control a aproximadamente 5 mg/kg y una segunda dosis a aproximadamente 9 mg/kg. Otro régimen de dosificación escalonada puede incluir la administración de una primera dosis de anticuerpo inhibidor de puntos de control de aproximadamente 3 mg/kg, una segunda dosis de aproximadamente 3 mg/kg, una tercera dosis de aproximadamente 5 mg/kg, una cuarta dosis de aproximadamente 5 mg/kg y una quinta dosis de aproximadamente 9 mg/kg. En otro aspecto, un régimen de dosificación escalonada puede incluir la administración de una primera dosis de 5 mg/kg, una segunda dosis de 5 mg/kg y una tercera dosis de 9 mg/kg. Entre las dosis ejemplares notificadas de mAbs inhibidores de puntos de control se incluyen 3 mg/kg de ipilimumab administrados cada tres semanas durante cuatro dosis; 10 mg/kg de ipilimumab cada tres semanas durante ocho ciclos; 10 mg/kg cada tres semanas durante cuatro ciclos y luego cada 12 semanas durante un total de tres años; 10 mg/kg de MK-3475 cada dos o tres semanas; 2 mg/kg de MK-3475 cada tres semanas; 15 mg/kg de tremilimumab cada tres meses; 0,1, 0,3, 1, 3 o 10 mg/kg de nivolumab cada dos semanas durante un máximo de 96 semanas; 0,3, 1, 3 o 10 mg/kg de BMS-936559 cada dos semanas durante un máximo de 96 semanas (Kyi & Postow, 23 de octubre de 2013, FEBS Lett [E-pub antes de impresión; Callahan & Wolchok, 2013, J Leukoc Biol 94:41-53).

[0096] Estos y otros agentes conocidos que estimulan la respuesta inmunitaria a tumores y/o patógenos pueden usarse en combinación con anticuerpos bispecíficos redireccionadores de leucocitos solos o en combinación adicional con un interferón, como el interferón- α , y/o un conjugado anticuerpo-fármaco para mejorar la terapia del cáncer. Otros moduladores conocidos de la vía coestimuladora que pueden utilizarse en combinación incluyen, entre otros, agatolimod, belatacept, blinatumomab, ligando CD40, anticuerpo anti-B7-1, anticuerpo anti-B7-2, anticuerpo anti-B7-H4, AG4263, eritoran, anticuerpo anti-OX40, ISF-154 y SGN-70; B7-1, B7-2, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, CD48, LFA-3, ligando CD30, ligando CD40, antígeno termoestable, B7h, ligando OX40, LIGHT, CD70 y CD24.

[0097] En ciertas realizaciones de la invención como se define en las reivindicaciones, los anticuerpos anti-KIR también pueden usarse en combinación con bsAbs redireccionadores de leucocitos, interferones, ADCs y/o anticuerpos inhibidores de puntos de control. Las células NK median en la actividad antitumoral y antiinfecciosa por citotoxicidad espontánea y

por ADCC cuando son activadas por anticuerpos (Kohrt et al., 2013, Blood, [Epub ahead of]). El grado de respuesta citotóxica viene determinado por un equilibrio de señales inhibitorias y activadoras recibidas por las células NK (Kohrt et al., 2013). El receptor similar a la inmunoglobulina de las células asesinas (KIR) media una señal inhibidora que disminuye la respuesta de las células NK. Los anticuerpos anti-KIR, como lirlumab (Innate Pharma) e IPH2101 (Innate Pharma) han demostrado actividad antitumoral en el mieloma múltiple (Benson et al., 2012, Blood 120:4324-33). *In vitro*, los anticuerpos anti-KIR impiden la interacción tolerogénica de las células NK con las células diana y aumentan la respuesta citotóxica de las células NK a las células tumorales (Kohrt et al., 2013). *In vivo*, en combinación con rituximab (anti-CD20), los anticuerpos anti-KIR a una dosis de 0,5 mg/kg indujeron una mayor citotoxicidad mediada por células NK y dependiente de rituximab contra los tumores de linfoma (Kohrt et al., 2013). Los mAbs anti-KIR pueden combinarse con ADCs, bsAbs redireccionadores de leucocitos, interferones y/o anticuerpos inhibidores de puntos de control para potenciar la citotoxicidad frente a células tumorales u organismos patógenos.

Técnicas Generales de Anticuerpos

[0098] Las técnicas para preparar anticuerpos monoclonales contra prácticamente cualquier antígeno diana son bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Kohler y Milstein, Nature 256: 495 (1975), y Coligan et al. (eds.), CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, VOL. 1, páginas 2.5.1-2.6.7 (John Wiley & Sons 1991). Brevemente, los anticuerpos monoclonales pueden obtenerse inyectando a ratones una composición que comprenda un antígeno, extirpando el bazo para obtener linfocitos B, fusionando los linfocitos B con células de mieloma para producir hibridomas, clonando los hibridomas, seleccionando clones positivos que produzcan anticuerpos contra el antígeno, cultivando los clones que produzcan anticuerpos contra el antígeno y aislando los anticuerpos de los cultivos de hibridomas.

[0099] Los MABs pueden aislarse y purificarse a partir de cultivos de hibridoma mediante una variedad de técnicas bien establecidas. Dichas técnicas de aislamiento incluyen la cromatografía de afinidad con Proteína-A Sepharose, la cromatografía de exclusión por tamaño y la cromatografía de intercambio iónico. Véase, por ejemplo, Coligan en las páginas 2.7.1-2.7.12 y 2.9.1-2.9.3. Véase también Baines et al., "Purification of Immunoglobulin G (IgG)", en METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, VOL. 10, páginas 79-104 (The Humana Press, Inc. 1992).

[0100] Tras la obtención inicial de anticuerpos contra el inmunógeno, los anticuerpos pueden secuenciarse y prepararse posteriormente mediante técnicas recombinantes. La humanización y quimerización de anticuerpos murinos y fragmentos de anticuerpos son bien conocidas por los expertos en la materia. El uso de componentes de anticuerpos derivados de anticuerpos humanizados, quiméricos o humanos obvia los problemas potenciales asociados a la inmunogenicidad de las regiones constantes murinas.

Anticuerpos quiméricos

[0101] Un anticuerpo quimérico es una proteína recombinante en la que las regiones variables de un anticuerpo humano han sido sustituidas por las regiones variables de, por ejemplo, un anticuerpo de ratón, incluidas las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) del anticuerpo de ratón. Los anticuerpos quiméricos presentan menor inmunogenicidad y mayor estabilidad cuando se administran a un sujeto. Las técnicas generales para clonar dominios variables de inmunoglobulina murina se describen, por ejemplo, en Orlandi et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86: 3833 (1989). Las técnicas para construir anticuerpos quiméricos son bien conocidas por los expertos en la materia. Como ejemplo, Leung et al., Hybridoma 13:469 (1994), produjeron una quimera LL2 combinando secuencias de ADN que codifican los dominios V_k y V_H del LL2 murino, un anticuerpo monoclonal anti-CD22, con los dominios de región constante κ e IgG_1 humanos respectivos.

Anticuerpos humanizados

[0102] Las técnicas para producir MABs humanizados son bien conocidas en la técnica (véase, p. ej., Jones et al., Nature 321: 522 (1986), Riechmann et al., Nature 332: 323 (1988), Verhoeven et al., Science 239: 1534 (1988), Carter et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 89: 4285 (1992), Sandhu, Crit. Rev. Biotech. 12: 437 (1992), and Singer et al., J. Immun. 150: 2844 (1993)). Un anticuerpo monoclonal quimérico o murino puede humanizarse transfiriendo las CDR de ratón de las cadenas variables pesada y ligera de la inmunoglobulina de ratón a los dominios variables correspondientes de un anticuerpo humano. Las regiones variables (FR) de ratón en el anticuerpo monoclonal quimérico también se sustituyen por secuencias FR humanas. Dado que la simple transferencia de CDR de ratón a FR humanos suele provocar una reducción o incluso una pérdida de la afinidad del anticuerpo, podría ser necesaria una modificación adicional para restaurar la afinidad original del anticuerpo murino. Esto puede lograrse mediante la sustitución de uno o más residuos humanos en las regiones FR por sus homólogos murinos para obtener un anticuerpo que posea una buena afinidad de unión a su epítipo. Véase, por ejemplo, Tempest et al., Biotechnology 9:266 (1991) and Verhoeven et al., Science 239: 1534 (1988). Por lo general, los residuos de aminoácidos de FR humanos que difieren de sus homólogos murinos y están situados cerca o en contacto con uno o más residuos de aminoácidos de CDR serían candidatos a la sustitución.

Anticuerpos Humanos

[0103] Los métodos para producir anticuerpos totalmente humanos utilizando enfoques combinatorios o animales transgénicos transformados con loci de inmunoglobulina humana son conocidos en la técnica (p. ej., Mancini et al., 2004,

New Microbiol. 27:315-28; Conrad and Scheller, 2005, Comb. Chem. High Throughput Screen. 8:117-26; Brekke y Loset, 2003, Curr. Opin. Pharmacol. 3:544-50). Un anticuerpo totalmente humano también puede construirse por métodos de transfección genética o cromosómica, así como por tecnología de expresión en fago, todos ellos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, McCafferty et al., Nature 348:552-553 (1990). Se espera que estos anticuerpos totalmente humanos presenten incluso menos efectos secundarios que los anticuerpos quiméricos o humanizados y que funcionen *in vivo* como anticuerpos humanos esencialmente endógenos. En ciertas realizaciones, los métodos y procedimientos reivindicados pueden utilizar anticuerpos humanos producidos mediante dichas técnicas.

[0104] En una alternativa, la técnica de expresión en fago puede utilizarse para generar anticuerpos humanos (*por ejemplo*, Dantas-Barbosa et al., 2005, Genet. Mol. Res. 4:126-40). Los anticuerpos humanos pueden generarse a partir de seres humanos normales o de seres humanos que presenten un determinado estado de enfermedad, como el cáncer (Dantas-Barbosa et al., 2005). La ventaja de construir anticuerpos humanos a partir de un individuo enfermo es que el repertorio de anticuerpos circulantes puede estar sesgado hacia anticuerpos contra antígenos asociados a la enfermedad.

[0105] En un ejemplo no limitativo de esta metodología, Dantas-Barbosa et al. (2005) construyeron una biblioteca de expresión en fago de fragmentos de anticuerpos Fab humanos procedentes de pacientes con osteosarcoma. Generalmente, el ARN total se obtenía de linfocitos sanguíneos circulantes (*Id.*). Los Fab recombinantes se clonaron a partir de los repertorios de anticuerpos de cadena μ , γ y κ y se insertaron en una biblioteca de visualización de fagos (*Id.*). Los ARN se convirtieron en ADNc y se utilizaron para hacer bibliotecas de ADNc Fab utilizando cebadores específicos contra las secuencias de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera (Marks et al., 1991, J. Mol. Biol. 222:581-97). La construcción de bibliotecas se realizó según Andris-Widhopf et al. (2000, In: PHAGE DISPLAY LABORATORY MANUAL, Barbas et al. (eds), 1ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY pp. 9.1 a 9.22). Los fragmentos Fab finales se digirieron con endonucleasas de restricción y se insertaron en el genoma del bacteriófago para formar la biblioteca de expresión en fago. Dichas bibliotecas pueden seleccionarse mediante métodos estándar de visualización de fagos, como se conoce en la técnica (véase, por ejemplo, Pasqualini y Ruoslahti, 1996, Nature 380:364-366; Pasqualini, 1999, The Quart. J. Nucl. Med. 43:159-162).

[0106] La expresión en fago puede realizarse en una gran variedad de formatos; para su revisión, véase, por ejemplo, Johnson and Chiswell, Current Opinion in Structural Biology 3:5564-571 (1993). Los anticuerpos humanos también pueden ser generados por células B activadas *in vitro*. Véase Patente de EEUU. Nº. 5,567,610 y 5,229,275. El experto se dará cuenta de que estas técnicas son ejemplares y que puede utilizarse cualquier método conocido para fabricar y cribar anticuerpos humanos o fragmentos de anticuerpos.

[0107] En otra alternativa, los animales transgénicos que han sido modificados genéticamente para producir anticuerpos humanos pueden utilizarse para generar anticuerpos contra esencialmente cualquier diana inmunogénica, utilizando protocolos de inmunización estándar. Los métodos para obtener anticuerpos humanos a partir de ratones transgénicos se describen en Green et al., Nature Genet. 7:13 (1994), Lonberg et al., Nature 368:856 (1994), y Taylor et al., Int. Immun. 6:579 (1994). Un ejemplo no limitativo de dicho sistema es el XENOMOUSE® (*p. ej.*, Green et al., 1999, J. Immunol. Methods 231:11-23) de Abgenix (Fremont, CA). En el XENOMOUSE® y animales similares, los genes de anticuerpos de ratón han sido inactivados y sustituidos por genes de anticuerpos humanos funcionales, mientras que el resto del sistema inmunitario del ratón permanece intacto.

[0108] El XENOMOUSE® se transformó con YAC (cromosomas artificiales de levadura) configurados a partir de la línea germinal que contenían porciones de los loci IgH e Ig kappa humanos, incluida la mayoría de las secuencias de la región variable, junto con genes accesorios y secuencias reguladoras. El repertorio de regiones variables humanas puede utilizarse para generar células B productoras de anticuerpos, que pueden procesarse en hibridomas mediante técnicas conocidas. Un XENOMOUSE® inmunizado con un antígeno diana producirá anticuerpos humanos por la respuesta inmunitaria normal, que pueden cosecharse y/o producirse mediante las técnicas estándar comentadas anteriormente. Se dispone de diversas cepas de XENOMOUSE®, cada una de las cuales es capaz de producir una clase diferente de anticuerpos. Se ha demostrado que los anticuerpos humanos producidos transgénicamente tienen potencial terapéutico, al tiempo que conservan las propiedades farmacocinéticas de los anticuerpos humanos normales (Green et al., 1999). El experto se dará cuenta de que las composiciones y métodos reivindicados no se limitan al uso del sistema XENOMOUSE®, sino que pueden utilizar cualquier animal transgénico que haya sido modificado genéticamente para producir anticuerpos humanos.

Clonación y producción de anticuerpos

[0109] Varias técnicas, como la producción de anticuerpos quiméricos o humanizados, pueden implicar procedimientos de clonación y construcción de anticuerpos. Las secuencias V_K (cadena ligera variable) y V_H (cadena pesada variable) de unión al antígeno de un anticuerpo de interés pueden obtenerse mediante diversos procedimientos de clonación molecular, como RT-PCR, 5'-RACE y cribado de bibliotecas de ADNc. Los genes V de un anticuerpo de una célula que expresa un anticuerpo murino pueden clonarse mediante amplificación PCR y secuenciarse. Para confirmar su autenticidad, los genes V_L y V_H clonados pueden expresarse en cultivo celular como un Ab quimérico tal y como describen Orlandi et al., (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 3833 (1989)). A partir de las secuencias del gen V, se puede diseñar y construir un anticuerpo humanizado, tal y como describen Leung et al. (Mol. Immunol., 32: 1413 (1995)).

[0110] El ADNc puede prepararse a partir de cualquier línea de hibridoma conocida o línea celular transfectada que produzca un anticuerpo murino mediante técnicas generales de clonación molecular (Sambrook et al., *Molecular Cloning, A laboratory manual*, 2nd Ed (1989)). La secuencia V_k del anticuerpo puede amplificarse utilizando los cebadores VK1BACK y VK1FOR (Orlandi et al., 1989) o el conjunto de cebadores ampliado descrito por Leung et al. (*BioTechniques*, 15: 286 (1993)). Las secuencias V_H pueden amplificarse utilizando el par de cebadores VH1BACK/VH1FOR (Orlandi et al., 1989) o los cebadores que se acoplan a la región constante de la IgG murina descritos por Leung et al. (*Hybridoma*, 13:469 (1994)). Los genes V humanizados pueden construirse mediante una combinación de síntesis de plantillas de oligonucleótidos largos y amplificación por PCR, tal y como describen Leung et al. (*Mol. Immunol.*, 32: 1413 (1995)).

[0111] Los productos de PCR para V_k pueden subclonarse en un vector de estadificación, como un vector de estadificación basado en pBR327, VKpBR, que contiene un promotor Ig, una secuencia de péptido señal y sitios de restricción convenientes. Los productos de PCR para V_H pueden subclonarse en un vector de estadificación similar, como el VHpBS basado en pBluescript. Los casetes de expresión que contienen las secuencias V_k y V_H junto con las secuencias promotoras y del péptido señal pueden extraerse de VKpBR y VHpBS y ligarse a vectores de expresión apropiados, como pKh y pG1g, respectivamente (Leung et al., *Hybridoma*, 13:469 (1994)). Los vectores de expresión pueden ser co-transfectados en una célula apropiada y los fluidos sobrenadantes monitorizados para la producción de un anticuerpo quimérico, humanizado o humano. Alternativamente, los casetes de expresión V_k y V_H pueden ser extirpados y subclonados en un único vector de expresión, como pdHL2, tal y como describen Gillies et al. (*J. Immunol. Methods* 125:191 (1989) y también se muestra en Losman et al., *Cancer*, 80:2660 (1997)).

[0112] Alternativamente, los vectores de expresión pueden transfectarse en células huésped que han sido preadaptadas para la transfección, crecimiento y expresión en medio libre de suero. Entre las líneas celulares ejemplares que pueden utilizarse se incluyen las líneas celulares Sp/EEE, Sp/ESF y Sp/ESF-X (véase, por ejemplo,

[0113] Patentes de EE.UU. N.º 7,531,327; 7,537,930; y 7,608,425. Estas líneas celulares ejemplares se basan en la línea celular de mieloma Sp2/0, transfectada con un gen mutante Bcl-EEE, expuesta a metotrexato para amplificar las secuencias génicas transfectadas y preadaptada a línea celular sin suero para la expresión de proteínas.

Fragmentos de Anticuerpos

[0114] Los fragmentos de anticuerpos que reconocen epítomos específicos pueden generarse mediante técnicas conocidas. Los fragmentos de anticuerpo son porciones de unión a antígeno de un anticuerpo, como F(ab')₂, Fab', F(ab)₂, Fab, Fv, scFv y similares. Los fragmentos F(ab')₂ pueden producirse por digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo y los fragmentos Fab' pueden generarse reduciendo los puentes disulfuro de los fragmentos F(ab')₂. Alternativamente, se pueden construir bibliotecas de expresión Fab' (Huse et al., 1989, *Science*, 246:1274-1281) para permitir la identificación rápida y fácil de fragmentos Fab' monoclonales con la especificidad deseada. Los fragmentos F(ab)₂ pueden generarse por digestión con papaína de un anticuerpo.

[0115] Una molécula Fv de cadena simple (scFv) comprende un dominio VL y un dominio VH. Los dominios VL y VH se asocian para formar un sitio de unión a la diana. Estos dos dominios están además unidos covalentemente por un engarce peptídico (L). Los métodos para fabricar moléculas de scFv y diseñar engarces peptídicos adecuados se describen en la patente estadounidense nº 4.704.692; la patente estadounidense nº 4.946.778; Raag y Whitlow, *FASEB* 9:73-80 (1995) y Bird y Walker, *TIBTECH*, 9: 132-137 (1991).

[0116] Las técnicas para producir anticuerpos de dominio único (DAB o VHH) también son conocidas en la técnica, como se describe, por ejemplo, en Cossins et al. (2006, *Prot Express Purif* 51:253-259). Los anticuerpos de dominio único pueden obtenerse, por ejemplo, de camellos, alpacas o llamas mediante técnicas de inmunización estándar. (Véase, por ejemplo, Muyldermans et al., *TIBS* 26:230-235, 2001; Yau et al., *J Immunol Methods* 281:161-75, 2003; Maass et al., *J Immunol Methods* 324:13-25, 2007). El VHH puede tener una potente capacidad de unión a antígenos y puede interactuar con nuevos epítomos que son inaccesibles a los pares VH-VL convencionales. (Muyldermans et al., 2001). Las IgG del suero de alpaca contienen aproximadamente un 50% de anticuerpos IgG de cadena pesada exclusiva de camélidos (HCAbs) (Maass et al., 2007). Las alpacas pueden inmunizarse con antígenos conocidos, como el TNF-α, y pueden aislarse VHH que se unen al antígeno diana y lo neutralizan (Maass et al., 2007). Se han identificado cebadores de PCR que amplifican prácticamente todas las secuencias codificantes de VHH de alpaca y se pueden utilizar para construir bibliotecas de VHH de alpaca, que se pueden utilizar para el aislamiento de fragmentos de anticuerpos mediante técnicas estándar de biopanning bien conocidas en el arte (Maass et al., 2007). En ciertas realizaciones, pueden utilizarse fragmentos de anticuerpos VHH contra el cáncer de páncreas en las composiciones y métodos reivindicados.

[0117] Un fragmento de anticuerpo puede prepararse por hidrólisis proteolítica del anticuerpo de longitud completa o por expresión en *E. coli* u otro huésped del ADN que codifica el fragmento. Un fragmento de anticuerpo puede obtenerse por digestión con pepsina o papaína de anticuerpos de longitud completa por métodos convencionales. Estos métodos se describen, por ejemplo, en Goldenberg, Patentes de EE.UU. N.º 4.036.945 y 4.331.647 y sus referencias. Véase también Nisonoff et al., *Arch Biochem. Biophys.* 89: 230 (1960); Porter, *Biochem. J.* 73: 119 (1959), Edelman et al., en *METHODS IN ENZYMOLOGY* VOL. 1, página 422 (Academic Press 1967), y Coligan en las páginas 2.8.1-2.8.10 y 2.10.-2.10.4.

Alotipos de anticuerpos

[0118] La inmunogenicidad de los anticuerpos terapéuticos se asocia con un mayor riesgo de reacciones a la infusión y una menor duración de la respuesta terapéutica (Baert et al., 2003, N Engl J Med 348:602-08). El grado en que los anticuerpos terapéuticos inducen una respuesta inmunitaria en el huésped puede estar determinado en parte por el alotipo del anticuerpo (Stickler et al., 2011, Genes and Immunity 12:213-21). El alotipo del anticuerpo está relacionado con variaciones en la secuencia de aminoácidos en lugares específicos de las secuencias de la región constante del anticuerpo. Los alotipos de anticuerpos IgG que contienen una región constante de tipo γ de cadena pesada se designan como alotipos Gm (1976, J Immunol 117:1056-59).

[0119] Para los anticuerpos humanos IgG1 comunes, el alotipo más prevalente es G1m1 (Stickler et al., 2011, Genes and Immunity 12:213-21). Sin embargo, el alotipo G1m3 también se da con frecuencia en caucásicos (Stickler et al., 2011). Se ha informado de que los anticuerpos G1m1 contienen secuencias alotípicas que tienden a inducir una respuesta inmunitaria cuando se administran a receptores no G1m1 (nG1m1), como los pacientes G1m3 (Stickler et al., 2011). Los anticuerpos de alotipo no G1m1 no son tan inmunogénicos cuando se administran a pacientes G1m1 (Stickler et al., 2011).

[0120] El alotipo humano G 1m 1 comprende los aminoácidos ácido aspártico en la posición Kabat 356 y leucina en la posición Kabat 358 en la secuencia CH3 de la cadena pesada IgG1. El alotipo nG1m1 comprende los aminoácidos ácido glutámico en la posición Kabat 356 y metionina en la posición Kabat 358. Tanto el alotipo G1m1 como el nG1m1 contienen un residuo de ácido glutámico en la posición 357 de Kabat, por lo que a veces se denominan alotipos DEL y EEM. Un ejemplo no limitante de las secuencias de la región constante de la cadena pesada para los anticuerpos de alotipo G 1m 1 y nG 1m 1 se muestra para los anticuerpos ejemplares rituximab (SEQ ID N.º:85) y veltuzumab (SEQ ID N.º:86).

Secuencia de la región variable de la cadena pesada de rituximab (SEQ ID N.º:85)

[0121]

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKAEPKSCDKTHTCPPC
PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
K

Región variable de la cadena pesada de veltuzumab (SEQ ID N.º:86)

[0122]

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP
APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPSRDEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
K

[0123] Jefferis y Lefranc (2009, mAbs 1:1-7) revisaron las variaciones de secuencia características de los alotipos de IgG y su efecto sobre la inmunogenicidad. Informaron de que el alotipo G1m3 se caracteriza por un residuo de arginina en la posición 214 de Kabat, en comparación con un residuo de lisina en Kabat 214 en el alotipo G1m17. El alotipo nG1m1,2

se caracterizó por la presencia de ácido glutámico en la posición Kabat 356, metionina en la posición Kabat 358 y alanina en la posición Kabat 431. El alotipo G1m1,2 se caracterizó por la presencia de ácido aspártico en la posición Kabat 356, leucina en la posición Kabat 358 y glicina en la posición Kabat 431. Además de las variantes de secuencia de la región constante de la cadena pesada, Jefferis y Lefranc (2009) informaron de variantes alotípicas en la región constante de la cadena ligera kappa, con el alotipo Km1 caracterizado por valina en la posición 153 de Kabat y leucina en la posición 191 de Kabat, el alotipo Km1,2 por alanina en la posición 153 de Kabat y leucina en la posición 191 de Kabat, y el alotipo Km3 caracterizado por alanina en la posición 153 de Kabat y valina en la posición 191 de Kabat.

[0124] Con respecto a los anticuerpos terapéuticos, veltuzumab y rituximab son, respectivamente, anticuerpos IgG1 humanizados y quiméricos contra CD20, de uso para la terapia de una amplia variedad de neoplasias hematológicas y/o enfermedades autoinmunes. En la **Tabla 1** se comparan las secuencias alotípicas de rituximab frente a veltuzumab. Como se muestra en la **Tabla 1**, rituximab (G1m17,1) es un alotipo DEL IgG1, con una variación de secuencia adicional en la posición 214 de Kabat (cadena pesada CH1) de lisina en rituximab frente a arginina en veltuzumab. Se ha informado de que veltuzumab es menos inmunogénico en sujetos que rituximab (véase, por ejemplo, Morchhauser et al., 2009, J Clin Oncol 27:3346-53; Goldenberg et al., 2009, Blood 113:1062-70; Robak & Robak, 2011, BioDrugs 25:13-25), un efecto que se ha atribuido a la diferencia entre anticuerpos humanizados y quiméricos. Sin embargo, es probable que la diferencia de alotipos entre los alotipos EEM y DEL también explique la menor inmunogenicidad del veltuzumab.

Tabla 1. Alotipos de Rituximab vs. Veltuzumab

	Alotipo completo	Posición de la cadena pesada y alotipos asociados					
		214 (alotipo)	356/358 (alotipo)	431 (alotipo)			
Rituximab	G1m17,1	K	17	D/L	1	A	-
Veltuzumab	G1m3	R	3	E/M	-	A	-

[0125] Con el fin de reducir la inmunogenicidad de los anticuerpos terapéuticos en individuos de genotipo nG1m1, es deseable seleccionar el alotipo del anticuerpo para que corresponda al alotipo G1m3, caracterizado por arginina en Kabat 214, y al alotipo nulo nG1m1,2, caracterizado por ácido glutámico en la posición 356 de Kabat, metionina en la posición 358 de Kabat y alanina en la posición 431 de Kabat. Sorprendentemente, se descubrió que la administración subcutánea repetida de anticuerpos G1m3 durante un largo periodo de tiempo no provocaba una respuesta inmunitaria significativa. En realizaciones alternativas, la cadena pesada IgG4 humana en común con el alotipo G1m3 tiene arginina en Kabat 214, ácido glutámico en Kabat 356, metionina en Kabat 359 y alanina en Kabat 431. Dado que la inmunogenicidad parece estar relacionada, al menos en parte, con los residuos en esas localizaciones, el uso de la secuencia de la región constante de la cadena pesada IgG4 humana para anticuerpos terapéuticos es también una realización preferida. Las combinaciones de anticuerpos IgG1 G1m3 con anticuerpos IgG4 también pueden ser útiles para la administración terapéutica.

Anticuerpos conocidos

Antígenos Diana y Anticuerpos Ejemplares

[0126] De acuerdo con la presente divulgación, se pueden utilizar anticuerpos que reconozcan y/o se unan a antígenos que se expresan a altos niveles en las células diana y que se expresan predominante o exclusivamente en células enfermas frente a tejidos normales. Anticuerpos ejemplares de uso para terapia de, por ejemplo, cáncer incluyen pero no se limitan a LL1 (anti-CD74), LL2 o RFB4 (anti-CD22), veltuzumab (hA20, anti-CD20), rituximab (anti-CD20), obinutuzumab (GA101, anti-CD20), lambrolizumab (anti-PD1), nivolumab (anti-PD1), MK-3475 (anti-PD1), AMP-224 (anti-PD1), pidilizumab (anti-PD1), MDX-1105 (anti-PD-L1), MEDI4736 (anti-PD-L1), MPDL3280A (anti-PD-L1), BMS-936559 (anti-PD-L1), ipilimumab (anti-CTLA4), trevilizumab (anti-CTLA4), RS7 (anti-glucoproteína epitelial-1 (EGP-1, también conocida como TROP-2)), PAM4 o KC4 (ambos anti-mucina), MN-14 (anti-antígeno carcinoembrionario (CEA, también conocido como CD66e o CEACAM5), MN-15 o MN-3 (anti-CEACAM6), Mu-9 (anti-antígeno específico del colon-p), Immu 31 (un anti-alfa-fetoproteína), R1 (anti-IGF-1R), A19 (anti-CD19), TAG-72 (e.g., CC49), Tn, J591 o HuJ591 (anti-PSMA (antígeno de membrana específico de la próstata)), AB-PG1-XG1-026 (dímero anti-PSMA), D2/B (anti-PSMA), G250 (Mab anti-anhidrasa carbónica IX), L243 (anti-HLA-DR) alemtuzumab (anti-CD52), bevacizumab (anti-VEGF), cetuximab (anti-EGFR), gemtuzumab (anti-CD33), ibritumomab tiuxetan (anti-CD20), panitumumab (anti-EGFR); tositumomab (anti-CD20); PAM4 (también conocido como clivatuzumab, antimucina), BWA-3 (antihistona H2A/H4), LG2-1 (antihistona H3), MRA12 (antihistona H1), PR1-1 (antihistona H2B), LG11-2 (antihistona H2B), LG2-2 (antihistona H2B), y trastuzumab (anti-ErbB2). Tales anticuerpos son conocidos en la técnica (por ejemplo, Patentes de EE.UU. N.º 5,686,072; 5,874,540; 6,107,090; 6,183,744; 6,306,393; 6,653,104; 6,730,300; 6,899,864; 6,926,893; 6,962,702; 7,074,403; 7,230,084; 7,238,785; 7,238,786; 7,256,004; 7,282,567; 7,300,655; 7,312,318; 7,585,491; 7,612,180; 7,642,239; y Patente de EE. UU. N.º 20050271671; 20060193865; 20060210475; 20070087001.) Entre los anticuerpos específicos conocidos se incluyen hPAM4 (Patente de EEUU. N.º 7.282.567), hA20 (Patente de EEUU. N.º 7.251.164), hA19 (Patente de EEUU. N.º 7.109.304), hIMMU-31 (Patente de EEUU. N.º 7.300.655), hLL1 (Patente de EEUU. N.º 7.312.318), hLL2 (Patente de EEUU. N.º 7.074.403), hMu-9 (Patente de EEUU. N.º 7.387.773), hL243 (Patente de

EEUU. N.º 7.612.180), hMN-14 (Patente de EEUU. N.º 6.676.924), hMN-15 (Patente de EEUU. N.º 7.541.440), hR1 (Solicitud de Patente de EEUU. N.º 12/772.645), hRS7 (Patente de EEUU. N.º 7.238.785), hMN-3 (Patente de EEUU. N.º 7.541.440), AB-PG1-XG1-026 (Solicitud de Patente de EEUU. N.º 11/983.372, depositada como ATCC PTA-4405 y PTA-4406) y D2/B (WO 2009/130575).

[0127] Otros antígenos útiles a los que pueden dirigirse los conjugados descritos incluyen la anhidrasa carbónica IX, B7, CCCL19, CCCL21, CSAp, HER-2/new, BrE3, CD1, CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD11A, CD14, CD15, CD16, CD18, CD19, CD20 (p. ej., C2B8, hA20, 1F5 MAbs), CD21, CD22, CD23, CD25, CD29, CD30, CD32b, CD33, CD37, CD38, CD40, CD40L, CD44, CD45, CD46, CD52, CD54, CD55, CD59, CD64, CD67, CD70, CD74, CD79a, CD80, CD83, CD95, CD126, CD133, CD138, CD147, CD154, CEACAM5, CEACAM6, CTLA4, alfa-fetoproteína (AFP), VEGF (e.p. ej. AVASTIN®, variante de empalme de fibronectina), fibronectina ED-B (p. ej., L19), EGP-1 (TROP-2), EGP-2 (p. ej., 17-CTLA4), receptor del EGF (L19) (p. ej., ERBITUX®), 1A, ErbB1, Factor H, FHL-1, Flt-3, receptor de folato, Ga 733, GROB, HMGB-1, factor inducible por hipoxia (HIF), ErbB2.24, HER-2, factor de crecimiento similar a la insulina (ILGF), IFN-γ, IFN-α, IFN-β, IL-ErbB3, IL-HM1, IL-2R, IL-4R, IL-6R, IL-13R, IL-15R, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-25, IP-10, IGF-17R, Ia, 18R.24, gangliosidos, HCG, el antígeno HLA-DR al que se une 1R, antígenos HM1, es decir, L243-d o una combinación de los mismos, MAGE, mCRP, MCP-1, MIP-CD66, MIP-CD66a, factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF), MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5ac, factor de crecimiento placentario (PIGF), PSA (antígeno prostático específico), PSMA, antígeno PAM4, receptor PD1, NCA-95, NCA-90, A3, A33, Ep-CAM, KS-1, Le(y), mesotelina, PD1, tenascina, TAC, antígeno Tn, antígenos Thomas-Friedenreich, antígenos de necrosis tumoral, antígenos de angiogénesis tumoral, TNF-α, receptor TRAIL (A3 y A33), VEGFR, RANTES, S100, así como antígenos de células madre cancerosas, factores del complemento C3, C3a, C3b, C5a, C5 y un producto oncogénico.

[0128] Craig y Foon, Blood prepublished online January 15, 2008; DOL 10.1182/blood-2007-11-120535, ofrecen un análisis exhaustivo de las dianas antigénicas adecuadas (**Cluster Designation**, o CD) en las células hematopoyéticas malignas, tal y como muestra la citometría de flujo y que puede servir de guía para seleccionar los anticuerpos adecuados para la inmunoterapia.

[0129] Los antígenos CD66 consisten en cinco glicoproteínas diferentes con estructuras similares, CD66a-e, codificadas por los miembros de la familia del antígeno carcinoembrionario (CEA), BCG, CGM6, NCA, CGM1 y CEA, respectivamente. Estos antígenos CD66 (por ejemplo, CEACAM6) se expresan principalmente en granulocitos, células epiteliales normales del tubo digestivo y células tumorales de diversos tejidos. También se incluyen como dianas adecuadas para los cánceres los antígenos testiculares del cáncer, como NY-ESO-1 (Theurillat et al., Int. J. Cancer 2007; 120(11):2411-7), así como CD79a en la leucemia mieloide (Kozlov et al., Cancer Genet. Cytogenet. 2005; 163(1):62-7) y también enfermedades de células B, y CD79b para el linfoma no Hodgkin (Poison et al., Blood 110(2):616-623). Varios de los antígenos antes mencionados se divulgan en Solicitud provisional N.º de Serie 60/426.379, titulada "Use of Multi-specific, Non-covalent Complexes for Targeted Delivery of Therapeutics", depositada el 15 de noviembre de 2002. Las células madre cancerosas, a las que se atribuye ser poblaciones de células malignas precursoras más resistentes a las terapias (Hill y Perris, J. Natl. Cancer Inst. 2007; 99:1435-40), tienen antígenos que pueden ser diana en determinados tipos de cáncer, como el CD 133 en el cáncer de próstata (Maitland et al., Ernst Schering Found. Sympos. Proc. 2006; 5:155-79), cáncer de pulmón no microcítico (Donnenberg et al., J. Control Release 2007; 122(3):385-91) y glioblastoma (Beier et al., Cancer Res. 2007; 67(9):4010-5), y CD44 en el cáncer colorrectal (Dalerba et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2007; 104(24):10158-63), cáncer de páncreas (Li et al., Cancer Res. 2007; 67(3):1030-7), y en el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (Prince et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2007; 104(3):973-8).

[0130] Se ha demostrado que los anticuerpos contra el cáncer se unen a las histonas en algunos casos. Kato et al. (1991, Hum Antibodies Hybridomas 2:94-101) informaron de que el anticuerpo monoclonal humano específico del cáncer de pulmón HB4C5 se une a la histona H2B. Garzelli et al. (1994, Immunol Lett 39:277-82) observaron que los linfocitos B humanos transformados por el virus de Epstein-Barr producen anticuerpos naturales contra las histonas. En ciertas realizaciones, los anticuerpos contra histonas pueden ser de utilidad en las combinaciones del sujeto. Los anticuerpos antihistona conocidos incluyen, entre otros, BWA-3 (antihistona H2A/H4), LG2-1 (antihistona H3), MRA12 (antihistona H1), PR1-1 (antihistona H2B), LG11-2 (antihistona H2B) y LG2-2 (antihistona H2B) (véanse, por ejemplo, Monestier et al., 1991, Eur J Immunol 21:1725-31; Monestier et al., 1993, Molec Immunol 30:1069-75).

[0131] Para la terapia del mieloma múltiple, se han descrito anticuerpos diana adecuados contra, por ejemplo, CD38 y CD138 (Stevenson, Mol Med 2006; 12(11-12):345-346; Tassone et al.), CD74 (Stein et al., *ibid.*), CS1 (Tai et al., Blood 2008; 112(4):1329-37, y CD40 (Tai et al., 2005; Cancer Res. 65(13):5898-5906).

[0132] El factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) es un importante regulador de la inmunidad innata y adaptativa y de la apoptosis. Se ha informado de que CD74 es el receptor endógeno de MIF (Leng et al., 2003, J Exp Med 197:1467-76). El efecto terapéutico de los anticuerpos antagonistas anti-CD74 sobre las vías intracelulares mediadas por MIF puede ser de utilidad para el tratamiento de una amplia gama de estados patológicos, como los cánceres de vejiga, próstata, mama, pulmón, colon y leucemia linfocítica crónica (por ejemplo, Meyer-Siegler et al., 2004, BMC Cancer 12:34; Shachar & Haran, 2011, Leuk Lymphoma 52:1446-54). Milatuzumab (hLL1) es un anticuerpo anti-CD74 ejemplar de uso terapéutico para el tratamiento de enfermedades mediadas por MIF.

[0133] Un ejemplo del par anticuerpo/antígeno más preferido es LL1, un MAb anti-CD74 (cadena invariante, chaperona

específica de clase II, **II**) (véase, por ejemplo, Patentes de EE.UU. N.º 6,653,104; 7,312,318). El antígeno CD74 está altamente expresado en linfomas de células B (incluido el mieloma múltiple) y leucemias, ciertos linfomas de células T, melanomas, cánceres de colon, pulmón y riñón, glioblastomas y otros tipos de cáncer (Ong et al., Immunology 98:296-302 (1999)). Una revisión del uso de anticuerpos CD74 en el cáncer se encuentra en Stein et al., Clin Cancer Res. 2007.

Las enfermedades que se tratan preferentemente con anticuerpos anti-CD74 incluyen, entre otras, linfoma no Hodgkin, enfermedad de Hodgkin, melanoma, cáncer de pulmón, renal, colónico, glioblastoma multiforme, histiocitomas, leucemias mieloides y mieloma múltiple.

[0134] Los métodos y composiciones aquí divulgados pueden utilizar cualquiera de una variedad de anticuerpos conocidos en el arte. Los anticuerpos utilizados pueden obtenerse comercialmente de diversas fuentes conocidas. Por ejemplo, la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) dispone de una gran variedad de líneas de hibridoma secretoras de anticuerpos. Se ha depositado en el ATCC un gran número de anticuerpos contra diversas dianas de enfermedades, incluyendo pero sin limitarse a antígenos asociados a tumores, y/o se han publicado secuencias de región variable y están disponibles para su uso en los métodos y composiciones divulgados. Véase, por ejemplo, Patentes de EE.UU. N.º

7,312,318; 7,282,567; 7,151,164; 7,074,403; 7,060,802; 7,056,509; 7,049,060; 7,045,132; 7,041,803; 7,041,802; 7,041,293; 7,038,018; 7,037,498; 7,012,133; 7,001,598; 6,998,468; 6,994,976; 6,994,852; 6,989,241; 6,974,863; 6,965,018; 6,964,854; 6,962,981; 6,962,813; 6,956,107; 6,951,924; 6,949,244; 6,946,129; 6,943,020; 6,939,547; 6,921,645; 6,921,645; 6,921,533; 6,919,433; 6,919,078; 6,916,475; 6,905,681; 6,899,879; 6,893,625; 6,887,468; 6,887,466; 6,884,594; 6,881,405; 6,878,812; 6,875,580; 6,872,568; 6,867,006; 6,864,062; 6,861,511; 6,861,227; 6,861,226; 6,838,282; 6,835,549; 6,835,370; 6,824,780; 6,824,778; 6,812,206; 6,793,924; 6,783,758; 6,770,450; 6,767,711; 6,764,688; 6,764,681; 6,764,679; 6,743,898; 6,733,981; 6,730,307; 6,720,155; 6,716,966; 6,709,653; 6,693,176; 6,692,908; 6,689,607; 6,689,362; 6,689,355; 6,682,737; 6,682,736; 6,682,734; 6,673,344; 6,653,104; 6,652,852; 6,635,482; 6,630,144; 6,610,833; 6,610,294; 6,605,441; 6,605,279; 6,596,852; 6,592,868; 6,576,745; 6,572,856; 6,566,076; 6,562,618; 6,545,130; 6,544,749; 6,534,058; 6,528,625; 6,528,269; 6,521,227; 6,518,404; 6,511,665; 6,491,915; 6,488,930; 6,482,598; 6,482,408; 6,479,247; 6,468,531; 6,468,529; 6,465,173; 6,461,823; 6,458,356; 6,455,044; 6,455,040; 6,451,310; 6,444,206; 6,441,143; 6,432,404; 6,432,402; 6,419,928; 6,413,726; 6,406,694; 6,403,770; 6,403,091; 6,395,276; 6,395,274; 6,387,350; 6,383,759; 6,383,484; 6,376,654; 6,372,215; 6,359,126; 6,355,481; 6,355,444; 6,355,245; 6,355,244; 6,346,246; 6,344,198; 6,340,571; 6,340,459; 6,331,175; 6,306,393; 6,254,868; 6,187,287; 6,183,744; 6,129,914; 6,120,767; 6,096,289; 6,077,499; 5,922,302; 5,874,540; 5,814,440; 5,798,229; 5,789,554; 5,776,456; 5,736,119; 5,716,595; 5,677,136; 5,587,459; 5,443,953; 5,525,338. Éstos son sólo ejemplos y en la técnica se conoce una amplia variedad de otros anticuerpos y sus hibridomas. El experto se dará cuenta de que pueden obtenerse secuencias de anticuerpos o hibridomas secretores de anticuerpos contra casi cualquier antígeno asociado a una enfermedad mediante una simple búsqueda en las bases de datos ATCC, NCBI y/o USPTO de anticuerpos contra una diana de interés seleccionada asociada a una enfermedad. Los dominios de unión a antígeno de los anticuerpos clonados pueden amplificarse, extirparse, ligarse a un vector de expresión, transfectarse a una célula huésped adaptada y utilizarse para la producción de proteínas, utilizando técnicas estándar bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Patentes de EE.UU. N.º 7,531,327; 7,537,930; 7,608,425 y 7,785,880).

[0135] En otros ejemplos de la presente divulgación, los complejos de anticuerpos se unen a un CMH de clase I, CMH de clase II o molécula accesoria, como CD40, CD54, CD80 o CD86. El complejo de anticuerpos también puede unirse a una citoquina de activación leucocitaria, o a un mediador de citoquinas, como NF- κ B.

[0136] En ciertos ejemplos, una de las dos dianas diferentes puede ser un receptor de células cancerosas o un antígeno asociado al cáncer, en particular uno que se selecciona del grupo que consiste en antígenos de linaje de células B (CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, etc.), VEGF, VEGFR, EGFR, antígeno carcinoembrionario (CEA), factor de crecimiento placentario (PIGF), tenascina, HER-2/neu, EGP-1, EGP-2, CD25, CD30, CD33, CD38, CD40, CD45, CD52, CD74, CD80, CD138, NCA66, CEACAM1, CEACAM6 (molécula de adhesión celular 6 relacionada con el antígeno carcinoembrionario), MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC16, IL-6, α -fetoproteína (AFP), A3, CA125, antígeno-p específico del colon (CSAp), receptor de folato, HLA-DR, gonadotropina coriónica humana (HCG), la, EL-2, factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) y receptor de IGF, KS-1, Le(y), MAGE, antígenos de necrosis, PAM-4, fosfatasa ácida prostática (PAP), Pr1, antígeno prostático específico (PSA), antígeno de membrana prostático específico (PSMA), S100, T101, TAC, TAG72, receptores TRAIL y anhidrasa carbónica IX.

Immunoconjugates

[0137] En ciertas realizaciones de la invención como se define en las reivindicaciones, los anticuerpos o fragmentos de los mismos pueden conjugarse con uno o más agentes terapéuticos o de diagnóstico. Los agentes terapéuticos no tienen por qué ser los mismos, sino que pueden ser diferentes, por ejemplo, un fármaco y un radioisótopo. Por ejemplo, se puede incorporar ^{131}I a una tirosina de un anticuerpo o proteína de fusión y un fármaco unido a un grupo amino épsilon de un residuo de lisina. Los agentes terapéuticos y de diagnóstico también pueden unirse, por ejemplo, a grupos SH reducidos y/o a cadenas laterales de carbohidratos. Muchos métodos para hacer conjugados covalentes o no covalentes de agentes terapéuticos o de diagnóstico con anticuerpos o proteínas de fusión son conocidos en la técnica y se puede utilizar cualquiera de estos métodos conocidos.

[0138] Un agente terapéutico o de diagnóstico puede fijarse en la región bisagra de un componente de anticuerpo reducido mediante la formación de un enlace disulfuro. Alternativamente, dichos agentes pueden unirse utilizando un reticulante

heterobifuncional, como el N-succinil 3-(2-piridilditio)propionato (SPDP). Yu et al., Int. J. Cancer 56: 244 (1994). Las técnicas generales para dicha conjugación son bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Wong, CHEMISTRY OF PROTEIN CONJUGATION AND CROSS-LINKING (CRC Press 1991); Upeslakis et al., "Modification of Antibodies by Chemical Methods", en MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND APPLICATIONS, Birch et al. (eds.), páginas 187-230 (Wiley-Liss, Inc. 1995); Price, "Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies", en MONOCLONAL ANTIBODIES: PRODUCTION, ENGINEERING AND CLINICAL APPLICATION, Ritter et al. (eds.), páginas 60-84 (Cambridge University Press 1995). Alternativamente, el agente terapéutico o de diagnóstico puede conjugarse a través de una fracción de carbohidrato en la región Fc del anticuerpo. El grupo carbohidrato puede utilizarse para aumentar la carga del mismo agente que está unido a un grupo tiol, o la fracción carbohidrato puede utilizarse para unir un agente terapéutico o de diagnóstico diferente.

[0139] Los métodos para conjugar péptidos con componentes de anticuerpo a través de una fracción de carbohidrato de anticuerpo son bien conocidos por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Shih et al., Int. J. Cancer 41: 832 (1988); Shih et al., Int. J. Cancer 46: 1101 (1990); and Shih et al., Patente de EE. UU. N.º 5,057,313. El método general consiste en hacer reaccionar un componente de anticuerpo que tiene una porción de carbohidrato oxidado con un polímero portador que tiene al menos una función de amina libre. Esta reacción da lugar a un enlace inicial de base de Schiff (imina), que puede estabilizarse mediante reducción a una amina secundaria para formar el conjugado final.

[0140] La región Fc puede estar ausente si el anticuerpo utilizado como componente del inmunoconjugado es un fragmento de anticuerpo. Sin embargo, es posible introducir una fracción de carbohidrato en la región variable de la cadena ligera de un anticuerpo de longitud completa o de un fragmento de anticuerpo. Véase, por ejemplo, Leung et al., J. Immunol. 154: 5919 (1995); Hansen et al., Patente de EE. UU. N.º 5,443,953 (1995), Leung et al., Patente de EE. UU. N.º 6,254,868. La fracción de carbohidrato modificada se utiliza para fijar el agente terapéutico o de diagnóstico.

[0141] En algunas realizaciones de la invención como se define en las reivindicaciones, un agente quelante puede unirse a un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o proteína de fusión y utilizarse para quelar un agente terapéutico o de diagnóstico, como un radionucleido. Los quelantes ejemplares incluyen, entre otros, DTPA (como Mx-DTPA), DOTA, TETA, NETA o NOTA. Los métodos de conjugación y el uso de agentes quelantes para unir metales u otros ligandos a proteínas son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Patente de EE. UU. N.º 7,563,433).

[0142] En ciertas realizaciones de la invención tal como se define en las reivindicaciones, los metales radiactivos o los iones paramagnéticos pueden unirse a proteínas o péptidos por reacción con un reactivo que tiene una cola larga, a la que puede unirse una multiplicidad de grupos quelantes para unir iones. Dicha cola puede ser un polímero como una polilisina, un polisacárido u otras cadenas derivatizadas o derivatizables que tengan grupos colgantes a los que puedan unirse grupos quelantes como, por *ejemplo*, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), porfirinas, poliaminas, éteres de corona, bis-tiosemicarbazonas, polioximas y grupos similares conocidos por su utilidad para este fin.

[0143] Los quelatos pueden unirse directamente a anticuerpos o péptidos, por ejemplo como se describe en Patente de EEUU. 4.824.659. Entre las combinaciones de metal-quelato particularmente útiles se incluyen el 2-bencil-DTPA y sus análogos monometil y ciclohexil, utilizados con isótopos de diagnóstico en el rango energético general de 60 a 4.000 keV, como ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹²³I, ¹²⁴I, ⁶²Cu, ⁶⁴Cu, ¹⁸F, ¹¹¹In, ⁶⁷Ga, ⁶⁸Ga, ^{99m}Tc, ^{94m}Tc, ¹¹C, ¹³N, ¹⁵O, ⁷⁶Br, para radioimagen. Los mismos quelatos, cuando forman complejos con metales no radiactivos, como el manganeso, el hierro y el gadolinio, son útiles para la MRI. Los quelatos macrocíclicos como NOTA, DOTA y TETA se utilizan con diversos metales y radiometales, en particular con radionucleidos de galio, itrio y cobre, respectivamente. Estos complejos de quelato metálico pueden hacerse muy estables adaptando el tamaño del anillo al metal de interés. Se incluyen otros quelatos de tipo anillo, como los poliéteres macrocíclicos, que son de interés para la unión estable de nucleidos, como el ²²³Ra para RAIT.

[0144] Más recientemente, se han divulgado métodos de marcado con ¹⁸F de uso en técnicas de exploración PET, por ejemplo por reacción del F-18 con un metal u otro átomo, como el aluminio. El conjugado ¹⁸F-Al puede complejarse con grupos quelantes, como DOTA, NOTA o NETA, que se unen directamente a los anticuerpos o se utilizan para marcar constructos seleccionables en métodos de selección previa. Tales técnicas de marcación F-18 se divulgan en Patente de EE. UU. N.º 7,563,433.

[0145] En realizaciones preferidas específicas de la invención como se define en las reivindicaciones, un inmunoconjugado puede ser un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC). Dos fármacos ejemplares para la producción de ADC son el SN-38 y una forma profármaco de la 2-pirrolinodoxorrubicina (P2PDox). Las composiciones y métodos de producción de ADCs conjugados con SN-38 se describen, por ejemplo, en Patentes de EE.UU. N.º 7,999,083; 8,080,250; 8,741,300; 8,759,496. Composiciones y métodos de producción de P2PDox ADCs se divulgan, por ejemplo, en Patente de EE. UU. N.º 8,877,101.

Métodos de producción de anticuerpos biespecíficos

[0146] Según la presente divulgación, una terapia combinada puede utilizar uno o más anticuerpos biespecíficos (bsAbs), como un bsAb redireccionador de leucocitos. Un anticuerpo biespecífico, tal como se utiliza aquí, es un anticuerpo que contiene sitios de unión para dos antígenos diferentes, o dos epítopos diferentes en el mismo antígeno. Un anticuerpo

que sólo puede unirse a un único epítipo de un único antígeno es monoespecífico, independientemente del número de sitios de unión al antígeno que tenga la molécula de anticuerpo.

[0147] Los primeros intentos de construcción de anticuerpos biespecíficos utilizaron reticulación química o hibridomas o cuádrimas híbridas para unir las dos mitades de dos anticuerpos diferentes (por ejemplo, Staerz et al., 1985, *Nature* 314:628-31; Milstein y Cuello, *Nature* 1983; 305:537-540; Karpovsky et al., 1984, *J Exp Med* 160:1686-701). Aunque las técnicas funcionan para fabricar bsAbs, varios problemas de producción dificultaron el uso de dichos complejos, como la producción dual y poblaciones mixtas que contienen diferentes combinaciones de sitios de unión a antígenos, la dificultad de expresión de la proteína, la necesidad de purificar el bsAb de interés, los bajos rendimientos, los gastos de producción, etc.

[0148] Enfoques más recientes han utilizado constructos modificados genéticamente que son capaces de producir productos homogéneos de bsAbs únicos, sin necesidad de purificación extensiva para eliminar subproductos no deseados. Tales constructos han incluido scFv en tándem, diacuerpos, diacuerpos en tándem, anticuerpos de dominio variable dual y heterodimerización utilizando un motivo como el dominio CH1/Ck o DNL™ (Chames & Baty, 2009, *Curr Opin Drug Discov Devel* 12:276-83; Chames & Baty, mAbs 1:539-47).

[0149] Triomabs es una variación del enfoque quadroma que utiliza una combinación de anticuerpos IgG2a de ratón e IgG2b de rata para producir preferentemente el anticuerpo recombinante, en comparación con el emparejamiento aleatorio que se observa típicamente en los quadromas rata/rata o ratón/ratón (Chames & Baty, mAbs 1:539-47). Un bsAb anti-CD3 × anti-EpCAM (catumaxomab) creado mediante esta técnica fue capaz de reclutar eficazmente macrófagos y células NK y de activar células T (Chames & Baty, mAbs 1:539-47). Como ya se ha comentado, el catumaxomab ha sido aprobado en Europa para el tratamiento de la ascitis maligna en pacientes con carcinomas EpCAM positivos (Chames & Baty, mAbs 1:539-47). Sorprendentemente, se informó de que el bsAb recombinante sólo inducía respuestas moderadas anti-ratón y anti-rata en humanos (Chames & Baty, mAbs 1:539-47), probablemente debido, al menos en parte, a la vía de administración i.p. para la ascitis. Ertumaxomab es otro triomab dirigido contra HER2, que puede ser útil para el cáncer de mama metastásico. Bi20 es otro triomab dirigido contra CD20. In vitro, Bi20 exhibió una lisis eficiente de células B de pacientes con CLL (Chames & Baty, mAbs 1:539-47).

[0150] BITE® se refiere a scFvs en tándem que están unidos por un engarce peptídico corto (Chames & Baty, mAbs 1:539-47). Blinatumomab es un BITE® anti-CD19 × anti-CD3 con eficacia notificada en cánceres hematológicos, como el linfoma no Hodgkin y la ALL, a concentraciones muy bajas (Nagorsen et al., 2009, *Leukemia & Lymphoma* 50:886-91; Chames & Baty, mAbs 1:539-47; Topp et al., 2012, *Blood* 120:5185-87; Bargou et al., 2008, *Science* 321:974-77). Otro BITE® con especificidad para EpCAM se ha utilizado en cáncer gastrointestinal, de ovario, colorrectal y de pulmón (Amann et al., 2009, *J Immunother* 32:452-64; Chames & Baty, mAbs 1:539-47). Se ha propuesto el uso de otro BITE® (MEDI-565) dirigido a CEACAM5 en cánceres de melanoma, colorrectal, pulmón, páncreas, estómago, ovario, útero y mama (Sanders et al., 1994, *J Pathol* 172:343-8). Se ha descrito que el BITE® presenta actividad antitumoral a concentraciones picomolares o incluso femtomolares (Chames & Baty, mAbs 1:539-47).

[0151] Otro método de formación de bsAb, que implica el ensamblaje de dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras derivadas de dos anticuerpos preexistentes diferentes, se basa en un enfoque knobs-into-holes que facilita la formación de heterodímeros y evita la formación de homodímeros (Schaefer et al., 2011, *Proc Natl. Acad Sci USA* 108:11187-92). La técnica "CrossMab" implica además el intercambio de los dominios de las cadenas pesada y ligera dentro del Fab de una mitad del anticuerpo biespecífico, haciendo que los dos brazos sean tan diferentes que no pueda producirse el emparejamiento erróneo de las cadenas ligera-pesada (Schaefer et al., 2011). El enfoque "knobs-into-holes" introduce aminoácidos con cadenas laterales voluminosas en el dominio CH3 de una cadena pesada que encajan en cavidades adecuadamente diseñadas en el dominio CH3 de la otra cadena pesada. La combinación de enfoques evita que se produzcan interacciones erróneas tanto entre la cadena pesada y la cadena pesada como entre la cadena pesada y la cadena ligera, lo que da como resultado principalmente un único producto. El CrossMab inicial, generado contra la angiopoyetina-2 (Ang-2) y el VEGF-A, mostró características de unión comparables a los mAbs parentales, con una potente actividad antiangiogénica y antitumoral (Schaefer et al., 2011, *Proc Natl. Acad Sci USA* 108:11187-92; Kienast et al., *Clin Cancer Res*, 25 de octubre de 2013, Epub ahead of print).

[0152] Además de la tecnología DART™ discutida anteriormente, otros enfoques para la producción de bsAb han incluido fusiones tetravalentes IgG-scFv (Dong et al., 2011, *MAbs* 3:273-88); anticuerpos Fab de doble acción (DAF) (Bostrom et al., 2009, *Science* 323:1610-14); anticuerpos de dominio variable dual similares a IgG (DVD-Ig) (Wu et al., 2007, *Nat Biotechnol* 25:1290-97); y el uso de intercambio dinámico entre moléculas IgG4 (van der Neut Kofschoten et al., 2007, *Science* 317:1554-57). Aunque se prefiere la tecnología DNL™ comentada a continuación para la formación de bsAbs redireccionadores de leucocitos, la persona con conocimientos ordinarios se dará cuenta de que pueden usarse otros tipos de bsAbs en los métodos y composiciones reivindicados.

DOCK-AND-LOCK™ (DNL™)

[0153] En algunos ejemplos de la presente divulgación, un anticuerpo biespecífico, solo o bien complejo con uno o más efectores tales como citoquinas, se forma como un complejo DOCK-AND-LOCK™ (DNL™) (véase, por ejemplo, Patentes de EE.UU. N.º 7,521,056; 7,527,787; 7,534,866; 7,550,143; 7,666,400; 7,901,680; 7,906,118; 7,981,398; 8,003,111.) En

general, la técnica aprovecha las interacciones de unión específicas y de alta afinidad que se producen entre una secuencia de dominio de dimerización y acoplamiento (DDD) de las subunidades reguladoras (R) de la proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA) y una secuencia de dominio de anclaje (AD) derivada de cualquiera de una variedad de proteínas AKAP (Baillie et al., FEBS Letters. 2005; 579: 3264. Wong y Scott, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2004; 5: 959). Los péptidos DDD y AD pueden unirse a cualquier proteína, péptido u otra molécula. Dado que las secuencias DDD se dimerizan espontáneamente y se unen a la secuencia AD, la técnica permite la formación de complejos entre cualquier molécula seleccionada que pueda unirse a las secuencias DDD o AD.

[0154] Aunque el complejo DNL™ estándar comprende un trímero con dos moléculas ligadas a DDD unidas a una molécula ligada a AD, variaciones en la estructura del complejo permiten la formación de dímeros, trímeros, tetrámeros, pentámeros, hexámeros y otros multímeros. En algunas realizaciones, el complejo DNL™ puede comprender dos o más anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o proteínas de fusión que se unen al mismo determinante antigénico o a dos o más antígenos diferentes. El complejo DNL™ también puede comprender uno o más efectores, como proteínas, péptidos, inmunomoduladores, citoquinas, interleucinas, interferones, proteínas de unión, ligandos peptídicos, proteínas transportadoras, toxinas, ribonucleasas como onconasa, oligonucleótidos inhibidores como ARNs, antígenos o xenoantígenos, polímeros como PEG, enzimas, agentes terapéuticos, hormonas, agentes citotóxicos, agentes antiangiogénicos, agentes proapoptóticos o cualquier otra molécula o agregado.

[0155] La PKA, que desempeña un papel central en una de las vías de transducción de señales mejor estudiadas, desencadenada por la unión del segundo mensajero AMPc a las subunidades R, se aisló por primera vez del músculo esquelético de conejo en 1968 (Walsh et al., J. Biol. Chem. 1968;243:3763). La estructura de la holoenzima consta de dos subunidades catalíticas mantenidas en forma inactiva por las subunidades R (Taylor, J. Biol. Chem. 1989;264:8443). Las isozimas de la PKA se encuentran con dos tipos de subunidades R (RI y RII), y cada tipo tiene isoformas α y β (Scott, Pharmacol. Ther. 1991;50:123). Así, las cuatro isoformas de subunidades reguladoras de la PKA son RI α , RI β , RII α y RII β , cada una de las cuales comprende una secuencia de aminoácidos de fracción DDD. Las subunidades R sólo se han aislado como dímeros estables y se ha demostrado que el dominio de dimerización consiste en los primeros 44 residuos aminoterminales de RII α (Newlon et al., Nat. Struct. Biol. 1999; 6:222). Como se comenta más adelante, partes similares de las secuencias de aminoácidos de otras subunidades reguladoras están implicadas en la dimerización y el acoplamiento, cada una de ellas localizada cerca del extremo N-terminal de la subunidad reguladora. La unión del AMPc a las subunidades R conduce a la liberación de subunidades catalíticas activas para un amplio espectro de actividades de serina/treonina cinasa, que se orientan hacia sustratos seleccionados mediante la compartimentación de la PKA a través de su acoplamiento con las AKAP (Scott et al., J. Biol. Chem. 1990;265:21561).

[0156] Desde que se caracterizó la primera AKAP, la proteína-2 asociada a microtúbulos, en 1984 (Lohmann et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1984; 81:6723), se han identificado más de 50 AKAP que se localizan en diversos sitios subcelulares, como la membrana plasmática, el citoesqueleto de actina, el núcleo, las mitocondrias y el retículo endoplásmico, con estructuras diversas en especies que van desde la levadura hasta el ser humano (Wong y Scott, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2004;5:959). El AD de AKAP para PKA es una hélice anfipática de 14-18 residuos (Carr et al., J. Biol. Chem. 1991;266:14188). Las secuencias de aminoácidos del AD varían entre los AKAP individuales, y las afinidades de unión comunicadas para los dímeros RII oscilan entre 2 y 90 nM (Alto et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2003;100:4445). Las AKAP sólo se unen a subunidades R diméricas. En el caso del RII α humano, el AD se une a una superficie hidrofóbica formada por los 23 residuos aminoterminales (Colledge y Scott, Trends Cell Biol. 1999; 6:216). Así, el dominio de dimerización y el dominio de unión a AKAP del RII α humano se encuentran en la misma secuencia N-terminal de 44 aminoácidos (Newlon et al., Nat. Struct. Biol. 1999;6:222; Newlon et al., EMBO J. 2001;20:1651), que aquí se denomina DDD.

[0157] Hemos desarrollado una tecnología de plataforma para utilizar el DDD de las subunidades reguladoras PKA humanas y el AD de AKAP como un excelente par de módulos de engarce para acoplar dos entidades cualesquiera, denominadas en lo sucesivo **A** y **B**, en un complejo no covalente, que podría bloquearse adicionalmente en un complejo DNL™ mediante la introducción de residuos de cisteína tanto en el DDD como en el AD en posiciones estratégicas para facilitar la formación de enlaces disulfuro. La metodología general del planteamiento es la siguiente. La entidad **A** se construye enlazando una secuencia DDD a un precursor de **A**, lo que da lugar a un primer componente denominado en lo sucesivo **a**. Dado que la secuencia DDD provocaría la formación espontánea de un dímero, **A** estaría compuesto por **a₂**. La entidad **B** se construye enlazando una secuencia AD a un precursor de **B**, lo que da lugar a un segundo componente denominado en lo sucesivo **b**. El motivo dimérico de DDD contenido en **a₂** creará un sitio de acoplamiento para la unión a la secuencia AD contenida en **b**, facilitando así una fácil asociación de **a₂** y **b** para formar un complejo trimérico binario compuesto por **a₂b**. Este evento de unión se estabiliza con una reacción posterior para asegurar covalentemente las dos entidades a través de puentes disulfuro, que se produce muy eficientemente basándose en el principio de concentración local efectiva porque las interacciones de unión iniciales deben poner en proximidad los grupos tiol reactivos colocados tanto en la DDD como en la AD (Chmura et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2001;98:8480) para ligar sitio-específicamente. Utilizando diversas combinaciones de engarces, módulos adaptadores y precursores, puede producirse y utilizarse una amplia variedad de constructos DNL™ de diferente estequiometría (véase, por ejemplo, N.º 7,550,143; 7,521,056; 7,534,866; 7,527,787 y 7,666,400.)

[0158] Al ligar el DDD y el AD lejos de los grupos funcionales de los dos precursores, también se espera que tales ligaciones de sitio específico preserven las actividades originales de los dos precursores. Este enfoque es de naturaleza modular y puede aplicarse potencialmente para enlazar, de forma específica y covalente, una amplia gama de sustancias,

incluidos péptidos, proteínas, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y otras moléculas efectoras con una amplia gama de actividades. Utilizando el método de proteína de fusión para construir efectores conjugados AD y DDD descrito en los Ejemplos siguientes, prácticamente cualquier proteína o péptido puede incorporarse a un constructo DNL™. Sin embargo, la técnica no es limitativa y pueden utilizarse otros métodos de conjugación.

[0159] Se conoce una variedad de métodos para hacer proteínas de fusión, incluyendo síntesis de ácido nucleico, hibridación y/o amplificación para producir un ácido nucleico sintético de doble cadena que codifica una proteína de fusión de interés. Dichos ácidos nucleicos bicatenarios pueden insertarse en vectores de expresión para la producción de proteínas de fusión mediante técnicas estándar de biología molecular (véase, por ejemplo, Sambrook et al., MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, 2nd Ed, 1989). En tales realizaciones preferidas, la fracción AD y/o DDD puede unirse al extremo N-terminal o C-terminal de una proteína o péptido efector. Sin embargo, el experto se dará cuenta de que el sitio de unión de una fracción AD o DDD a una fracción efectora puede variar, dependiendo de la naturaleza química de la fracción efectora y de la(s) parte(s) de la fracción efectora implicada(s) en su actividad fisiológica. La unión específica de una variedad de moléculas efectoras puede realizarse mediante técnicas conocidas en la técnica, como el uso de reactivos de reticulación bivalentes y/u otras técnicas de conjugación química.

[0160] La tecnología Dock-and-Lock™ (DNL™) se ha utilizado para producir una variedad de complejos en formatos variados (Rossi et al., 2012, Bioconjug Chem 23:309-23). Los anticuerpos hexavalentes biespecíficos (bsHexAbs) basados en veltuzumab (anti-CD20) y epratuzumab (anti-CD22) se construyeron combinando un (Fab)₂ estabilizado fusionado a un dominio de dimerización y acoplamiento (DDD) con una IgG que contenía un dominio de anclaje (AD) anexado en el extremo C-terminal de cada cadena pesada (C_H3-AD2-IgG) (Rossi et al., 2009, Blood 113, 6161-71). En comparación con las mezclas de sus mAbs parentales, estos bsHexAbs basados en Fc, denominados en lo sucesivo "Fc-bsHexAbs", indujeron eventos de señalización únicos (Gupta et al., 2010, Blood 116:3258-67), y mostraron una potente citotoxicidad *in vitro*. Sin embargo, los Fc-bsHexAbs se eliminaron de la circulación de ratones aproximadamente el doble de rápido que los mAbs parentales (Rossi et al., 2009, Blood 113, 6161-71). Aunque los Fc-bsHexAbs son muy estables *ex vivo*, es posible que se produzca cierta disociación *in vivo*, por ejemplo por procesamiento intracelular. Además, los Fc-bsHexAbs carecen de actividad CDC.

[0161] Las inmunocitoquinas basadas en Fc también se han ensamblado como complejos DNL™, que comprenden dos o cuatro moléculas de interferón-alfa 2b (IFNα2b) fusionadas al extremo C-terminal del Fc C_H3-AD2-IgG (Rossi et al., 2009, Blood 114:3864-71; Rossi et al., 2010, Cancer Res 70:7600-09; Rossi et al., 2011, Blood 118:1877-84). Los Fc-IgG-IFNα mantuvieron una elevada actividad específica, cercana a la del IFNα recombinante, y fueron notablemente potentes *in vitro* e *in vivo* contra xenoinjertos de linfoma no hodgkiniano (LNH). El T_{1/2} del Fc-IgG-IFNα en ratones fue mayor que el del IFNα PEGilado, pero la mitad que el de los mAbs parentales. Al igual que los Fc-bsHexAbs, los Fc-IgG-IFNα se disociaron *in vivo* con el tiempo y mostraron una CDC disminuida, pero la ADCC aumentó.

Relaciones estructura-función en las moléculas AD y DDD

[0162] Para diferentes tipos de constructos DNL™, pueden utilizarse diferentes secuencias AD o DDD. A continuación se ofrecen ejemplos de secuencias DDD y AD.

DDD1
SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID N.º: 1)
DDD2
CGHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID N.º:2)
AD1
QIEYLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID N.º: 3)
AD2
CGQIEYLAKQIVDNAIQQAGC (SEQ ID N.º:4)

[0163] El experto se dará cuenta de que DDD1 y DDD2 se basan en la secuencia DDD de la isoforma humana R11α de la proteína quinasa A. Sin embargo, en realizaciones alternativas, las moléculas DDD y AD pueden basarse en la secuencia DDD de la forma humana R1α de la proteína quinasa A y una secuencia AKAP correspondiente, como se ejemplifica en DDD3, DDD3C y AD3 a continuación.

DDD3
SLRECELYVQKHNIQALLKDSIVQLCTARPERPMAFLREYFERLEKEEAK (SEQ ID N.º:5)
DDD3C
MSCGGSLECELYVQKHNIQALLKDSIVQLCTARPERPMAFLREYFERLEKEEAK (SEQ ID N.º:6)
AD3
CGFEELAWKIAKMIWSDVFQGGC (SEQ ID N.º:7)

[0164] Alternativamente, pueden utilizarse otras variantes de secuencia de elementos AD y/o DDD en la construcción de los complejos DNL™. Por ejemplo, sólo existen cuatro variantes de las secuencias DDD de la PKA humana, que corresponden a los cuerpos DDD de la PKA R1α, R11α, R1β y R11β. La secuencia R11α DDD es la base de las DDD1 y DDD2 descritas anteriormente. A continuación se muestran las cuatro secuencias DDD de la PKA humana. La secuencia DDD

representa los residuos 1-44 de RII α , 1-44 de RII β , 12-61 de RI α y 13-66 de RI β . (Obsérvese que la secuencia de DDD1 está ligeramente modificada con respecto a la fracción DDD de la PKA RII α humana).

PKA RI α
SLRECELYVQKHNIQALLKDVSIQLCTARPERPMAFLREYFEKLEKEEAK (SEQ ID N.º:8)
PKA RI β
SLKGCELYVQLHGIQQVLKDCIVHLCISKPERPMKFLREHFEEKLEKEENRQILA (SEQ ID N.º:9)
PKA RII α
SHIQIPPGLTELLQGYTVEVGQQPPDLVDFAVEYFTRLREARRQ (SEQ ID N.º:10)
PKA RII β
SIEIPAGLTELLQGFTVEVLRHQPADLLEFALQHFTRLQQENER (SEQ ID N.º:11)

[0165] Las relaciones estructura-función de los dominios AD y DDD han sido objeto de investigación. (Véanse, por ejemplo, Burns-Hamuro et al., 2005, Protein Sci 14:2982-92; Carr et al., 2001, J Biol Chem 276:17332-38; Alto et al., 2003, Proc Natl Acad Sci USA 100:4445-50; Hundsruker et al., 2006, Biochem J 396:297-306; Stokka et al., 2006, Biochem J 400:493-99; Gold et al., 2006, Mol Cell 24:383-95; Kinderman et al., 2006, Mol Cell 24:397-408).

[0166] Por ejemplo, Kinderman et al. (2006, Mol Cell 24:397-408) examinaron la estructura cristalina de la interacción de unión AD-DDD y concluyeron que la secuencia DDD humana contenía una serie de residuos de aminoácidos conservados que eran importantes en la formación de dímeros o en la unión AKAP, subrayados en SEQ ID NO:1 a continuación. (Véase la figura 1 de Kinderman et al., 2006). El experto se dará cuenta de que al diseñar variantes de secuencia de la secuencia DDD, sería deseable evitar cambiar cualquiera de los residuos subrayados, mientras que podrían hacerse sustituciones conservadoras de aminoácidos para residuos que son menos críticos para la dimerización y la unión a AKAP.

SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA(SEQ ID N.º:1)

[0167] Como se discute con más detalle a continuación, se han caracterizado sustituciones conservadoras de aminoácidos para cada uno de los veinte L-aminoácidos comunes. Así, basándose en los datos de Kinderman (2006) y en sustituciones conservadoras de aminoácidos, en la **Tabla 2** se muestran posibles secuencias DDD alternativas basadas en la SEQ ID N.º:1. Al elaborar la **Tabla 2**, sólo se tuvieron en cuenta las sustituciones de aminoácidos altamente conservadoras. Por ejemplo, los residuos cargados sólo se sustituyeron por residuos de la misma carga, los residuos con cadenas laterales pequeñas se sustituyeron por residuos de tamaño similar, las cadenas laterales de hidroxilos sólo se sustituyeron por otros hidroxilos, etc. Debido al efecto único de la prolina sobre la estructura secundaria de los aminoácidos, no se sustituyó la prolina por ningún otro residuo. Un número limitado de tales posibles secuencias alternativas de fracción DDD se muestran en SEQ ID N.º:12 a SEQ ID N.º:31 a continuación. El experto se dará cuenta de que las especies alternativas dentro del género de las moléculas DDD pueden construirse mediante técnicas estándar, por ejemplo, utilizando un sintetizador de péptidos comercial o técnicas de mutagénesis dirigidas al sitio bien conocidas. El efecto de las sustituciones de aminoácidos sobre la unión de la fracción AD también puede determinarse fácilmente mediante ensayos de unión estándar, por ejemplo como se describe en Alto et al. (2003, Proc Natl Acad Set USA 100:4445-50).

Tabla 2. Sustituciones de Aminoácido Conservador en DDD1 (SEQ ID NO: 1). Secuencia de consenso divulgada como SEQ ID NO: 87.

S	H	I	Q	I	P	P	G	L	T	E	L	L	Q	G	Y	T	V	E	V	L	R
T	K		N				A		S	D			N	A		S		D			K
	R																				

Q	Q	P	P	D	L	V	E	F	A	V	E	Y	F	T	R	L	R	E	A	R	A
N	N			E			D		L		D			S	K		K	D	L	K	L
									I										I		
									V										V		V

THIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID N.º:12)
SKIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID N.º:13)
SRIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID N.º:14)
SHINIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID N.º:15)
SHIQIPPALTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID N.º:16)
SHIQIPGLSELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID N.º:17)
SHIQIPPGLTDLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID N.º:18)

SHIQIPPGLTELLNGYTVEVLRQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID N.º:19)
 SHIQIPPGLTELLQAYTVEVLRQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID N.º:20)
 SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID N.º:21)
 SHIQIPPGLTELLQGYTVDVLRQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID N.º:22)
 SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLKQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID N.º:23)
 SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRNPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID N.º:24)
 SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQNPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID N.º:25)
 SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID N.º:26)
 SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQPPDLVDFAVEYFTRLREARA (SEQ ID N.º:27)
 SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQPPDLVEFLVEYFTRLREARA (SEQ ID N.º:28)
 SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQPPDLVEFIVEYFTRLREARA (SEQ ID N.º:29)
 SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQPPDLVEFVVEYFTRLREARA (SEQ ID N.º:30)
 SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQPPDLVEFAVDYFTRLREARA (SEQ ID N.º:31)

[0168] Alto et al. (2003, Proc Natl Acad Sci USA 100:4445-50) realizaron un análisis bioinformático de la secuencia AD de varias proteínas AKAP para diseñar una secuencia AD selectiva para RII denominada AKAP-IS (SEQ ID NO:3), con una constante de unión para DDD de 0,4 nM. La secuencia AKAP-IS se diseñó como un péptido antagonista de la unión de AKAP a PKA. Los residuos de la secuencia AKAP-IS en los que las sustituciones tendieron a disminuir la unión a la DDD aparecen subrayados en la SEQ ID NO:3 a continuación. El experto se dará cuenta de que al diseñar variantes de la secuencia AD, sería deseable evitar el cambio de cualquiera de los residuos subrayados, mientras que las sustituciones conservadoras de aminoácidos podrían hacerse para los residuos que son menos críticos para la unión DDD. La **Tabla 3** muestra posibles sustituciones conservadoras de aminoácidos en la secuencia de AKAP-IS (AD1, SEQ ID N.º:3), similar a la mostrada para DDD1 (SEQ ID N.º: 1) en la Tabla 2 anterior.

[0169] Un número limitado de tales secuencias alternativas potenciales de fracción AD se muestran en SEQ ID N.º:32 a SEQ ID N.º:49 a continuación. El experto podría fabricar, probar y utilizar otras especies dentro del género de posibles secuencias de fracción AD, basándose en los datos de Alto et al. (2003). Cabe señalar que la Figura 2 de Alto (2003) muestra una serie de sustituciones de aminoácidos que pueden realizarse, conservando la actividad de unión a las moléculas DDD, basándose en experimentos de unión reales.

AKAP-IS
 QIEYLAKQIVD¹NAIQQA (SEQ ID N.º:3)

Tabla 3. Sustituciones conservadoras de aminoácidos en AD1 (SEQ ID N.º:3). Secuencia de consenso divulgada como SEQ ID N.º:88.

Q	I	E	Y	L	A	K	Q	I	V	D	N	A	I	Q	Q	A
N	LV	D	FTS	IV		R	N			E	Q			N	N	LIV

NIEYLAKQIVD¹NAIQQA (SEQ ID N.º:32)
 QIEYLAKQIVD¹NAIQQA (SEQ ID N.º:33)
 QVEYLAKQIVD¹NAIQQA (SEQ ID N.º:34)
 QIDYLAKQIVD¹NAIQQA (SEQ ID N.º:35)
 QIEFLAKQIVD¹NAIQQA (SEQ ID N.º:36)
 QIETLAKQIVD¹NAIQQA (SEQ ID N.º:37)
 QIESLAKQIVD¹NAIQQA (SEQ ID N.º:38)
 QIEYIAKQIVD¹NAIQQA (SEQ ID N.º:39)
 QIEYVAKQIVD¹NAIQQA (SEQ ID N.º:40)
 QIEYLAKQIVD¹NAIQQA (SEQ ID N.º:41)
 QIEYLAKNIVD¹NAIQQA (SEQ ID N.º:42)
 QIEYLAKQIVEN¹NAIQQA (SEQ ID N.º:43)
 QIEYLAKQIVDQ¹AIQQA (SEQ ID N.º:44)
 QIEYLAKQIVD¹NAINQA (SEQ ID N.º:45)
 QIEYLAKQIVD¹NAIQNA (SEQ ID N.º:46)
 QIEYLAKQIVD¹NAIQQL (SEQ ID N.º:47)
 QIEYLAKQIVD¹NAIQQI (SEQ ID N.º:48)
 QIEYLAKQIVD¹NAIQQV (SEQ ID N.º:49)

[0170] Gold et al. (2006, Mol Cell 24:383-95) utilizaron la cristalografía y el cribado de péptidos para desarrollar una secuencia SuperAKAP-IS (SEQ ID NO:50), que presenta una selectividad cinco órdenes de magnitud mayor para la isoforma RII de la PKA en comparación con la isoforma RI. Los residuos subrayados indican las posiciones de las sustituciones de aminoácidos, en relación con la secuencia AKAP-IS, que aumentaron la unión a la fracción DDD de RIIα. En esta secuencia, el residuo N-terminal Q se numera como residuo número 4 y el residuo C-terminal A es el residuo número 20. Los residuos en los que se podían realizar sustituciones para afectar a la afinidad por RIIα eran los residuos 8, 11, 15, 16, 18, 19 y 20 (Gold et al., 2006). Se contempla que en ciertas realizaciones alternativas, la secuencia SuperAKAP-IS puede sustituirse por la secuencia de fracción AD AKAP-IS para preparar constructos DNL™. Otras

secuencias alternativas que podrían sustituirse por la secuencia AKAP-IS AD se muestran en SEQ ID N°:51-53. Las sustituciones relativas a la secuencia AKAP-IS están subrayadas. Se prevé que, al igual que con la secuencia AD2 mostrada en SEQ ID NO:4, la fracción AD también puede incluir los residuos N-terminales adicionales cisteína y glicina y los residuos C-terminales glicina y cisteína.

5

SuperAKAP-IS
QIEYVAKQIVDYAIHQA (SEQ ID N.º:50)
Secuencias AKAP alternativas

10

QIEYKAKQIVDHAIHQA (SEQ ID N.º:51)
QIEYHAKQIVDHAIHQA (SEQ ID N.º:52)
QIEYVAKQIVDHAIHQA (SEQ ID N.º:53)

15

[0171] La Figura 2 de Gold et al. reveló secuencias de unión a DDD adicionales de una variedad de proteínas AKAP, mostradas a continuación.
AKAP específicos de RII

[0172]

20

AKAP-KL
PLEYQAGLLVQNAIQQAI (SEQ ID N.º:54)
AKAP79
LLIETASSLVKNAIQLSI (SEQ ID N.º:55)
AKAP-Lbc
LIEEAASRIVDAVIEQVK (SEQ ID N.º:56)

25

AKAP específicos de RI

[0173]

30

AKAPce
alyqfadrfselvisal (SEQ ID N.º:57)
RIAD
leqvanqladqiikeat (SEQ ID N.º:58)
pv38
feelawkiakmiwsdvf (SEQ ID N.º:59)

35

AKAP de doble especificidad

40

[0174]

akap7
elvriskrivenavlkav (SEQ ID N.º:60)
map2d
taeevsarivqvtaeav (SEQ ID N.º:61)
dakap1
qikqaafqlisqvileat (SEQ ID N.º:62)
Dakap2
lawkiakmivsdvmqq (SEQ ID N.º:63)

45

50

[0175] Stokka et al. (2006, Biochem J 400:493-99) también desarrollaron péptidos competidores de la unión de AKAP a PKA, mostrados en SEQ ID NO:64-66. Los péptidos antagonistas se designaron como Ht31 (SEQ ID NO:64), RIAD (SEQ ID NO:65) y PV-38 (SEQ ID N.º:66). El péptido Ht-31 mostró una mayor afinidad por la isoforma RII de la PKA, mientras que el RIAD y el PV-38 mostraron una mayor afinidad por la RI.

55

Ht31
DLIEEAASRIVDAVIEQVKAAGAY (SEQ ID N°:64)
RIAD
LEQYANQLADQIIKEATE (SEQ ID N°:65)
PV-38
FEELAWKIAKMIWSDVFQQC (SEQ ID N°:66)

60

65

[0176] Hundsrucker et al. (2006, Biochem J 396:297-306) desarrollaron otros péptidos competidores de la unión de AKAP a PKA, con una constante de unión tan baja como 0,4 nM a la DDD de la forma RII de PKA. Las secuencias de varios péptidos antagonistas de AKAP se proporcionan en la Tabla 1 de Hundsrucker et al., reproducida en la **Tabla 4** a continuación. AKAPIS representa un péptido sintético de unión a la subunidad RII. Todos los demás péptidos se derivan de los dominios de unión a RII de los AKAP indicados.

Tabla 4. Secuencias peptídicas AKAP

		Secuencia peptídica
5	AKAPIS	QIEYLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO:3)
	AKAPIS-P	QIEYLAKQIPDNAIQQA (SEQ ID NO:67)
	H131	KGADLIEEAASRIVDAVIEQVKAAG (SEQ ID NO:68)
	H131-P	KGADLIEEAASRIPDAPIEQVKAAG (SEQ ID NO:69)
10	AKAP76-wt-pep	PEDAELVRLSKRLVENAVLKAVQQY (SEQ ID NO:70)
	AKAP76-L304T-pep	PEDAELVRTSKRLVENAVLKAVQQY (SEQ ID NO:71)
	AKAP76-L308D-pep	PEDAELVRLSKRDVENAVLKAVQQY (SEQ ID NO:72)
	AKAP76-P-pep	PEDAELVRLSKRLPENAVLKAVQQY (SEQ ID NO:73)
	AKAP76-PP-pep	PEDAELVRLSKRLPENAPLKAVQQY (SEQ ID NO:74)
	AKAP76-L314E-pep	PEDAELVRLSKRLVENAVEKAVQQY (SEQ ID NO:75)
15	AKAP1-pep	EEGLDRNEEIKRAAFQIISQVISEA (SEQ ID NO:76)
	AKAP2-pep	LYDDPLEYQAGLLVQNAIQQAIAEQ (SEQ ID NO:77)
	AKAP5-pep	QYETLLIETASSLVKNALQLSIEQL (SEQ ID NO:78)
	AKAP9-pep	LEKQYQEQLEEEVAKVIVSMSIAFA (SEQ ID NO:79)
20	AKAP10-pep	NTDEAQEELAWKIAKMIVSDIMQQA (SEQ ID NO:80)
	AKAP11-pep	VNLDKKAYLAEKIVAEAEKAEREL (SEQ ID NO:81)
	AKAP12-pep	NGILELETKSSKLVQNIQTAVDCF (SEQ ID NO:82)
	AKAP14-pep	TQDKNYEDELTOVALALVEDVINYA (SEQ ID NO:83)
	Rab32-pep	ETSAKONINIEEAARFLVEKILVNH (SEQ ID NO:84)

25

[0177] Los residuos altamente conservados entre los dominios AD de diferentes proteínas AKAP se indican a continuación mediante subrayado con referencia a la secuencia AKAP IS (SEQ ID N.º:3). Los residuos son los mismos que los observados por Alto et al. (2003), con la adición del residuo de alanina C-terminal. (Véase FIG. 4 de Hundsrucker et al. (2006).) Las secuencias de péptidos antagonistas con afinidades particularmente altas para la secuencia DDD de RII fueron las de AKAP-IS, AKAP76-wt-pep, AKAP76-L304T-pep y AKAP76-L308D-pep.

30

AKAP-IS
QIEYLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID N.º:3)

35

[0178] Carr et al. (2001, J Biol Chem 276:17332-38) examinaron el grado de homología de secuencia entre diferentes secuencias DDD de unión a AKAP de proteínas humanas y no humanas e identificaron residuos en las secuencias DDD que parecían ser los más altamente conservados entre diferentes moléculas DDD. A continuación se indican mediante subrayado con referencia a la secuencia PKA RIIα DDD humana de SEQ ID N.º: Los residuos especialmente conservados se indican además en cursiva. Los residuos coinciden, pero no son idénticos, a los sugeridos por Kinderman et al. (2006) es importante para la unión a las proteínas AKAP. El experto se dará cuenta de que al diseñar variantes de secuencia de DDD, sería preferible evitar cambiar los residuos más conservados (en cursiva), y sería preferible evitar también cambiar los residuos conservados (subrayados), mientras que se pueden considerar sustituciones conservadoras de aminoácidos para los residuos que no están ni subrayados ni en cursiva.

40

SHIQ/PPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID N.º: 1)

45

[0179] Un conjunto modificado de sustituciones conservadoras de aminoácidos para el DDD1 (SEQ ID N.º: 1) secuencia, basada en los datos de Carr et al. (2001) se muestra en la **Tabla 5**. Incluso con este conjunto reducido de secuencias sustituidas, hay más de 65.000 posibles secuencias alternativas de fracción DDD que pueden ser producidas, probadas y utilizadas por el experto sin experimentación indebida. El experto podría derivar fácilmente tales secuencias de aminoácidos DDD alternativas como las divulgadas anteriormente para la **Tabla 2** y la **Tabla 3**.

50

Tabla 5 Sustituciones de Aminoácido Conservador en DDD1 (SEQ ID NO: 1). Secuencia de consenso divulgada como SEQ ID NO: 89.

S	H	I	Q	I	P	P	G	L	T	E	L	L	Q	G	Y	T	V	E	V	L	R
T			N						S								I				
																	L				
																	A				

Q	Q	P	P	D	L	V	E	F	A	V	E	Y	F	T	R	L	R	E	A	R	A
N										I	D			S	K		K		L		L
										L									I		I
										A									V		V

[0180] El experto se dará cuenta de que estas y otras sustituciones de aminoácidos en las secuencias de aminoácidos DDD o AD pueden utilizarse para producir especies alternativas dentro del género de las moléculas AD o DDD, utilizando técnicas que son estándar en el campo y sólo experimentación rutinaria.

Sustitución de Aminoácidos

[0181] Alternativamente, los métodos y composiciones divulgados pueden implicar la producción y uso de proteínas o péptidos con uno o más residuos de aminoácidos sustituidos. Por ejemplo, las secuencias DDD y/o AD utilizadas para hacer constructos DNL™ pueden modificarse como se ha comentado anteriormente.

[0182] El experto será consciente de que, en general, las sustituciones de aminoácidos implican típicamente la sustitución de un aminoácido por otro aminoácido de propiedades relativamente similares (es decir, sustituciones de aminoácidos conservadoras). Las propiedades de los distintos aminoácidos y el efecto de la sustitución de aminoácidos en la estructura y función de las proteínas han sido objeto de amplios estudios y conocimientos en la técnica.

[0183] Por ejemplo, puede considerarse el índice hidropático de los aminoácidos (Kyte & Doolittle, 1982, J. Mol. Biol., 157:105-132). El carácter hidropático relativo del aminoácido contribuye a la estructura secundaria de la proteína resultante, que a su vez define la interacción de la proteína con otras moléculas. A cada aminoácido se le ha asignado un índice hidropático en función de sus características de hidrofobicidad y carga (Kyte & Doolittle, 1982), estos son: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cistina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); y arginina (-4,5). Al hacer sustituciones conservadoras, se prefiere el uso de aminoácidos cuyos índices hidropáticos estén dentro de ± 2 , dentro de ± 1 son más preferidos, y dentro de $\pm 0,5$ son aún más preferidos.

[0184] La sustitución de aminoácidos también puede tener en cuenta la hidrofiliidad del residuo de aminoácido (por ejemplo, Pat. de EE. UU. N° 4.554.101). Se han asignado valores de hidrofiliidad a los residuos de aminoácidos: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0); glutamato (+3,0); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (-0,4); prolina (-0,5,+,-,1); alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5); triptófano (-3,4). Se prefiere la sustitución de aminoácidos por otros de hidrofiliidad similar.

[0185] Otras consideraciones incluyen el tamaño de la cadena lateral del aminoácido. Por ejemplo, generalmente no sería preferible sustituir un aminoácido con una cadena lateral compacta, como la glicina o la serina, por un aminoácido con una cadena lateral voluminosa, como el triptófano o la tirosina. También hay que tener en cuenta el efecto de los distintos residuos de aminoácidos en la estructura secundaria de las proteínas. Mediante estudios empíricos, se ha determinado el efecto de diferentes residuos de aminoácidos sobre la tendencia de los dominios proteicos a adoptar una estructura secundaria alfa-hélice, beta-hoja o de giro inverso, y es conocido en la técnica (véase, por ejemplo, Chou & Fasman, 1974, Biochemistry, 13:222-245; 1978, Ann. Rev. Biochem., 47: 251-276; 1979, Biophys. J., 26:367-384).

[0186] Basándose en tales consideraciones y en un amplio estudio empírico, se han construido tablas de sustituciones conservadoras de aminoácidos que son conocidas en la técnica. Por ejemplo: arginina y lisina; glutamato y aspartato; serina y treonina; glutamina y asparagina; y valina, leucina e isoleucina. Alternativamente: Ala (A) leu, ile, val; Arg (R) gln, asn, lys; Asn (N) his, asp, lys, arg, gln; Asp (D) asn, glu; Cys (C) ala, ser; Gln (Q) glu, asn; Glu (E) gln, asp; Gly (G) ala; His (H) asn, gln, lys, arg; Ile (I) val, met, ala, phe, leu; Leu (L) val, met, ala, phe, ile; Lys (K) gln, asn, arg; Met (M) phe, ile,

leu; Phe (F) leu, val, ile, ala, tyr; Pro (P) ala; Ser (S), thr; Thr (T) ser; Trp (W) phe, tyr; Tyr (Y) trp, phe, thr, ser; Val (V) ile, leu, met, phe, ala.

[0187] Otras consideraciones para las sustituciones de aminoácidos incluyen si el residuo está localizado o no en el interior de una proteína o si está expuesto a disolventes. Para los residuos interiores, las sustituciones conservadoras incluirían: Asp y Asn; Ser y Thr; Ser y Ala; Thr y Ala; Ala y Gly; Ile y Val; Val y Leu; Leu e Ile; Leu y Met; Phe y Tyr; Tyr y Trp. (Véase, por ejemplo, el sitio web PROWL en rockefeller.edu) Para los residuos expuestos a disolventes, las sustituciones conservadoras incluirían: Asp y Asn; Asp y Glu; Glu y Gln; Glu y Ala; Gly y Asn; Ala y Pro; Ala y Gly; Ala y Ser; Ala y Lys; Ser y Thr; Lys y Arg; Val y Leu; Leu e Ile; Ile y Val; Phe y Tyr. (Id.) Se han construido varias matrices para ayudar en la selección de sustituciones de aminoácidos, como la matriz de puntuación PAM250, la matriz Dayhoff, la matriz Grantham, la matriz McLachlan, la matriz Doolittle, la matriz Henikoff, la matriz Miyata, la matriz Fitch, la matriz Jones, la matriz Rao, la matriz Levin y la matriz Risler (*Idem.*)

[0188] Al determinar las sustituciones de aminoácidos, también se puede considerar la existencia de enlaces intermoleculares o intramoleculares, como la formación de enlaces iónicos (puentes salinos) entre residuos cargados positivamente (por ejemplo, His, Arg, Lys) y residuos cargados negativamente (por ejemplo, Asp, Glu) o enlaces disulfuro entre residuos de cisteína cercanos.

[0189] Los métodos de sustitución de cualquier aminoácido por cualquier otro aminoácido en una secuencia de proteína codificada son bien conocidos y una cuestión de experimentación rutinaria para el experto, por ejemplo mediante la técnica de mutagénesis dirigida al sitio o por síntesis y ensamblaje de oligonucleótidos que codifican una sustitución de aminoácido y empalme en un constructo de vector de expresión.

Agentes terapéuticos

[0190] En realizaciones de la invención como se define en las reivindicaciones, pueden utilizarse agentes terapéuticos como agentes citotóxicos, agentes antiangiogénicos, agentes proapoptóticos, antibióticos, hormonas, antagonistas hormonales, quimiocinas, fármacos, profármacos, toxinas, enzimas u otros agentes, ya sea conjugados con los bsAbs, ADCs y/o anticuerpos sujetos o administrados por separado antes, simultáneamente con o después de los bsAbs, ADCs y/o anticuerpos. Los fármacos de uso pueden poseer una propiedad farmacéutica seleccionada del grupo que consiste en agentes antimetabólicos, anticinasas, alquilantes, antimetabolitos, antibióticos, alcaloides, antiangiogénicos, proapoptóticos y combinaciones de los mismos.

[0191] Los fármacos ejemplares de uso pueden incluir, entre otros, 5-fluorouracilo, afatinib, aplidina, azaribina, anastrozol, antraciclina, axitinib, AVL-101, AVL-291, bendamustina, bleomicina, bortezomib, bosutinib, briostatina-1, busulfán, calicheamicina, camptotecina, carboplatino, 10-hidroxicamptotecina, carmustina, celebrex, clorambucil, cisplatino (CDDP), inhibidores de Cox-2, irinotecán (CPT-11), SN-38, carboplatino, cladribina, camptotecanos, crizotinib, ciclofosfamida, citarabina, dacarbazina, dasatinib, dinaciclib, docetaxel, dactinomicina, daunorrubicina, doxorubicina, 2-pirrolinodoxorrubicina (2P-DOX), ciano-morfolino doxorubicina, glucurónido de doxorubicina, glucurónido de epirubicina, erlotinib, estramustina, epidilofitoxina, erlotinib, entinostat, agentes de unión a receptores de estrógenos, etopósido (VP16), glucurónido de etopósido, fosfato de etopósido, exemestano, fingolimod, floxuridina (FUDR), 3',5'-O-dioleoyl-FudR (FUDR-dO), fludarabina, flutamida, inhibidores de la farnesil-proteína transferasa, flavopiridol, fostamatinib, ganetespib, GDC-0834, GS-1101, gefitinib, gemcitabina, hidroxiurea, ibrutinib, idarubicina, idelalisib, ifosfamida, imatinib, L-asparaginasa, lapatinib, lenolidamida, leucovorina, LFM-A13, lomustina, mecloretamina, melfalán, mercaptopurina, 6-mercaptopurina, metotrexato, mitoxantrona, mitramicina, mitomicina, mitotano, navelbina, neratinib, nilotinib, nitrosurea, olaparib, plicomicina, procarbazona, paclitaxel, PCI-32765, pentostatina, PSI-341, raloxifeno, semustina, sorafenib, estreptozocina, SU11248, sunitinib, tamoxifeno, temazolomida (una forma acuosa de DTIC), transplatino, talidomida, tioguanina, tiotepa, tenipósido, topotecán, mostaza uracilo, vatalanib, vinorelbina, vinblastina, vincristina, alcaloides de la vinca y ZD1839.

[0192] Las toxinas de uso pueden incluir ricina, abrina, toxina alfa, saporina, ribonucleasa (RNasa), por ejemplo, oncinasa, DNasa I, enterotoxina *estafilocócica-A*, proteína antiviral pokeweed, gelonina, toxina diftérica, exotoxina de *Pseudomonas* y endotoxina de *Pseudomonas*.

[0193] Las quimiocinas de uso pueden incluir RANTES, MCAF, MIP1-alfa, MIP1-Beta e IP-10.

[0194] En ciertas realizaciones, agentes antiangiogénicos, como angiostatina, baculostatina, canstatina, maspin, anticuerpos anti-VEGF, péptidos y anticuerpos anti-PIGF, anticuerpos anti-factor de crecimiento vascular, anticuerpos anti-Flk-1 anticuerpos y péptidos anti-Flt-1, anticuerpos anti-Kras, anticuerpos anti-cMET, anticuerpos anti-MIF (factor inhibidor de la migración de macrófagos), péptidos de laminina, péptidos de fibronectina, inhibidores del activador del plasminógeno, inhibidores de la metaloproteínasa tisular, interferones, interleucina-12, IP-10, Gro-β, trombospondina, 2-metoxiestradiol, proteína relacionada con la proliferina, carboxiamidotriazol, CM101, Marimastat, polisulfato de pentosano, angiopoyetina-2, interferón-alfa, herbimicina A, PNU145156E, fragmento de prolactina 16K, linomida (roquinimex), talidomida, pentoxifilina, genisteína, TNP-470, endostatina, paclitaxel, accutina, angiostatina, cidofovir, vincristina, bleomicina, AGM-1470, factor plaquetario 4 o minociclina.

- [0195]** Los inmunomoduladores de uso pueden seleccionarse entre una citocina, un factor de crecimiento de células madre, una linfoxina, un factor hematopoyético, un factor estimulante de colonias (CSF), un interferón (IFN), eritropoyetina, trombopoyetina y una combinación de los mismos. Son específicamente útiles las linfoxinas, como el factor de necrosis tumoral (TNF), los factores hematopoyéticos, como la interleucina (IL), el factor estimulante de colonias, como el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) o el factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF), el interferón, como los interferones- α , β o λ , y el factor de crecimiento de células madre, como el denominado "factor S1". Entre las citocinas se incluyen hormonas de crecimiento como la hormona de crecimiento humana, la hormona de crecimiento humana N-metionil y la hormona de crecimiento bovina; hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorelaxina; hormonas glucoproteicas como la hormona foliculoestimulante (FSH), la hormona estimulante de la tiroides (TSH) y la hormona luteinizante (LH); factor de crecimiento hepático; prostaglandina, factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario, proteína OB; factor de necrosis tumoral- α y β ; sustancia inhibidora de la mulleriana; péptido asociado a la gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nervioso como NGF- β ; factor de crecimiento plaquetario; factores de crecimiento transformantes (TGF) como TGF- α y TGF- β ; factor de crecimiento similar a la insulina-I y -II; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductores; interferones como interferón- α , β y γ ; factores estimulantes de colonias (CSFs) como el macrophage-CSF (M-CSF); interleucinas (ILs) como IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-21, IL-25, LIF, kit-ligando o FLT-3, angiostatina, trombospondina, endostatina, factor de necrosis tumoral y LT.
- [0196]** Radionucleidos de uso incluyen, pero no se limitan a: ^{111}In , ^{177}Lu , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{211}At , ^{62}Cu , ^{67}Cu , ^{90}Y , ^{125}I , ^{131}I , ^{32}P , ^{33}P , ^{47}Sc , ^{111}Ag , ^{67}Ga , ^{142}Pr , ^{153}Sm , ^{161}Tb , ^{166}Dy , ^{166}Ho , ^{186}Re , ^{88}Re , ^{189}Re , ^{212}Pb , ^{223}Ra , ^{225}Ac , ^{59}Fe , ^{75}Se , ^{77}As , ^{89}Sr , ^{99}Mo , ^{105}Rh , ^{109}Pd , ^{143}Pr , ^{149}Pm , ^{169}Er , ^{194}Ir , ^{198}Au , ^{199}Au , ^{211}Pb , y ^{227}Th . El radionucleido terapéutico tiene preferentemente una energía de desintegración en el rango de 20 a 6.000 keV, preferentemente en los rangos de 60 a 200 keV para un emisor Auger, 100-2.500 keV para un emisor beta, y 4.000-6.000 keV para un emisor alfa. Las energías máximas de desintegración de los nucleidos emisores de partículas beta útiles son preferiblemente de 20-5.000 keV, más preferiblemente de 100-4.000 keV, y más preferiblemente de 500-2.500 keV. También se prefieren los radionucleidos que decaen sustancialmente con partículas emisoras Auger. Por ejemplo, Co-58, Ga-67, Br-80m, Tc-99m, Rh-103m, Pt-109, In-111, Sb-119, I-125, Ho-161, Os-189m e Ir-192. Las energías de desintegración de los nucleidos emisores de partículas beta útiles son preferiblemente <1.000 keV, más preferiblemente <100 keV, y más preferiblemente <70 keV. También se prefieren los radionucleidos que decaen sustancialmente con generación de partículas alfa. Tales radionucleidos incluyen, pero no se limitan a: Dy-152, At-211, Bi-212, Ra-223, Rn-219, Po-215, Bi-211, Ac-225, Fr-221, At-217, Bi-213, Th-227 y Fm-255. Las energías de desintegración de los radionucleidos emisores de partículas alfa útiles son preferiblemente de 2.000-10.000 keV, más preferiblemente de 3.000-8.000 keV, y más preferiblemente de 4.000-7.000 keV. Otros posibles radioisótopos de uso son ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{75}Br , ^{198}Au , ^{224}Ac , ^{126}I , ^{133}I , ^{77}Br , $^{113\text{m}}\text{In}$, ^{95}Ru , ^{97}Ru , ^{103}Ru , ^{105}Ru , ^{107}Hg , ^{203}Hg , $^{121\text{m}}\text{Te}$, $^{122\text{m}}\text{Te}$, $^{125\text{m}}\text{Te}$, ^{165}Tm , ^{167}Tm , ^{168}Tm , ^{197}Pt , ^{109}Pd , ^{105}Rh , ^{142}Pr , ^{143}Pr , ^{161}Tb , ^{166}Ho , ^{199}Au , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{51}Cr , ^{59}Fe , ^{75}Se , ^{201}Ti , ^{225}Ac , ^{76}Br , ^{169}Yb , y similares. Algunos nucleidos diagnósticos útiles pueden incluir ^{18}F , ^{52}Fe , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{86}Y , ^{89}Zr , ^{94}Tc , $^{94\text{m}}\text{Tc}$, $^{99\text{m}}\text{Tc}$, o ^{111}In .
- [0197]** Los agentes terapéuticos pueden incluir un agente fotoactivo o un colorante. Las composiciones fluorescentes, como los fluorocromos, y otros cromógenos o colorantes, como las porfirinas sensibles a la luz visible, se han utilizado para detectar y tratar lesiones dirigiendo la luz adecuada a la lesión. En terapia, esto se ha denominado fotorradiación, fototerapia o terapia fotodinámica. Véase Jori et al. (eds.), *PHOTODYNAMIC THERAPY OF TUMORS AND OTHER DISEASES* (Libreria Progetto 1985); van den Bergh, *Chem. Gran Bretaña* (1986), 22:430. Además, se han acoplado anticuerpos monoclonales con tintes fotoactivados para lograr la fototerapia. Véase Mew et al., *J. Immunol.* (1983), 130:1473; ídem, *Cancer Res.* (1985), 45:4380; Oseroff et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1986), 83:8744; ídem., *Photochem. Photobiol.* (1987), 46:83; Hasan et al., *Prog. Clin. Biol. Res.* (1989), 288:471; Tatsuta et al., *Lasers Surg. Med.* (1989), 9:422; Pelegrin et al., *Cancer* (1991), 67:2529.
- [0198]** Otros agentes terapéuticos útiles pueden comprender oligonucleótidos, especialmente oligonucleótidos antisentido que preferentemente se dirigen contra oncogenes y productos de oncogenes, como bcl-2 o p53. Una forma preferida de oligonucleótido terapéutico es el ARNsi. El experto comprenderá que cualquier especie de ARNsi o ARN de interferencia puede unirse a un anticuerpo o fragmento del mismo para su administración a un tejido diana. Se conocen en la técnica muchas especies de ARNsi contra una amplia variedad de dianas, y cualquiera de estos ARNsi conocidos puede utilizarse en los métodos y composiciones reivindicados.
- [0199]** Entre las especies de ARNsi conocidas de uso potencial se incluyen las específicas para IKK-gamma (Patente de EE. UU. 7.022.828); VEGF, Flt-1 y Flk-1/KDR (Patente de EE. UU. 7.148.342); Bcl2 y EGFR (Patente de EE. UU. 7.541.453); CDC20 (Patente de EE. UU. 7.550.572); transducina (beta)-similar 3 (Patente de EE. UU. 7.576.196); KRAS (Patente de EE. UU. 7.576.197); anhidrasa carbónica II (Patente de EE. UU. 7.579.457); componente 3 del complemento (Patente de EE. UU. 7.582.746); quinasa-4 asociado al receptor de interleuquina-1 (IRAK4) (Patente de EE. UU. 7.592.443); survivina (Patente de EE. UU. 7.608.7070); superóxido dismutasa 1 (Patente de EE. UU. 7.632.938); protooncogén MET (Patente de EE. UU. 7.632.939); proteína precursora de beta amiloide (APP) (Patente de EE. UU. 7.635.771); IGF-1R (Patente de EE. UU. 7.638.621); ICAM1 (Patente de EE. UU. 7.642.349); factor B del complemento (Patente de EE. UU. 7.696.344); p53 (7.781.575), y apolipoproteína B (7.795.421).

[0200] Otras especies de ARNsi están disponibles en fuentes comerciales conocidas, como Sigma-Aldrich (St Louis, MO), Invitrogen (Carlsbad, CA), Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), Ambion (Austin, TX), Dharmacon (Thermo Scientific, Lafayette, CO), Promega (Madison, WI), Mirus Bio (Madison, WI) y Qiagen (Valencia, CA), entre muchas otras. Otras fuentes públicas de especies de ARNsi son la base de datos ARNsidb del Centro Bioinformático de Estocolmo, la base de datos de ARNsi del MIT/ICBP, la biblioteca de ARNsh del ARNi Consortium del Instituto Broad y la base de datos de sondas del NCBI. Por ejemplo, hay 30.852 especies de ARNsi en la base de datos NCBI Probe. El experto se dará cuenta de que, para cualquier gen de interés, ya se ha diseñado una especie de ARNsi o se puede diseñar fácilmente una utilizando herramientas de software disponibles públicamente. Cualquiera de estas especies de ARNsi puede administrarse utilizando los complejos DNL™ en cuestión.

Métodos de tratamiento terapéutico

[0201] En una realización de la invención como se define en las reivindicaciones, el sujeto es un mamífero, incluyendo humanos, mascotas domésticas o de compañía, como perros y gatos, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una combinación de agentes citotóxicos y/o inmunomoduladores.

[0202] La administración de los bsAbs citotóxicos, ADCs y/o anticuerpos inhibidores de puntos de control puede complementarse administrando concurrente o secuencialmente una cantidad terapéuticamente eficaz de otro anticuerpo que se une o es reactivo con otro antígeno en la superficie de la célula diana. Los MAb adicionales preferidos comprenden al menos un MAb humanizado, quimérico o humano seleccionado del grupo que consiste en un MAb reactivo con CD4, CD5, CD8, CD14, CD15, CD16, CD19, IGF-1R, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD30, CD32b, CD33, CD37, CD38, CD40, CD40L, CD45, CD46, CD52, CD54, CD70, CD74, CD79a, CD79b, CD80, CD95, CD126, CD133, CD138, CD154, CEACAM5, CEACAM6, B7, AFP, PSMA, EGP-1, EGP-2, anhidrasa carbónica IX, antígeno PAM4, MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5, la, MIF, HM1.24, HLA-DR, tenascina, Flt-3, VEGFR, PIGF, ILGF, IL-6, IL-25, tenascina, TRAIL-R1, TRAIL, R2, factor de complemento C5, producto oncogénico, o una combinación de los mismos. Diversos anticuerpos de uso, como los anticuerpos anti-CD19, anti-CD20 y anti-CD22, son conocidos por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Ghetie et al., Cancer Res. 48:2610 (1988); Hekman et al., Cancer Immunol. Immunother. 32:364 (1991); Longo, Curr. Opin. Oncol. 8:353 (1996), U.S. Patentes de EE.UU. N.º 5,798,554; 6,187,287; 6,306,393; 6,676,924; 7,109,304; 7,151,164; 7,230,084; 7,230,085; 7,238,785; 7,238,786; 7,282,567; 7,300,655; 7,312,318; 7,501,498; 7,612,180; 7,670,804; y Patente de EE. UU. N.º 20080131363; 20070172920; 20060193865; y 20080138333.

[0203] La terapia combinada puede complementarse además con la administración, concurrente o secuencial, de al menos un agente terapéutico. Por ejemplo, "CVB" (1,5 g/m² de ciclofosfamida, 200-400 mg/m² de etopósido y 150-200 mg/m² de carmustina) es un régimen utilizado para tratar el linfoma no Hodgkin. Patti et al., Eur. J. Haematol. 51: 18 (1993). Otros regímenes quimioterapéuticos combinados adecuados son bien conocidos por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Freedman et al., "Non-Hodgkin's Lymphomas", en CANCER MEDICINE,). A modo de ejemplo, los regímenes quimioterapéuticos de primera generación para el tratamiento del linfoma no Hodgkin (LNH) de grado intermedio incluyen C-MOPP (ciclofosfamida, vincristina, procarbazona y prednisona) y CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona). Un régimen quimioterapéutico de segunda generación útil es el m-BACOD (metotrexato, bleomicina, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina, dexametasona y leucovorina), mientras que un régimen de tercera generación adecuado es el MACOP-B (metotrexato, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina, prednisona, bleomicina y leucovorina). Otros fármacos útiles son el fenilbutirato, la bendamustina y la briostatina-1.

[0204] Las combinaciones de agentes terapéuticos pueden formularse según métodos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles, en las que el bsAb, el ADC, el interferón y/o el anticuerpo inhibidor de puntos de control se combinan en una mezcla con un excipiente farmacéuticamente adecuado. La solución salina estéril tamponada con fosfato es un ejemplo de excipiente farmacéuticamente adecuado. Otros excipientes adecuados son bien conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Ansel et al., PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, 5ª edición (Lea & Febiger 1990), y Gennaro (ed.), REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18ª edición (Mack Publishing Company 1990), y sus ediciones revisadas.

[0205] Los bsAbs, ADCs, interferones y/o anticuerpos sujetos pueden formularse para administración intravenosa mediante, por ejemplo, inyección en bolo o infusión continua. Preferiblemente, el bsAb, ADC y/o anticuerpo se infunde durante un periodo inferior a unas 4 horas, y más preferiblemente, durante un periodo inferior a unas 3 horas. Por ejemplo, el primer bolo podría infundirse en 30 minutos, preferiblemente incluso en 15 minutos, y el resto en las 2-3 horas siguientes. Las formulaciones inyectables pueden presentarse en forma de dosis unitaria, por ejemplo, en ampollas o en envases multidosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden adoptar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes formuladores tales como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersión. Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos, antes de su uso.

[0206] Pueden emplearse métodos farmacéuticos adicionales para controlar la duración de la acción de las combinaciones terapéuticas. Las preparaciones de liberación controlada pueden prepararse mediante el uso de polímeros para complexar o adsorber los agentes que se van a administrar. Por ejemplo, los polímeros biocompatibles incluyen matrices de poli(etileno-co-acetato de vinilo) y matrices de un copolímero polianhídrido de un dímero de ácido esteárico y

ácido sebácico. Sherwood et al., *Bio/Technology* 10: 1446 (1992). La velocidad de liberación de una matriz de este tipo depende del peso molecular del agente terapéutico, la cantidad de agente dentro de la matriz y el tamaño de las partículas dispersas. Saltzman et al., *Biophys. J.* 55: 163 (1989); Sherwood *et al.*, *supra*. Otras formas farmacéuticas sólidas se describen en Ansel et al., *PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS*, 5ª Edición (Lea & Febiger 1990), y Gennaro (ed.), *REMGINTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES*, 18ª Edición (Mack Publishing Company 1990), y sus ediciones revisadas.

[0207] Los bsAbs, interferones y/o anticuerpos inhibidores de puntos de control pueden administrarse a un mamífero por vía subcutánea o incluso por otras vías parenterales, como por vía intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o intravascular. Los ADC pueden administrarse por vía intravenosa, intraperitoneal o intravascular. Además, la administración puede ser por infusión continua o por bolos únicos o múltiples. Preferiblemente, el bsAb, ADC, interferón y/o anticuerpo inhibidor de puntos de control se infunde durante un periodo inferior a unas 4 horas, y más preferiblemente, durante un periodo inferior a unas 3 horas.

[0208] Más generalmente, la dosificación de un bsAb, ADC, interferón y/o anticuerpo inhibidor de punto de control administrado para humanos variará dependiendo de factores tales como la edad, peso, altura, sexo, condición médica general e historial médico previo del paciente. Puede ser deseable proporcionar al receptor una dosis de bsAb, ADC y/o anticuerpo que esté en el intervalo de aproximadamente 1 mg/kg a 25 mg/kg como infusión intravenosa única, aunque también puede administrarse una dosis menor o mayor según dicten las circunstancias. Una dosis de 1-20 mg/kg para un paciente de 70 kg, por ejemplo, es de 70-1.400 mg, o 41-824 mg/m² para un paciente de 1,7 m. La dosis puede repetirse según sea necesario, por ejemplo, una vez a la semana durante 4-10 semanas, una vez a la semana durante 8 semanas o una vez a la semana durante 4 semanas. También puede administrarse con menos frecuencia, por ejemplo cada dos semanas durante varios meses, o mensual o trimestralmente durante muchos meses, según sea necesario en una terapia de mantenimiento.

[0209] Alternativamente, un bsAb, ADC y/o anticuerpo inhibidor de punto de control puede administrarse como una dosis cada 2 o 3 semanas, repetida para un total de al menos 3 dosis. O bien, la combinación puede administrarse dos veces por semana durante 4-6 semanas. Si la dosis se reduce a aproximadamente 200-300 mg/m² (340 mg por dosis para un paciente de 1,7 m, o 4,9 mg/kg para un paciente de 70 kg), puede administrarse una o incluso dos veces por semana durante 4 a 10 semanas. Alternativamente, se puede disminuir la pauta de dosificación, a saber, cada 2 ó 3 semanas durante 2-3 meses. Sin embargo, se ha determinado que incluso dosis más altas, como 20 mg/kg una vez por semana o una vez cada 2-3 semanas, pueden administrarse mediante infusión i.v. lenta, para ciclos de dosificación repetidos. La pauta de dosificación puede repetirse opcionalmente a otros intervalos y la dosis puede administrarse por diversas vías parenterales, con el ajuste adecuado de la dosis y la pauta.

[0210] La persona con conocimientos ordinarios se dará cuenta de que mientras que los esquemas de dosificación discutidos anteriormente son relevantes para ADCs, bsAbs y/o mAbs, los agentes de interferón deben administrarse a dosis sustancialmente más bajas para evitar la toxicidad sistémica. Las dosis de interferones (como el PEGINTERFERON) para humanos suelen estar en el intervalo de los microgramos, por ejemplo 180 µg c.s. una vez por semana, o de 100 a 180 µg, o 135 µg, o 135 µg/1,73 m², o 90 µg/1.73 m², o 250 µg c.s. en días alternos, dependiendo del tipo de interferón.

[0211] Mientras que los bsAbs, interferones, ADCs y/o anticuerpos inhibidores de puntos de control pueden administrarse como una inyección periódica en bolo, en realizaciones alternativas los bsAbs, ADCs, interferones y/o anticuerpos inhibidores de puntos de control pueden administrarse mediante infusión continua. Para aumentar la C_{max} y prolongar la PK de los agentes terapéuticos en la sangre, puede administrarse una infusión continua, por ejemplo, mediante un catéter permanente. Tales dispositivos son conocidos en la técnica, como los catéteres HICKMAN®, BROVIAC® o PORT-A-CATH® (véase, por ejemplo, Skolnik et al., *Ther Drug Monit* 32:741-48, 2010) y puede utilizarse cualquier catéter permanente conocido. También se conocen en la técnica diversas bombas de infusión continua y puede utilizarse cualquiera de ellas. El intervalo de dosis para infusión continua puede estar entre 0,1 y 3,0 mg/kg al día. Más preferiblemente, los bsAbs, ADCs, interferones y/o anticuerpos inhibidores de puntos de control pueden administrarse mediante infusiones intravenosas durante periodos relativamente cortos de 2 a 5 horas, más preferiblemente de 2 a 3 horas.

[0212] Ejemplos de tales cánceres se indican a continuación e incluyen: cáncer de células escamosas (por ejemplo, cáncer epitelial de células escamosas), sarcoma de Ewing, tumor de Wilms, astrocitomas, cáncer de pulmón incluido el cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma de pulmón y carcinoma escamoso de pulmón, cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago incluido el cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, glioblastoma multiforme, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, carcinoma hepatocelular, tumores neuroendocrinos, cáncer medular de tiroides, carcinoma diferenciado de tiroides, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer de recto, cáncer de endometrio o carcinoma uterino, carcinoma de glándulas salivales, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer de vulva, carcinoma anal, carcinoma de pene, así como cáncer de cabeza y cuello. El término "cáncer" incluye células o tumores malignos primarios (por ejemplo, aquellos cuyas células no han migrado a sitios del cuerpo del sujeto distintos del sitio de la neoplasia o tumor original) y células o tumores malignos secundarios (por ejemplo, los que surgen de la metástasis, la migración de células malignas o células tumorales a sitios secundarios distintos del sitio del tumor original). Los cánceres propicios para los métodos de tratamiento de la presente invención implican células que expresan,

sobreexpresan o expresan anormalmente IGF-1R.

[0213] Otros ejemplos de cánceres o neoplasias malignas incluyen, pero no se limitan a: Leucemia linfoblástica infantil aguda, Leucemia linfoblástica aguda, Leucemia linfocítica aguda, Leucemia mieloide aguda, Carcinoma corticosuprarrenal, Cáncer hepatocelular (primario) del adulto, Cáncer de hígado (primario) del adulto, Leucemia linfocítica aguda del adulto, Leucemia mieloide aguda del adulto, Linfoma de Hodgkin del adulto, Leucemia linfocítica del adulto, Leucemia no Hodgkin del adulto, Cáncer primario de hígado en adultos, Sarcoma de tejidos blandos en adultos, Linfoma relacionado con el SIDA, Neoplasias malignas relacionadas con el SIDA, Cáncer anal, Astrocitoma, Cáncer de vías biliares, Cáncer de vejiga, Cáncer óseo, Glioma de tronco cerebral, Tumores cerebrales, Cáncer de mama, Cáncer de pelvis renal y uréter, Linfoma (primario) del sistema nervioso central, Linfoma del sistema nervioso central, Astrocitoma cerebeloso, Astrocitoma cerebral, Cáncer de cuello uterino, Cáncer hepatocelular infantil (primario), Cáncer de hígado infantil (primario), Leucemia linfoblástica aguda infantil, Leucemia mieloide aguda infantil, Glioma de tronco encefálico infantil, Astrocitoma cerebeloso infantil, Astrocitoma cerebral infantil, Tumores extracraneales de células germinales infantiles, Enfermedad de Hodgkin infantil, Linfoma de Hodgkin infantil, glioma hipotalámico y de la vía visual infantil, leucemia linfoblástica infantil, meduloblastoma infantil, linfoma no Hodgkins, tumores neuroectodérmicos primitivos pineales y supratentoriales infantiles, cáncer primario de hígado infantil, rhabdomyosarcoma infantil, sarcoma de partes blandas infantil, glioma hipotalámico y de la vía visual infantil, Leucemia linfocítica crónica, Leucemia mielógena crónica, Cáncer de colon, Linfoma cutáneo de células T, Carcinoma endocrino de células de los islotes pancreáticos, Cáncer de endometrio, Ependimoma, Cáncer epitelial, Cáncer de esófago, Sarcoma de Ewing y tumores afines, cáncer de páncreas exocrino, tumor extracraneal de células germinales, tumor extragonadal de células germinales, cáncer de vías biliares extrahepáticas, cáncer ocular, cáncer de mama femenino, enfermedad de Gaucher, cáncer de vesícula biliar, cáncer de próstata, cáncer de próstata, cáncer de próstata, Cáncer de vesícula biliar, Cáncer gástrico, Tumor carcinoide gastrointestinal, Tumores gastrointestinales, Tumores de células germinales, Tumor trofoblástico gestacional, Leucemia de células pilosas, Cáncer de cabeza y cuello, Cáncer hepatocelular, Linfoma de Hodgkin, Hipergammaglobulinemia, Cáncer hipofaríngeo, Cánceres intestinales, Melanoma intraocular, Carcinoma de células de los islotes, Cáncer pancreático de células de los islotes, Sarcoma de Kaposi, Cáncer de riñón, Cáncer de laringe, Cáncer de labio y cavidad oral, Cáncer de hígado, Cáncer de pulmón, Trastornos linfoproliferativos, Macroglobulinemia, Cáncer de mama masculino, Mesotelioma maligno, Timoma maligno, Meduloblastoma, Melanoma, Mesotelioma, Cáncer escamoso primario oculto metastásico de cuello, Cáncer escamoso primario metastásico de cuello, Cáncer escamoso metastásico de cuello, Mieloma múltiple, Mieloma múltiple/Neoplasma de células plasmáticas, Síndrome mielodisplásico, Leucemia mielógena, Leucemia mieloide, Trastornos mieloproliferativos, Cáncer de cavidad nasal y senos paranasales, Cáncer nasofaríngeo, Neuroblastoma, Linfoma no Hodgkin, Linfoma no melanocítico, Cáncer de piel no melanoma, Cáncer de pulmón no microcítico, Cáncer escamoso metastásico primario oculto de cuello, Cáncer orofaríngeo, Sarcoma fibroso osteo/maligno, Osteosarcoma/histiocitoma fibroso maligno, Osteosarcoma/histiocitoma fibroso maligno óseo, Cáncer epitelial de ovario, Tumor de células germinales de ovario, Tumor ovárico de bajo potencial maligno, Cáncer de páncreas, Paraproteinemias, Policitemia vera, Cáncer de paratiroides, Cáncer de pene, Feocromocitoma, Tumor hipofisario, Linfoma primario del sistema nervioso central, Cáncer primario de hígado, Cáncer de próstata, Cáncer de recto, Cáncer de células renales, Cáncer de pelvis renal y de uréter, Retinoblastoma, Rhabdomyosarcoma, Cáncer de Glándulas Salivares, Sarcomas Sarcoidosis, Síndrome de Sezary, Cáncer de Piel, Cáncer de Pulmón de Células Pequeñas, Cáncer de Intestino Delgado, Sarcoma de Tejidos Blandos, Cáncer Escamoso de Cuello, Cáncer de Estómago, Tumores Neuroectodérmicos Primitivos Supratentoriales y Pineales, Linfoma de Células T, Cáncer Testicular, Timoma, Cáncer de tiroides, Cáncer de células transicionales de pelvis renal y uréter, Cáncer transicional de pelvis renal y uréter, Tumores trofoblásticos, Cáncer de células de pelvis renal y uréter, Cáncer de uretra, Cáncer de útero, Sarcoma uterino, Cáncer de vagina, Glioma de la vía visual y glioma hipotalámico, Cáncer de vulva, Macroglobulinemia de Waldenstrom, Tumor de Wilms, y cualquier otra enfermedad hiperproliferativa, además de la neoplasia, localizada en un sistema de órganos de la lista anterior.

[0214] En una realización de la invención como se define en las reivindicaciones, el anticuerpo biespecífico puede usarse para tratar condiciones malignas o premalignas y para prevenir la progresión a un estado neoplásico o maligno, incluyendo pero no limitado a aquellos trastornos descritos anteriormente. Tales usos están indicados en condiciones conocidas o sospechosas de preceder a la progresión a neoplasia o cáncer, en particular, cuando se ha producido un crecimiento celular no neoplásico consistente en hiperplasia, metaplasia o, más particularmente, displasia (para una revisión de tales condiciones de crecimiento anormal, véase Robbins y Angell, Basic Pathology, 2d Ed., W. B. Saunders Co., Philadelphia, pp. 68-79 (1976)).

[0215] La displasia es con frecuencia un precursor del cáncer y se encuentra principalmente en los epitelios. Es la forma más desordenada de crecimiento celular no neoplásico, que implica una pérdida de la uniformidad celular individual y de la orientación arquitectónica de las células. La displasia se produce característicamente cuando existe irritación o inflamación crónica. Los trastornos displásicos que pueden tratarse incluyen, entre otros, la displasia ectodérmica anhidrótica, la displasia anterofacial, la displasia torácica asfixiante, la displasia atriodigital, displasia broncopulmonar, displasia cerebral, displasia cervical, displasia condroectodérmica, displasia cleidocraneal, displasia ectodérmica congénita, displasia craneoidea, displasia craniocarpotarsal, displasia craniometafisaria, displasia dentinaria, displasia diafisaria, displasia ectodérmica, displasia del esmalte, displasia encefalo-oftálmica, displasia epifisaria hemimelia, displasia epifisaria múltiple, displasia epifisaria punctata, displasia epitelial, displasia faciодigitogenital, displasia fibrosa familiar de los maxilares, displasia familiar de pliegues blancos, displasia fibromuscular, displasia fibrosa ósea, displasia ósea florida, displasia renal-retiniana hereditaria, displasia ectodérmica hidrótica, displasia ectodérmica hipohidrótica, displasia tímica linfopénica, displasia mamaria, displasia mandibulofacial, displasia metafisaria, displasia de Mondini,

displasia fibrosa monostótica, displasia mucoepitelial, displasia epifisaria múltiple, displasia oculoauriculovertebral, displasia oculodentodigital, displasia oculovertebral, displasia odontogénica, displasia oftalmomandibulomélica, displasia cementaria periapical, displasia fibrosa polioestótica, displasia espondiloepifisaria pseudoacondroplásica, displasia retiniana, displasia septoóptica, displasia espondiloepifisaria y displasia ventriculorradiar.

[0216] Trastornos pre-neoplásicos adicionales que pueden ser tratados incluyen, pero no se limitan a, trastornos disproliferativos benignos (por ejemplo, tumores benignos, condiciones fibroquísticas, hipertrofia tisular, pólipos o adenomas intestinales y displasia esofágica), leucoplasia, queratosis, enfermedad de Bowen, Piel de Farmer, queratitis solar y queratosis solar.

[0217] En realizaciones preferidas de la invención como se define en las reivindicaciones, el anticuerpo biespecífico se utiliza para inhibir el crecimiento, la progresión y/o la metástasis de cánceres, en particular los enumerados anteriormente.

[0218] Enfermedades, trastornos y/o condiciones hiperproliferativas adicionales incluyen, pero no se limitan a, progresión y/o metástasis de neoplasias malignas y trastornos relacionados tales como leucemia (incluyendo leucemias agudas (p.ej., leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda (incluyendo mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica y eritroleucemia)) y leucemias crónicas (p. ej., leucemia mielocítica crónica (granulocítica) y leucemia linfocítica crónica)), policitemia vera, linfomas (p. ej., enfermedad de Hodgkin y enfermedad no Hodgkin), mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom's macroglobulinemia, heavy chain disease, and solid tumors including, but not limited to, sarcomas and carcinomas such as fibrosarcoma, myxosarcoma, liposarcoma, chondrosarcoma, osteogenic sarcoma, chordoma, angiosarcoma, endotheliosarcoma, lymphangiosarcoma, lymphangioendotheliosarcoma, synovioma, mesothelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rabdomiosarcoma, carcinoma de colon, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de vías biliares, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilm, cáncer de cuello uterino, tumor testicular, carcinoma pulmonar, carcinoma pulmonar microcítico, carcinoma vesical, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, emangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma y retinoblastoma.

Vectores de expresión

[0219] El presente descubrimiento también se refiere a secuencias de ADN que comprenden un ácido nucleico que codifica un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, citoquina o proteína de fusión constituyente de un bsAb, tal como un constructo DNL™. Las proteínas de fusión pueden comprender un anticuerpo o fragmento o citoquina unido, por ejemplo, a una fracción AD o DDD.

[0220] Varios ejemplos se refieren a vectores de expresión que comprenden las secuencias de ADN codificantes. Los vectores pueden contener secuencias que codifican las regiones constantes de las cadenas ligera y pesada y la región bisagra de una inmunoglobulina humana a las que se pueden unir secuencias de región variable quiméricas, humanizadas o humanas. Los vectores pueden contener además promotores que expresen la(s) proteína(s) codificada(s) en una célula huésped seleccionada, potenciadores y secuencias señal o líder. Los vectores especialmente útiles son pdHL2 o GS. Más preferentemente, las regiones constantes de las cadenas ligera y pesada y la región bisagra pueden proceder de una inmunoglobulina humana de mieloma UE, en la que opcionalmente al menos uno de los aminoácidos de las posiciones del alotipo se cambia por el que se encuentra en un alotipo IgG1 diferente, y en la que opcionalmente el aminoácido 253 de la cadena pesada de UE basado en el sistema de número UE puede sustituirse por alanina. Véase Edelman et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 63: 78-85 (1969). En otras realizaciones, una secuencia IgG1 puede convertirse en una secuencia IgG4.

[0221] El experto se dará cuenta de que los métodos de ingeniería genética de constructos de expresión y la inserción en células huésped para expresar proteínas de ingeniería son bien conocidos en el arte y una cuestión de experimentación rutinaria. Las células huésped y los métodos de expresión de anticuerpos o fragmentos clonados se han descrito, por ejemplo, en U.S. Patentes de EE.UU. N.º 7,531,327, 7,537,930, 7,785,880, 8,076,410, 8,153,433 y 8,372,603.

Kits

[0222] La presente divulgación también se refiere a kits que contienen componentes adecuados para tratar o diagnosticar tejido enfermo en un paciente. Los kits ejemplares pueden contener uno o más bsAbs, ADCs, interferones y/o anticuerpos inhibidores de puntos de control como se describe en el presente documento. Si la composición que contiene los componentes para la administración no está formulada para ser administrada a través del canal alimentario, como por vía oral, puede incluirse un dispositivo capaz de administrar los componentes del kit a través de alguna otra vía. Un tipo de dispositivo, para aplicaciones como la administración parenteral, es una jeringa que se utiliza para inyectar la composición en el cuerpo de un sujeto. También pueden utilizarse dispositivos de inhalación. En ciertos ejemplos, un agente terapéutico puede suministrarse en forma de jeringa precargada o pluma de autoinyección que contiene una formulación líquida estéril o una preparación liofilizada.

[0223] Los componentes del kit pueden envasarse juntos o separados en dos o más recipientes. En algunas realizaciones, los recipientes pueden ser viales que contienen formulaciones estériles y liofilizadas de una composición que son adecuadas para la reconstitución. Un kit también puede contener uno o más tampones adecuados para la reconstitución y/o dilución de otros reactivos. Otros recipientes que pueden utilizarse son, entre otros, bolsas, bandejas, cajas, tubos o similares. Los componentes del kit pueden envasarse y mantenerse estériles dentro de los contenedores. Otro componente que puede incluirse son las instrucciones de uso del kit.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Anticuerpo biespecífico DOCK-AND-LOCK redireccionador de células T[™] (DNL[™]) Complejos

[0224] Se fabricaron varias especies de anticuerpos biespecíficos redireccionadores de leucocitos ejemplares como complejos DNL[™], como se describe a continuación. Los complejos fueron eficaces para inducir una respuesta inmunitaria contra las células diana apropiadas, incluidas, entre otras, las células cancerosas Trop-2⁺.

Materiales y Métodos

[0225] Las técnicas generales para fabricar y utilizar complejos DOCK-AND-LOCK[™] (DNL[™]) se describen en los Ejemplos siguientes. Se fabricó un anticuerpo biespecífico redireccionador de leucocitos ejemplar con sitios de unión para CD3 y CD19 como un complejo DNL[™], denominado (19)-3s (**FIG. 1**). Se construyó un módulo DNL anti-CD19 F(ab)₂ mediante la fusión recombinante de un dominio de dimerización y acoplamiento (DDD2) en el extremo carboxilo terminal de la cadena Fd. Se diseñó un módulo anti-CD3-scFv a partir del mAb Okt3 con la adición de un dominio de anclaje (AD2) y se ensambló en el formato V_H-L1-V_K-L2-6H-L3-AD2 ("6H" revelado como SEQ ID N.º: 105), donde los dominios V se fusionaron mediante un engarce peptídico flexible y el péptido AD2 fue precedido por un enlazador 6-His (SEQ ID N.º: 105). Las secuencias de las regiones variables anti-CD3, engarces y AD2 eran las que se muestran a continuación.

Secuencia V_H de scFv anti-CD3

[0226]

QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSR
GYTNYNQKFKDKATLTDDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYSLDYWG
QGTTLTVSS (SEQ ID NO:96)

Engarce L1

[0227]

GGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID N.º:97)

Secuencia V_K de scFv anti-CD3

[0228]

DIVLTQSPAISASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQKSGTSPKRWIYDTSKLASGV
PAHFRGSGSGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEIKR (SEQ
ID NO:98)

Engarce L2

[0229] GGGGS (SEQ ID N.º:99)

Engarce Poly-His-L3

[0230] HHHHHHGGGSG (SEQ ID N.º:100)

AD2

CGQIEYLAKQIVDNAIQQAGC (SEQ ID N.º:101)

[0231] Se construyeron vectores de expresión y módulos DNL™ - complejos DNL™ que comprendían restos de anticuerpos contra diversos antígenos asociados a enfermedades, unidos a un resto de anticuerpos anti-CD3, generalmente abreviados como (X)-3s bsAbs. Se desarrollaron líneas celulares de producción independientes en células de mieloma de ratón SpESFX-10 (Rossi et al., 2011, Biotechnol Prog 27:766-75) para cada uno de los módulos DNL™ utilizados para fabricar los bsAbs (X)-3s. Se sintetizó una secuencia de ADNc que codifica el polipéptido Okt3scFv-AD2 (SEQ ID NOs:96-101) y se clonó en el vector de expresión pdHL2 a través de los sitios de restricción 5' Xba I y 3' Eag I. El constructo comprendía el dominio V_H fusionado al V_L en un scFv con la estructura V_H-L1-V_K-L2-6H-L3-AD2 ("6H" divulgado como SEQ ID N.º:105). La proteína expresada presentaba dos sustituciones de aminoácidos con respecto al mAb Okt3 original. Un residuo de cisteína en la CDR-H3 se cambió por serina (Kipryanov, 1997, J Immunol Methods 200:69-77). El penúltimo residuo de la V_L se cambió de aspartato a lisina.

[0232] El módulo Okt3scFv-AD2 se combinó con varios módulos C_H1-DDD2-Fab para generar un panel de bsAbs trivalentes (X)-3s (Tabla 6). Los vectores de expresión C_H1-DDD2-Fab-pdHL2 se construyeron como se describió anteriormente para constructos similares (Rossi et al., 2008, Cancer Res 68:8384-92). Brevemente, los vectores de expresión que codifican C_H1-DDD2-Fab se generaron a partir de los correspondientes vectores de expresión IgG-pdHL2 extirpando la secuencia codificante de los dominios C_H1-Bisagra-C_H2-C_H3 con las enzimas de restricción Sac II y Eag I y sustituyéndola por una secuencia de 507 pb que codifica C_H1-DDD2, que se extirpó del vector de expresión C_H1-DDD2-Fab-hA20-pdHL2 (Rossi et al., 2008, Cancer Res 68:8384-92) con las mismas enzimas. Los módulos C_H1-DDD2-Fab se derivaron de los mAbs humanizados hA19 (anti-CD19), labetuzumab (hMN-14, anti-CEACAM5), clivatuzumab (hPAM4, anti-mucina), hMN-15 (anti-CEACAM6), hRS7 (anti-TROP-2), veltuzumab (hA20, anti-CD20), hL243 (anti-HLA-DR) y epratuzumab (hLL2, anti-CD22). El mAb designado hA19 se humanizó a partir del mAb anti-CD19 de ratón B43 (Uckun et al., 1988, Blood 71:13-29). Cada vector de expresión se linealizó mediante digestión con la enzima de restricción Sal I y se utilizó para transfectar células SpESFX-10 mediante electroporación.

[0233] Los clones se seleccionaron en medios que contenían 0,2 µM de metotrexato (MTX) y se examinaron para la expresión de proteínas mediante ELISA. Okt3scFv-AD2 se capturó en placas Ni-NTA HisSorb (Qiagen) y se detectó con un mAb anti-AD2. Los módulos C_H1-DDD2-Fab se capturaron con anti-cadena kappa humana de cabra y se detectaron con anti-F(ab')₂-HRP humana de cabra. La productividad de la expresión de la proteína se amplificó mediante aumentos graduales de la concentración de MTX hasta 3 µM. Los módulos Okt3scFv-AD2 y C_H1-DDD2-Fab se purificaron hasta la homogeneidad a partir del caldo de cultivos de frascos rodantes mediante cromatografía de afinidad utilizando resinas Ni-SEPHAROSE® y Kappa-Select, respectivamente. Se utilizó el método DNL™ para ensamblar bsAbs (X)-3s mediante la conjugación sitio-específica de equivalentes molares de módulos Okt3scFv-AD2 y C_H1-DDD2-Fab. Por ejemplo, se produjeron aproximadamente 100 mg de (19)-3s combinando 22 mg de Okt3scFv-AD2 con 80 mg de C_H1-DDD2-Fab-hA19. La mezcla se redujo durante la noche a temperatura ambiente con 1 mM de glutatión reducido antes de añadir 2 mM de glutatión oxidado. El (19)-3s se purificó a partir de la mezcla de reacción mediante cromatografía de afinidad secuencial con Kappa-Select y Ni-SEPHAROSE®. Se ensamblaron constructos (X)-3s adicionales a varias escalas siguiendo un proceso similar.

Tabla 6. Constructos (X)-3s DNL™

Código	Objetivo	C _H 1-DDD2-Fab	AD2-anti-CD3
(19)-3s	CD19	C _H 1-DDD2-Fab-hA19	scFv-AD2- Okt3
(20)-3s	CD20	C _H 1-DDD2-Fab-hA20	scFv-AD2- Okt3
(22)-3s	CD22	C _H 1-DDD2-Fab-hLL2	scFv-AD2- Okt3
(C2)-3s	HLA-DR	C _H 1-DDD2-Fab-hL243	scFv-AD2- Okt3
(M1)-3s	MUC5AC	C _H 1-DDD2-Fab-hPAM4	scFv-AD2- Okt3
(14)-3s	CEACAM5	C _H 1-DDD2-Fab-hMN-14	scFv-AD2- Okt3
(15)-3s	CEACEAM6	C _H 1-DDD2-Fab-hMN-15	scFv-AD2- Okt3
(E1)-3s	TROP-2	C _H 1-DDD2-Fab-hRS7	scFv-AD2- Okt3

[0234] Métodos analíticos - La cromatografía líquida de alta resolución con exclusión por tamaño (SE-HPLC) se realizó con un sistema Alliance HPLC con una columna BIOSUITE™ 250, 4-µm UHR SEC (Waters Corp). La cromatografía líquida/espectrometría de masas (LC-MS) con ionización por electrospray en tiempo de vuelo (ESI-TOF) se realizó con un HPLC de la serie 1200 acoplado a un 6210 TOF MS (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). El (19)-3s se resolvió por HPLC de fase inversa (RP-HPLC) a 60°C, utilizando un gradiente de 14 minutos de 30 - 80% de acetonitrilo en 0,1%

de ácido fórmico acuoso con una columna Aeris widepore 3,6 μ m C4 (Phenomenex). Para la TOF MS, los voltajes del capilar y del fragmentador se fijaron en 5500 y 300 V, respectivamente.

[0235] Líneas celulares y reactivos - Las líneas celulares Raji, Ramos, Daudi, LS174T y Capan-1 se adquirieron de la American Type Cell Culture Collection (ATCC, Manassas, MD) y las células Nalm-6 se adquirieron de la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zelllinien (DSMZ, Braunschweig, Alemania). Todas las líneas celulares, excepto Capan-1, se mantuvieron en RPMI-1640 con un 10% de FBS, 1% de L-glutamina, 1% de penicilina-estreptomicina y 1% de aminoácidos no esenciales MEM. Las células Capan-1 se mantuvieron con un 20% de FBS. Todos los medios de cultivo celular y suplementos se adquirieron a Life Technologies (Carlsbad, CA).

[0236] Aislamiento de PBMC y células T - Las células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) se purificaron a partir de sangre total de donantes (Blood Center of NJ, East Orange, NJ) utilizando tubos UNI-SEP_{MAXI} (Novamed, Ltd, Jerusalén, Israel). Las células T CD3-positivas se aislaron de PBMC mediante selección negativa utilizando el Kit de Aislamiento de Células Pan T (Miltenyi Biotec, Auburn, CA), de acuerdo con el protocolo del fabricante. La eficacia del aislamiento de células T se evaluó mediante FACS tras teñir las células T enriquecidas con anticuerpo anti-CD3-PE. En algunos casos, también se realizaron otras tinciones con CD-19 y CD-14 para identificar células contaminantes.

[0237] Activación de células T - Las células T aisladas se colocaron en placas de cultivo tisular de 6 pocillos a una densidad final de $2,25 \times 10^6$ células/pocillo. Se añadieron células Daudi a algunos pocillos a una densidad final de $1,5 \times 10^6$ células/pocillo, y se dejaron otros pocillos para que sólo contuvieran células T. Alternativamente, se añadieron PBMC a placas de cultivo tisular de 6 pocillos a una densidad celular final de 6×10^6 células/pocillo. El volumen de cada pocillo se llevó a 3 mL. A los pocillos correspondientes se añadieron 3 ng/mL de (19)-3s, (M1)-3s o (19)-DDD2. Tras incubar toda la noche a 37°C, se extrajo 1 mL de cada muestra. Las células se precipitaron y se marcaron en hielo con CD69-APC y CD3-PE durante 20 minutos. Las células se lavaron 2 veces con BSA al 1% en PBS y se analizaron utilizando un citómetro de flujo FACSCALIBER[™] (BD Biosciences, San Jose, CA).

[0238] Proliferación de células T - Se sembraron PBMC en matraces T25 a una concentración de 1×10^6 células/mL conteniendo los reactivos especificados. Para los matraces con células B agotadas, se eliminaron las células B mediante selección negativa utilizando un kit de aislamiento de células B de Miltenyi de acuerdo con el protocolo del fabricante. En días seleccionados, se extrajeron 100 μ L de medio de cada matraz, se marcaron con anti-CD7-APC durante 20 minutos en hielo, se lavaron una vez y se resuspendieron en 300 μ L de BSA/PBS al 1% que contenía 7-AAD. Para cada muestra, se analiza todo el volumen utilizando un citómetro de flujo FACSCALIBER[™]. Cada muestra se cuenta por duplicado. El análisis se realiza con el software FlowJo. En cada muestra se eliminaron las células muertas (7-AAD+) y los restos (según la dispersión frontal frente a la lateral). Por último, se seleccionaron las células CD7+ vivas y se representaron gráficamente con el programa Prism.

[0239] Ensayos de unión celular (Jurkat/Capan-1) - Las células Jurkat se tiñeron con PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit (Sigma) según el protocolo del fabricante. Las células Capan-1 se tiñeron con 5 μ M de CFSE (éster succinimidílico de diacetato de carboxifluoresceína, Life Technologies) según el protocolo del fabricante. Las células Capan-1 marcadas se añadieron a portaobjetos de cámara de 8 pocillos (ThermoWaltham, MA) y se dejaron adherir durante la noche. Al día siguiente, se retiraron los medios y se añadieron células Jurkat marcadas con PKH26 en medios que contenían 0,1 μ g/mL de (E1)-3s, (M1)-3s o (19)-3s. Tras una incubación de 1 hora a 37 °C, se lavaron los portaobjetos con PBS para eliminar las células no unidas y se observaron mediante microscopía de fluorescencia.

[0240] Ensayos de unión celular (Jurkat/Daudi) - Las células Jurkat y Daudi se marcaron con anti-CD3-PE y anti-CD20-FITC, respectivamente. A continuación, las células marcadas se coincubaron en una proporción de 2,5:1 con 0,1 μ g/mL de (19)-3s durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se observaron alícuotas de células mediante microscopía de fluorescencia.

[0241] Ensayo de Citotoxicidad (Líneas Celulares de Tumores Hematológicos) - Las células diana fueron marcadas con PKH67 Green Fluorescent Cell Linker Kit (Sigma) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Brevemente, se resuspenden 5×10^6 células diana en 250 μ L de diluyente C. En un segundo tubo, se añade 1 μ L de colorante PKH26 a 250 μ L de diluyente C. A continuación, se añade la suspensión celular a la solución de colorante, se mezcla bien y se incuba a temperatura ambiente durante 2 minutos. La reacción se apagó añadiendo un volumen igual de FBS. A continuación, las células marcadas se lavaron 3 veces con RPMI completo. Como células efectoras se utilizaron células T aisladas no estimuladas. Las células efectoras y las células diana marcadas con PKH67 se combinaron en una proporción de 10:1 y se sembraron en placas de 48 pocillos que contenían diluciones seriadas de (19)-3s o (14)-3s. Cada pocillo contenía 5×10^4 células diana y 5×10^5 células efectoras. Los ensayos de Jeko-1 se realizaron en RPMI al 20%. Las placas se incubaron durante 18 -24 horas en un incubador a 37°C con un 5% de CO₂. Tras la incubación, todas las células se retiraron de las placas de 48 pocillos a tubos de citómetro de flujo y se resuspendieron en BSA/PBS al 1% que contenía 1 μ g/mL de 7AAD, para distinguir las células vivas de las muertas, y 30.000 perlas de recuento absoluto COUNTBRIGHT[™] (Life Technologies). Las células se analizaron en un citómetro de flujo FACSCALIBER[™]. Para cada muestra, se contaron 8.000 microesferas COUNTBRIGHT[™] como referencia normalizada. Los datos se analizaron con el programa informático FlowJo (Treestar, Inc., Ashland, OR). Para cada muestra, se excluyeron las células muertas y los restos y se contó el total de células diana vivas.

[0242] Ensayo de Citotoxicidad (Líneas Celulares de Tumores Sólidos) - Las células diana fueron marcadas con PKH67 Green Fluorescent Cell Linker Kit (Sigma) siguiendo el mismo procedimiento que para la tinción con PKH23. Las células efectoras utilizadas fueron las siguientes Para los ensayos Capan-1, se utilizaron células T CD8+ enriquecidas, tras su purificación a partir de una columna de enriquecimiento CD8+ (R&D Systems, Minneapolis, MN). Para células LS174T: Se utilizaron células T estimuladas tras incubar PBMC durante 5 días en medios que contenían 25 U/mL de IL-2 y 50 ng/mL de Okt3 Mab, seguidos de 2 días de incubación en medios que contenían 25 U/mL de IL-2 sola. Las células efectoras y las células diana marcadas con PKH67 se combinaron en una proporción 3:1 (5×10^4 células diana y $1,5 \times 10^5$ células efectoras/pocillo) y se colocaron en placas de 48 pocillos que contenían diluciones seriadas de (E1)-3s, (14)-3s o (19)-3s. Los ensayos de Capan-1 se realizaron en RPMI al 20%. Las placas se incubaron durante 42 - 48 horas en un incubador a 37°C con un 5% de CO₂. Tras la incubación, se combinaron las células en suspensión con las células adheridas tripsinizadas de todos los pocillos y se transfirieron a tubos de citómetro de flujo. Las células se lavaron una vez y se resuspendieron en BSA/PBS al 1% que contenía 1 ug/mL de 7AAD, para distinguir las células vivas de las muertas, y 30.000 perlas de recuento absoluto COUNTBRIGHT™. Las células se analizaron en un citómetro de flujo FACSCALIBER™. Para cada muestra, se contaron 8.000 microesferas COUNTBRIGHT™ como referencia normalizada. Los datos se analizaron con el programa informático FlowJo (Treestar, Inc., Ashland, OR). Para cada muestra, se excluyeron las células muertas y los restos y se contó el total de células diana vivas.

[0243] Eficacia *in vivo* - Ratones hembra NOD/SCID, de 8 semanas de edad, fueron adquiridos de Charles River (Wilmington, MA). Los ratones fueron inyectados s.c. con una mezcla de Raji (1×10^6) y PBMC humanas (5×10^6 células) mezcladas 1:1 con matrigel. La terapia comenzó una hora después. Los regímenes de tratamiento, las dosis y el número de animales de cada experimento se describen en los **Resultados**. Los animales fueron controlados diariamente para detectar signos de crecimiento tumoral. Una vez aparecidos los tumores, se midieron dos veces por semana. El volumen tumoral (VT) se determinó mediante mediciones en dos dimensiones utilizando calibradores, definiéndose los volúmenes como: $L \times w^2/2$, donde L es la dimensión más larga del tumor y w la más corta. La eficacia se determinó mediante una prueba de rangos logarítmicos con el software Prism GraphPad (v5; LaJolla, CA) en curvas de Kaplan-Meier utilizando criterios de valoración sustitutivos de la supervivencia como el tiempo de progresión tumoral (TTP) hasta 1,0 cm³. Se consideró significativo un valor de $P < 0,05$.

Resultados

[0244] Construcción y análisis bioquímico de anticuerpos biespecíficos redireccionadores de leucocitos. El método DNL™ se utilizó para generar un panel de (X)-3s, bsAbs redireccionadores de leucocitos para la orientación de varios antígenos asociados a tumores, incluyendo CD19, CD20, HLA-DR, TROP-2, CEACAM5 y MUC5AC. La pureza de estas estructuras se demostró mediante análisis SE-HPLC y SDS-PAGE, donde sólo eran evidentes las bandas que representaban los tres polipéptidos constituyentes (Okt3scFv-AD2, hA19-Fd-DDD2 y hA19 kappa) (datos no mostrados). El análisis LC-MS identificó un único pico RP-HPLC con un espectro de masas deconvolucionado consistente (precisión de masa = 11 ppm) con la masa calculada (137432,37 Da) de (19)-3s a partir de su secuencia de aminoácidos deducida, incluyendo los piroglutamatos aminoterminales predichos en la Okt3scFv-AD2 y cada una de las dos cadenas Fd C_H1-DDD2-hA19 (datos no mostrados). No se indicaron modificaciones postraduccionales adicionales, incluida la glicosilación.

[0245] Formación de sinapsis inmunitarias entre el linfoma de Burkitt Daudi y las células T, mediada por (19)-3s. Se examinaron los efectos del complejo redireccionador de leucocitos (19)-3s DNL™ en la orientación de las células T efectoras hacia las células de linfoma CD19+ (**FIG. 2**). Se combinaron células T recién aisladas con células Daudi en una proporción E:T de 2,5:1. Las células se trataron con 0, 1 o 5 µg/mL del complejo (19)-3s DNL™ durante 30 min a temperatura ambiente antes del análisis por citometría de flujo. Se utilizaron anti-CD20-FITC y anti-CD7-APC para identificar células Daudi y T, respectivamente. La co-vinculación se indicó como el % de eventos CD20+/CD7+. Tras el tratamiento con (19)-3s, el 45,5% de los eventos de flujo fueron doblemente positivos para CD20/CD7, lo que indica sinapsis de células Daudi y T (**FIG. 2A**), en comparación con el 2% medido para las células mezcladas sin anticuerpo (**FIG. 2B**). La adición de (19)-3s dio lugar a la asociación de >90% de los Daudi con células T (**FIG. 2C**). Estos resultados muestran que el complejo (19)-3s DNL™ fue eficaz para dirigir las células T a las células de linfoma que expresan el antígeno diana.

[0246] La formación de sinapsis entre las células T y las células diana del linfoma se demostró mediante microscopía de fluorescencia (**FIG. 3**). Se combinaron Jurkat (células T) y Daudi (células B) en una proporción 1:1, se trataron con 0,1 µg/mL del complejo (19)-3s DNL™ durante 30 minutos y se tificaron con anti-CD20-FITC (**FIG. 3A**) y anti-CD3-PE (**FIG. 3B**), antes del análisis mediante microscopía de fluorescencia. La imagen fusionada (**FIG. 3C**) muestra la formación de sinapsis entre células Daudi teñidas de verde y células Jurkat teñidas de rojo. La formación de sinapsis no fue evidente en ausencia de (19)-3s (**FIG. 3D**). **FIG. 3C** demuestra que las células del linfoma diana están en contacto directo con las células T diana.

[0247] Se realizó una serie dosis-respuesta para la asociación mediada por (19)-3s de células T a una línea ejemplar de linfoma de células B (**FIG. 4**). Como se muestra en la **FIG. 4**, en las condiciones de este experimento, la saturación de la asociación célula a célula mediada por (19)-3s de células T a células diana se alcanzó a una concentración entre 0,037 y 0,111 µg/ml del complejo DNL™.

[0248] La **FIG. 5** muestra una comparación de las eficacias relativas del BITE® (**FIG. 5A**), DART™ (**FIG. 5A**) y DNL™ (**FIG.**

5B) complejos anti-CD3 × anti-CD19 para redirigir las células T hacia las células B CD19⁺ diana. Los datos de BITE[®] y DART[™] se obtuvieron de Moore et al. (2011, Blood 117:4542-51). A la concentración más baja probada de 0,0005 µg/ml, el complejo (19)-3s DNL[™] fue más eficaz que BITE[®] o DART[™] para dirigir células T al linfoma de células B (**FIG. 5**). El complejo DNL[™] (19)-3s también indujo un nivel máximo ligeramente superior de asociación célula a célula que los complejos comparables BITE[®] y DART[™] (**FIG. 5A**). Aunque es difícil extrapolar a partir de los puntos de datos únicos generados para el complejo (19)-3s DNL[™], los niveles de EC₅₀ parecían ser similares para BITE[®], DART[™] y DNL[™] (**FIG. 5**).

[0249] Asociación célula-célula de células T mediada por (19)-3s, (E1)-3s y (M1)-3s para atacar células tumorales. Para evaluar la capacidad de los BsAbs redireccionadores de células T para facilitar la asociación de células T a sus células tumorales diana, se incubaron células T Jurkat con células tumorales diana que contenían (X)-3s y se evaluaron mediante citometría de flujo y microscopía de fluorescencia. Las células T Jurkat son una línea de leucemia de células T CD4⁺, elegidas por su capacidad para demostrar la unión de células T sin agotamiento de las células Daudi marcadas con FITC en presencia de diversas concentraciones de (19)-3s y analizadas por citometría de flujo para la detección de poblaciones doblemente positivas (CD3+CD20⁺) que indican complejos asociados de células T y células B. Se observó una aparente asociación célula-célula tras el tratamiento con 0,5 ng/mL de (19)-3s y tras el tratamiento con 0,1 µg/mL más del 25% de la población celular existía en una asociación célula-célula (**FIG. 5**). La microscopía fluorescente apoya estos datos, ya que las sinapsis inmunes son evidentes tras el tratamiento con 0,1 µg/mL de (19)-3s (**FIG. 4**). No se observó formación de sinapsis en ausencia de (19)-3s (datos no mostrados).

[0250] Esta asociación célula-célula se observó también en la línea tumoral pancreática Capan-1 (**FIG. 6**). Capan-1 expresa altos niveles de TROP2 y niveles moderados de MUC5AC. Por lo tanto, tanto el bsAb dirigido a TROP2, (E1)-3s (**FIG. 6C**), y bsAb dirigido a MUC5AC, (M1)-3s (**FIG. 6B**) se compararon con el bsAb de control no diana, (19)-3s (**FIG. 6A**). Las células Capan-1 marcadas con CFSE se incubaron con Jurkat marcadas con PKH26 en presencia de estos bsAbs. La microscopía de fluorescencia reveló, como era de esperar, grandes complejos célula T/Capan mediados por (E1)-3s, seguidos de complejos más pequeños pero sustanciales mediados por (M1)-3s y una formación de complejos relativamente baja tras el tratamiento con (19)-3s (**FIG. 6**).

[0251] (19)-3s induce específicamente la activación y proliferación de células T. La capacidad de (19)-3s para activar células T se evaluó en PBMC (**FIG. 7A**), o células T coincubadas con células B Daudi (**FIG. 7B**), midiendo los niveles de expresión de CD69, un marcador temprano de la activación de células T. El tratamiento con 3 ng/mL de (19)-3s indujo la activación de las células T en células T coincubadas con células B Daudi, como indica un aumento >50 veces mayor de la expresión de CD69 en comparación con los anticuerpos de control no diana, (19)-DDD2 y (M1)-3s, así como con las células T tratadas con (19)-3s sin células diana Daudi (**FIG. 7B**). Se observaron resultados similares cuando los anticuerpos se incubaron con PBMC, que contenían tanto linfocitos T como B; (19)-3s estimuló niveles de expresión de CD69 >20 veces superiores a los controles no dirigidos (**FIG. 7A**). En ausencia de células diana, las células T purificadas tratadas con (19)-3s no mostraron activación (**FIG. 7C**).

[0252] La proliferación de células T, como otra indicación de la activación de células T, fue evaluada después del tratamiento de PBMCs con varios anticuerpos dirigidos a CD3. (19)-3s a 3 nM o 30 pM indujo una proliferación de células T similar a la del control positivo IL-2/PHA (**FIG. 8A**). El anticuerpo de control no diana, (14)-3s, muestra cierta proliferación inespecífica de células T a la concentración más alta (3 nM) (**FIG. 8A**). Sin embargo, no se observó proliferación de células T en PBMCs desprovistas de células B (**FIG. 8B**), lo que sugiere que las células diana son necesarias para la proliferación específica de células T inducida por (19)-3s.

[0253] (X)-3s redirigió la destrucción mediada por células T de líneas celulares malignas. La citotoxicidad de cada molécula leucocitaria se evaluó en función de su capacidad para provocar la lisis de células tumorales específicas. Para las líneas celulares tumorales hematológicas, una proporción E:T de 10:1 utilizando una población de células T enriquecidas no estimuladas como células efectoras en un ensayo de 18 - 24 horas demostró las condiciones óptimas de ensayo. El bsAb dirigido a CD19, (19)-3s indujo la destrucción específica más potente de las líneas celulares con expresión relativamente baja de CD19 Ramos (IC₅₀ = 0,17 pM, Lysis_{Max} = 79%) Daudi (IC₅₀ = 1 pM, Lysis_{Max} = 60%), y Nalm6 (IC₅₀ = 6 pM, Lysis_{Max} = 93%) (**FIG. 9A**). Curiosamente, las líneas celulares con alta expresión de CD19, Namalwa (IC₅₀ = 63 pM, Lysis_{Max} = 60%) y Raji (IC₅₀ = 3 nM, Lysis_{Max} = 41%) fueron las menos sensibles a (19)-3s (**FIG. 9A**). El constructo DNL[™] (14)-3s no diana tuvo escaso efecto citotóxico en cualquiera de las líneas celulares ensayadas (**FIG. 9B**). Se obtuvieron efectos citotóxicos consistentes del constructo (19)-3s sobre la línea celular de ALL Nalm-6 con PBMC obtenidas de dos donantes diferentes (**FIG. 9C**).

[0254] Los efectos citotóxicos *in vitro* de los bsAbs redireccionadores de células T (20)-3s, (22)-3s y (C2)-3s se determinaron en varias líneas celulares (**FIG. 10**). El bsAb dirigido a CD22, (22)-3s, demostró una potente (IC₅₀ = 5 pM, Lysis_{Max} = 60%) lisis específica mediada por células T en la línea celular Daudi CD22-positiva (**FIG. 10C**), pero no en las células Namalwa CD22-negativas (**FIG. 10A**).

[0255] El bsAb dirigido a CD20, (20)-3s demostró la mayor potencia en las líneas celulares CD20 de mayor expresión, Daudi (IC₅₀ = <0,3 pM, Lysis_{Max} = 90%) (**FIG. 10C**) and Jeko (IC₅₀ = 1 pM, Lysis_{Max} = 90%) (**FIG. 10B**), en comparación con la línea celular Namalwa de menor expresión de CD20 (IC₅₀ = 30 pM, Lysis_{Max} = 53%) (**FIG. 10A**).

[0256] El bsAb dirigido a HLA-DR, (C2)-3s se probó en la línea celular Jeko-1 que expresa HLA-DR ($IC_{50} = 20$ pM, $Lysis_{Max} = 88\%$)(FIG. 10B).

[0257] En una proporción E:T de 10:1, usando células T aisladas como células efectoras, los bsAbs indujeron una potente citotoxicidad mediada por células T en varias neoplasias malignas de células B, incluyendo linfoma de Burkitt (Daudi, Ramos, Namalwa) linfoma de células del manto (Jeko-1) y leucemia linfoblástica aguda (Nalm-6) (Tabla 7). Un control de unión no tumoral, (14)-3s, indujo sólo una muerte moderada de células T a >10 nM. La naturaleza del antígeno/epítipo, en particular su tamaño y proximidad a la superficie celular, parece ser más importante que la densidad del antígeno para la potencia de redireccionamiento de las células T (Tabla 7). Es probable que (20)-3s sea sistemáticamente más potente que (19)-3s y (C2)-3s, incluso cuando la expresión de CD19 o HLA-DR es considerablemente superior a la de CD20, como se observa con Namalwa y Jeko-1, respectivamente (Tabla 7). Esto se debe probablemente a que el epítipo CD20 comprende un pequeño bucle extracelular muy próximo a la superficie celular. Cuando se comparó directamente utilizando Daudi, (22)-3s fue el menos potente. En comparación con CD19 y CD20, CD22 se expresa en la densidad más baja, es un antígeno de internalización rápida y su epítipo está más alejado de la superficie celular. Cada uno de estos factores puede contribuir a reducir su potencia. Por último, la sensibilidad a la destrucción dirigida a células T depende de la línea celular, como se observó utilizando (19)-3s, donde Raji ($IC_{50} > 3$ nM) no responde en gran medida y Ramos ($IC_{50} = 2$ pM) es muy sensible, a pesar de que el primero expresa una mayor densidad de antígeno CD19 (Tabla 7).

[0258] En conclusión, (19)-3s, (20)-3s, (22)-3s y (C2)-3s se unen a células T y células B diana simultáneamente e inducen la muerte mediada por células T *in vitro*. La naturaleza modular del método DNL permitió la producción rápida de varios conjugados relacionados para la destrucción leucocitaria redirigida de varias neoplasias de células B, sin necesidad de ingeniería recombinante y producción de proteínas adicionales. La proximidad del epítipo extracelular CD20 a la superficie celular dio lugar a la mayor potencia de (20)-3s.

Tabla 7. Eliminación ex vivo de células T redirigidas

Línea Celular	Tipo ¹	Antígeno CD19	Expresión ² CD20	CD22	HLA-	IC_{50} ³ (pM) (19)-3s	(20)-	(22)-3s	(C2)-
Daudi	BL	1.00	1.00	1.00	1.00	1	0.3	6	N.D.
Ramos	BL	0.76	0.65	0.26	0.36	2	0.4	N.D.	2
Nalm-6	ALL	1.63	0.05	0.19	0.17	6	N.D.	N.D.	N.D.
Namalwa	BL	0.76	0.11	0.05	0.40	63	30	>3000	N.D.
Raji	BL	1.41	0.69	0.59	0.84	>3000	N.D.	N.D.	N.D.
Jeko-1	MCL	0.89	1.02	0.05	1.06	3000	1	N.D.	20

¹ BL, linfoma de Burkitt; ALL leucemia linfoblástica aguda; MCL, linfoma de células del manto.

² Nivel de expresión determinado por citometría de flujo y normalizada a la de Daudi.

³ IC_{50} , la concentración picomolar que alcanzó 50% de destrucción de células objetivo.

[0259] Los efectos citotóxicos *in vitro* de los bsAbs redireccionadores de leucocitos también se determinaron en células tumorales sólidas (FIG. 11). Para las líneas celulares de tumores sólidos, se determinó que las condiciones óptimas de ensayo eran una proporción E:T de 3:1 utilizando células T estimuladas en un ensayo de 42 - 48 horas. Cada bsAb indujo una lisis específica mediada por células T de las células tumorales diana. La línea celular de adenocarcinoma de colon humano LS-174T que expresa CEACAM5 demostró una potente lisis específica ($IC_{50} = 2$ pM) tras el tratamiento con (14)-3s (FIG. 11A). (E1)-3s mediaron una potente lisis específica de la línea celular de adenocarcinoma pancreático humano Capan-1 que expresa TROP2 ($IC_{50} = 29$ pM) (FIG. 11B). La línea celular de carcinoma gástrico NCI-N87, que expresa altos niveles tanto de CEACAM6 como de TROP 2, demostró una lisis específica muy potente frente a ambas moléculas dirigidas a células T, (15)-3s y (E1)-3s ($IC_{50} = 3$ pM y 0,85 pM respectivamente) (FIG. 11C). El anticuerpo de control no diana, (19)-3s, indujo una lisis inespecífica baja (<20%) a concentraciones > 1 nM para Capan-1 y LS174T, y una lisis inespecífica moderada (~40%) en células NCI-N87 (FIG. 11A-C). En la FIG. 1 se muestra un resumen de los datos de citotoxicidad *in vitro* de varios bsAbs redireccionadores de leucocitos en diversas líneas celulares tumorales. 12. Los diversos constructos mostraron una lisis celular máxima de hasta el 90% o más de las células tumorales diana, con valores de IC_{50} para las líneas celulares que expresaban el antígeno diana que estaban generalmente en el rango picomolar bajo (FIG. 12).

Ejemplo 2. Estudios *In vivo* de Complejo DNL™ de Redirección de leucocitos

[0260] Una limitación potencial de los constructos basados en scFv pequeños (<60 kDa), como BITE® y DART™, es el

requisito de administración mediante infusión continua a largo plazo, debido a su toxicidad y rápida eliminación de la circulación. Dado que el tamaño molecular de los bsAbs DNL™ está por encima del umbral típicamente asociado con la eliminación renal, debería mostrar una eliminación más lenta de la circulación. Medimos los parámetros farmacocinéticos en ratones tras una única inyección i.v. en bolo de 5 mg/kg del (19)-3s bsAb (datos no mostrados). Se observó un aclaramiento bifásico con un $t_{1/2\alpha}$ y $t_{1/2\beta}$ de 1,1 y 5,1 h, respectivamente, lo que dio lugar a un área bajo la curva de 1880 pmol*h/mL (datos no mostrados), que fue casi 6 veces mayor que la comunicada para MT 103 (anti-CD19xanti-CD3 BITE®) administrado a la misma concentración molar (Patente US2010/0303827A1). La principal diferencia es aparentemente una $t_{1/2\alpha}$ más larga para (19)-3s (datos no mostrados). Debido a las propiedades potencialmente ventajosas de (19)-3s, evaluamos la posibilidad de utilizar esquemas de dosificación menos frecuentes en lugar de dosis diarias, que es lo que se suele utilizar para BITE® en estudios con animales.

[0261] Se realizó un estudio piloto utilizando xenoinjertos de linfoma de Burkitt humano Raji en ratones NOD/SCID reconstituidos con PBMC humanas (**FIG. 13, FIG. 14**). Las células Raji (1×10^6 células/ratón) se combinaron con PBMC recién aisladas (5×10^6 células/ratón) de un único donante sano, se mezclaron 1:1 con matrigel y se inyectaron por vía SC en todos los animales del estudio el día 0. Grupos de 5 ratones recibieron inyecciones i.v. de (19)-3s por un total de 130 µg como dosis única el Día 0 (**FIG. 13B**), tres dosis de 43 µg (Días 0, 2 y 4) (**FIG. 13C**) o cinco dosis diarias de 26 µg (Días 0 - 5) (**FIG. 13D**). El grupo no tratado (**FIG. 13A**), que se inoculó con la misma mezcla celular pero no recibió (19)-3s, tuvo un tiempo medio de supervivencia (TSM) de 31 días. Cada régimen terapéutico mejoró la supervivencia ($P \leq 0,05$), siendo el esquema de tres dosis (en días alternos) el que proporcionó el mayor beneficio de supervivencia (MST = 91 días; $P = 0,0018$ mediante análisis log-rank).

[0262] Se inició un estudio de seguimiento para determinar la eficacia de una dosificación menos frecuente (**FIG. 14**). Se inocularon grupos de 9 ratones NOD/SCID con Raji y PBMC de forma similar a la anterior. En este estudio, la terapia se amplió a dos semanas, frente a una semana en el primer estudio. Los grupos recibieron inyecciones i.v. de (19)-3s por un total de 360 µg como $2 \times 130\mu\text{g}$ (**FIG. 14B**), $4 \times 65\text{-}\mu\text{g}$ (**FIG. 14D**) o $6 \times$ dosis de $43\text{-}\mu\text{g}$ durante dos semanas (**FIG. 14E**). A un grupo adicional se le administraron $2 \times$ dosis de $130\text{-}\mu\text{g}$ SC, en lugar de i.v. (**FIG. 14C**). A modo de comparación, los grupos de control de ratones no tratados (**FIG. 14A**) o ratones tratados con anticuerpos no dirigidos (M1)-3s (**FIG. 14F**). A partir del día 28, cada uno de los grupos de tratamiento con (19)-3s presentó un AUC significativamente menor que el control no tratado ($P < 0,05$). Sorprendentemente, dos dosis semanales por vía SC fueron aparentemente tan eficaces como una dosis i.v. de mayor frecuencia.

[0263] También se realizaron estudios *in vivo* utilizando tumores sólidos (**FIG. 15**). Se prepararon xenoinjertos de ratón NOD/SCID como se ha descrito anteriormente, para el adenocarcinoma de colon LS174T (**FIG. 15A, FIG. 15B**) o carcinoma pancreático Capan-1 (**FIG. 15C, FIG. 15D**). En cada caso, a los ratones se les administró la diana (E1)-3s (**FIG. 15B**) o (14)-3s (**FIG. 15D**). Los constructos bsAb DNL™ mostraron una supervivencia mejorada en comparación con los controles.

[0264] En conclusión, los bsAbs de redireccionamiento de leucocitos, incluidas las constructos DNL™ (19)-3s, (E1)-3s y (M1)-3s, mediaron la formación de sinapsis entre células T y células B, células de adenocarcinoma de colon o de carcinoma pancreático, respectivamente, a través de la unión monovalente y bivalente a CD3 y CD19, respectivamente. Los bsAbs DNL™ indujeron la activación de células T, la proliferación y la destrucción de células diana en concentraciones pM en un entorno *ex vivo*. Las propiedades ventajosas de los bsAbs DNL™, incluida la unión tumoral bivalente y el aclaramiento más lento, permitirían una dosificación menos frecuente y posiblemente la administración SC, en comparación con los constructos BITE® o DART™, que se administran i.v. diariamente en modelos animales y como infusión continua en la clínica. La naturaleza modular del método DNL™ permite la producción rápida de un gran número de conjugados relacionados para la eliminación redirigida de leucocitos de diversas neoplasias malignas, sin necesidad de ingeniería recombinante y producción de proteínas adicionales.

[0265] La persona de habilidad ordinaria en el arte se dará cuenta de que otros anticuerpos que se unen a CD3 u otros antígenos leucocitarios, así como otros anticuerpos que se unen a Trop-2 u otros antígenos asociados a enfermedades son conocidos en el arte y cualquiera de tales anticuerpos puede usarse para hacer $F(ab)_2$, scFv u otros fragmentos de anticuerpo usando técnicas bien conocidas en el arte. Tales anticuerpos alternativos o fragmentos de los mismos pueden utilizarse en los métodos y composiciones instantáneos. Como se expone más adelante, los métodos de fabricación de complejos DOCK-AND-LOCK™ (DNL™) pueden aplicarse para incorporar cualquier anticuerpo o fragmento de anticuerpo conocido en un complejo estable y fisiológicamente activo.

Ejemplo 3. El interferón- α potencia el efecto citotóxico de los anticuerpos biespecíficos anti-Trop-2 x anti-CD3

[0266] Se probó la eficacia terapéutica de un anticuerpo biespecífico anti-Trop-2 humano x anti-CD3 humano ((E1)-3s), fabricado a partir de hRS7 y OKT3 como un complejo DNL™, en cuanto a su capacidad para retrasar el crecimiento tumoral de células tumorales de adenocarcinoma pancreático humano Capan-1 cuando se mezclaron con células T humanas y se inyectaron en ratones. También se evaluó el efecto del interferón- α (en forma de E1*2b o PEGASYs®) cuando se combinaba con esta terapia.

Métodos

[0267] Ratones hembra NOD/SCID de cinco semanas de edad fueron inyectados s.c. con una mezcla de Capan-1 (5×10^6) y células T humanas ($2,5 \times 10^6$ células) mezcladas 1:1 con matrigel (proporción E:T de 1:2). Había seis grupos de tratamiento diferentes de 8 ratones cada uno. El tratamiento consistió en un grupo que recibió 47 μ g (E1)-3s i.v. todos los días durante cinco días empezando 1 hora después de la administración de la mezcla Capan-1/T-cell. Dos grupos fueron tratados con cantidades equimolares de IFN, uno recibió la molécula DNL hecha de IFN- α 2b-DDD2-CK-hRS7 IgG1 (E1*-2b; 2,5 μ g s.c. semanales \times 4 semanas) mientras que otro recibió PEGASYS® (Roche; 0,6 μ g s.c. semanales \times 4 semanas). Otros dos grupos recibieron una combinación de (E1)-3s más E1*2b o (E1)-3s más PEGASYS®. El último grupo de control permaneció sin tratamiento. La **Tabla 8** resume los distintos grupos de tratamiento.

Tabla 8. Grupos de tratamiento para la terapia (E1)-3s

Terapia (E1)-3s de Xenoinjerto de Carcinoma Pancreático Humano (Capan-1) en Ratones NOD/SCID			
Grupo	(N)	Cantidad Inyectada	Horario
1	8	No tratado	N.A.
2	8	(E1)-3s (47 μ g i.v.)	qdx5
3	8	E1*-2b (2.5 μ g s.c.)	qwkw4
4	8	PEGASYS® (0.6 μ g s.c.)	qwkw4
5	8	(E1)-3s + E1*-2b	qdx5 + qwkw4
6	8	(E1)-3s + PEGASYS	qdx5 + qwkw4

[0268] Los ratones fueron monitorizados diariamente para detectar signos de crecimiento tumoral. A todos los animales se les midieron los tumores dos veces por semana una vez que empezaron a salir tumores. Los ratones fueron eutanasiados por progresión de la enfermedad si sus volúmenes tumorales superaban 1,0 cm³ de tamaño.

Resultados

[0269] Los volúmenes tumorales medios de los distintos grupos se muestran en la **FIG. 16**. Los datos que contienen los grupos PEGASYS® (**FIG. 16B**) se muestran en un gráfico separado de los grupos E1*2b (**FIG. 16A**) para mayor claridad. Todos los tratamientos fueron significativamente mejores en el control del crecimiento tumoral en términos de área bajo la curva (AUC) en comparación con los ratones no tratados hasta el día 29, que fue cuando el primer ratón del grupo no tratado fue eutanasiado por progresión de la enfermedad ($P < 0,0009$; AUC_{29días}). La combinación de (E1)-3s con PEGASYS® produjo la mejor respuesta antitumoral global en términos de crecimiento tumoral (**FIG. 16B**). Este tratamiento fue significativamente mejor que cualquiera de los tratamientos individuales ($P < 0,042$; AUC), así como superior a la combinación de (E1)-3s más E1*-2b ($P = 0,0312$; AUC_{53días}) (**FIG. 16A**). La combinación de (E1)-3s más E1*2b pudo controlar significativamente el crecimiento tumoral en comparación con E1*2b o PEGASYS® solos ($P < 0,0073$; AUC_{46días}) pero no con (E1)-3s solo (**FIG. 16A-B**). No hubo diferencias significativas entre los ratones tratados con (E1)-3s, PEGASYS® o E1*-2b (**FIG. 16A-B**).

[0270] En términos de supervivencia, todos los tratamientos proporcionan un beneficio de supervivencia significativo en comparación con los ratones no tratados ($P < 0,0112$; log-rank) (**FIG. 17**). A partir del día 81, no hubo diferencias significativas en los tiempos medios de supervivencia (TMS) entre los ratones tratados con la combinación de (E1)-3s más E1*-2b y los tratados con (E1)-3s más PEGASYS® (TMS=79,5 y >81 días, respectivamente) (**FIG. 17**). Los ratones

- tratados con (E1)-3s *más* PEGASYS® tuvieron un resultado de supervivencia significativamente mejor que cualquiera de los tratamientos individuales ($P < 0,0237$) (**FIG. 17**). Los ratones tratados con (E1)-3s *más* E1*2b obtuvieron un beneficio de supervivencia en comparación con los ratones tratados únicamente con E1*2b (MST=53 días; $P < 0,0311$), pero no en comparación con los ratones tratados únicamente con (E1)-3s o PEGASYS® (MST=68 y 53 días, respectivamente) (**FIG. 17**). El tratamiento con (E1)-3s proporcionó una mejora significativa de la supervivencia en comparación con los ratones tratados con E1*2b ($P = 0,0406$), pero no en comparación con los ratones tratados únicamente con PEGASYS® (**FIG. 17**). No hubo diferencias significativas entre los ratones tratados sólo con E1*2b y los tratados sólo con PEGASYS® (**FIG. 17**).
- [0271]** Los resultados demuestran que la adición de interferón- α proporciona un aumento sustancial de la supervivencia y una disminución del crecimiento tumoral cuando se combina con un bsAb redireccionador de leucocitos. La persona con conocimientos ordinarios se dará cuenta de que la eficacia mejorada observada con la adición de interferones de tipo I o de tipo III (interferón- α , interferón- β o interferón- λ) no se limita al bsAb específico (E1)-3s, sino que se observará con otros bsAbs redireccionadores de leucocitos, fabricados como complejos DNL™ o en otras formas, como BITE® o DART™.
- Ejemplo 4. Estudios adicionales sobre la terapia combinada de interferón- α con anticuerpos biespecíficos de reorientación leucocitaria**
- [0272]** En el Ejemplo anterior, la combinación de (E1)-3s *más* PEGASYS® demostró ser un tratamiento muy eficaz en el control del crecimiento tumoral. Para confirmar estos resultados y ampliarlos, se realizó un estudio en el que se añadieron dos nuevos grupos. En primer lugar, se incluyó un grupo de control para (E1)-3s en el que se administró a los animales una cantidad equimolar de TF12. El TF12 está formado por dos moléculas hRS7-Fab unidas a una molécula 679 Fab no dirigida (anti-HSG). Además, dado que Capan-1 es sensible al IFN, se añadió otro grupo en el que se evaluó el efecto de PEGASYS® sobre el crecimiento tumoral de Capan-1 sin el beneficio de las células T.
- [0273]** Después de que los ratones (40) fueron inyectados con la mezcla de células Capan-1/T, fueron distribuidos aleatoriamente en cinco grupos de tratamiento. Una hora después, un grupo de 11 ratones recibió 47 μg (E1)-3s i.v. cada día empezando 1 h después de la inyección de células tumorales y continuó durante cuatro días consecutivos más (qdx5). Un grupo de 7 animales recibió interferón en forma de PEGASYS® s.c. semanalmente durante cuatro semanas. Otro grupo recibió una combinación de (E1)-3s i.v. *más* PEGASYS® s.c. Los animales de control no tratados reciben células Capan-1/T pero ningún tratamiento. Otro grupo de control recibió TF12 en cantidades equivalentes a los (E1)-3s en términos de moles (57 μg qdx5). Los ratones del grupo 6 (8 animales) recibieron una inyección separada de sólo células Capan-1 (es decir, sin células T) y fueron tratados con PEGASYS®. Todas las inyecciones terapéuticas se realizaron en un volumen de 100 μl . La **Tabla 9** resume los distintos grupos

Tabla 9. Grupos de tratamiento para (E1)-3s y terapia TF12

Terapia (E1)-3s de Xenoinjerto de Carcinoma Pancreático Humano (Capan-1) en Ratones NOD/SCID			
Grupo	(N)	Cantidad Inyectada	Horario
1	7	No tratado (Capan-1 + solo células T)	N.A.
2	11	(E1)-3s (47 µg i.v.)	qdx5
3	7	TF12 (57 µg i.v.)	qdx5
4	7	PEGASYS® (0.6 µg s.c.)	qwkw4
5	8	(E1)-3s + PEGASYS®	qdx5 + qwkw4
6	8	PEGASYS® (0.6 µg s.c.) (Solo células Capan-1)	qwkw4

[0274] Los ratones fueron monitoreados diariamente para detectar signos de crecimiento tumoral. A todos los animales se les midieron los tumores dos veces por semana una vez que empezaron a salir tumores. Los ratones fueron eutanasiados por progresión de la enfermedad si sus volúmenes tumorales superaban 1,0 cm³ de tamaño.

Resultados

[0275] Crecimiento tumoral medio (FIG. 18) y curvas de supervivencia (FIG. 19) son presentadas. Aunque no fueron diferentes entre sí, los ratones tratados con (E1)-3s, PEGASYS® o PEGASYS® (sin células T), demostraron efectos antitumorales significativos en comparación con el TF12 y los grupos de control no tratados ($P < 0,0102$; AUC). El día en que finalizó este experimento (día 59), el volumen tumoral medio de los ratones tratados con la combinación de (E1)-3s más PEGASYS® era de $0,083 \pm 0,048$ cm³. En general, este grupo de tratamiento demostró un efecto antitumoral significativo en comparación con todos los demás grupos de tratamiento ($P < 0,0072$; AUC).

[0276] Cada tratamiento individual (PEGASYS®, PEGASYS® sin células T y (E1)-3s) mejoró significativamente la supervivencia en comparación con los grupos TF12 y control sin tratar ($P < 0,0059$; log-rank) (FIG. 18, FIG. 19). Todos los grupos, excepto la combinación de (E1)-3s más PEGASYS® alcanzaron sus respectivos MST. Ningún animal fue eutanasiado por progresión de la enfermedad (TV > 1,0 cm³) en este grupo combinado. Es importante destacar que la combinación de (E1)-3s más PEGASYS® proporcionó un beneficio de supervivencia significativo en comparación con todos los demás tratamientos ($P < 0,0007$; log-rank) (FIG. 18, FIG. 19).

Ejemplo 5. Efecto de la terapia combinada de interferón-α con anticuerpos biespecíficos redireccionadores de células T en el cáncer gástrico humano

[0277] Los métodos y composiciones divulgados en los dos Ejemplos anteriores se utilizaron para estudiar los efectos de los bsAbs redireccionadores de leucocitos solos o en combinación con interferón-α (PEGASYS®) en la línea tumoral gástrica humana NCI-N87 refractaria a IFN. Se inyectaron grupos de ratones (N=8 cada grupo) s.c. con 5×10^6 células NCI-N87 + $2,5 \times 10^6$ células T (proporción 1:2 E:T) mezcladas con matrigel y se inició la terapia 1 h después. Los grupos de tratamiento se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Grupos de tratamiento para (E1)-3s y terapia TF12

(E1)-3s de un xenoinjerto de carcinoma gástrico humano (NCI-N87) en ratones NOD-SCID		
Grupo	Cantidad inyectada	Horario
1	No tratado (NCI-N87 + sólo células T)	N.A.
2	(E1)-3s (47 µg i.v.)	qdx5
3	TF12 (57 µg i.v.)	qdx5
4	PEGASYS® (0,8 µg c.s.)	qwxx4
5	TF12 + PEGASYS®	qdx5 + qwxx4
6	(E1)-3s + PEGASYS®	qdx5 + qwxx4

[0278] Los efectos del bsAb (E1)-3s redireccionador de leucocitos solo o en combinación con interferón se muestran en la FIG. 20 y FIG. 21. El bsAb (E1)-3s fue eficaz para reducir el crecimiento tumoral y aumentar la supervivencia en el cáncer gástrico. Significativamente, la combinación con interferón- α potenció el efecto del bsAb redireccionador de leucocitos, incluso en un tumor resistente al interferón. La terapia combinada fue más eficaz que cualquiera de los agentes añadidos por separado. Los controles con ratones tratados con TF12 bsAb solo o en combinación con interferón- α mostraron escasos efectos sobre el crecimiento tumoral o la mortalidad, en comparación con los animales no tratados.

Ejemplo 6. Uso terapéutico in vivo de conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) en modelos preclínicos de carcinoma humano de páncreas o colon

[0279] Los conjugados CL2A-SN-38-anticuerpo se prepararon como se ha descrito previamente (véase, por ejemplo, U.S. Patentes de EE.UU. N.º 7,999,083 y 8,080,250). Ratones desnudos atímicos (hembras) inmunocomprometidos, portadores de xenoinjertos tumorales humanos subcutáneos de páncreas o colon, fueron tratados con el conjugado específico CL2A-SN-38 o con el conjugado de control, o se dejaron sin tratar. Se observaron las eficacias terapéuticas de los conjugados específicos. En un modelo de tumor pancreático Capan 1, los conjugados específicos CL2A-SN-38 de los anticuerpos hRS7 (anti-TROP2), hPAM4 (anti-MUC5ac) y hMN-14 (anti-CEACAM5) mostraron mejores eficacias que el conjugado de control hA20-CL2A-SN-38 (anti-CD20) y el control no tratado (no mostrado). Del mismo modo, en un modelo BXP3 de cáncer de páncreas humano, el hRS7-CL2A-SN-38 específico mostró mejor eficacia terapéutica que los tratamientos de control (no mostrado). Asimismo, en un modelo agresivo LS174T de carcinoma de colon humano, el tratamiento con hMN-14-CL2A-SN-38 específico fue más eficaz que la ausencia de tratamiento (no mostrado).

Ejemplo 7. Terapia in vivo de metástasis pulmonares de tumores de colon humanos GW-39 en ratones desnudos utilizando ADC hMN-14-[CL2-SN-38], IMMU-130

[0280] Se estableció un modelo metastásico pulmonar de carcinoma colónico en ratones desnudos mediante inyección i.v. de suspensión de tumor colónico humano GW-39, y se inició la terapia 14 días después. Se inyectaron conjugados de anticuerpos específicos anti-CEACAM5, hMN14-CL2-SN-38, así como conjugados de control de MAb anti-CD22 no selectivo, hLL2-CL2-SN-38 y mezclas equidosis de hMN14 y SN-38 en un programa de dosis de q4d \times 8, utilizando diferentes dosis. Se observaron efectos terapéuticos selectivos con el ADC hMN-14 (no mostrado). A una dosis de 250 µg, los ratones tratados con hMN14-CL2-SN-38 mostraron una mediana de supervivencia superior a 107 días. Los ratones tratados con el anticuerpo conjugado de control hLL2-CL2-SN-38, que no se dirige específicamente a las células cancerosas de pulmón, mostraron una supervivencia media de 77 días, mientras que los ratones tratados con hMN14 IgG no conjugado y SN-38 libre mostraron una supervivencia media de 45 días, comparable a la del control salino no tratado de 43,5 días. Se observó claramente un aumento significativo y sorprendente de la eficacia del conjugado anticuerpo-SN-38 dirigido a células cancerosas, que era sustancialmente más eficaz que el anticuerpo no conjugado y el agente quimioterapéutico libre por sí solos (no se muestra). También se observó la dosis-respuesta del efecto terapéutico del anticuerpo conjugado (no mostrado). Estos resultados demuestran la clara superioridad del conjugado SN-38-anticuerpo en comparación con el efecto combinado del anticuerpo no conjugado y del SN-38 libre en el mismo sistema *in vivo* de cáncer de pulmón humano.

Ejemplo 8. Uso de ADC (IMMU-132 o hRS7-SN-38) para tratar el cáncer de colon metastásico refractario a la terapia (mCRC)

[0281] La paciente era una mujer de 62 años con mCRC que originalmente presentó enfermedad metastásica en enero de 2012. Se sometió a una colectomía transversa ileal laparoscópica como primera terapia un par de semanas después del diagnóstico, y luego recibió 4 ciclos de quimioterapia FOLFOX (leucovorina, 5-fluorouracilo, oxaliplatino) en un contexto neoadyuvante antes de la hepatectomía derecha en marzo de 2012 para la extirpación de lesiones metastásicas en el lóbulo derecho del hígado. Esto fue seguido por un régimen FOLFOX adyuvante que se reanudó en junio de 2012, para un total de 12 ciclos de FOLFOX. En agosto, se retiró el oxaliplatino del régimen debido al empeoramiento de la neurotoxicidad. Su último ciclo de 5-FU fue el 25/09/12.

[0282] La CT realizada en enero de 2013 mostró metástasis en el hígado. A continuación, se la consideró buena candidata

para participar en el estudio de investigación IMMU-132 (hRS7-SN-38). Las comorbilidades de su historial médico incluyen asma, diabetes mellitus, hipertensión, hipercolesterolemia, soplo cardíaco, hernia hiatal, hipotiroidismo, síndrome del túnel carpiano, glaucoma, depresión, síndrome de piernas inquietas y neuropatía. Su historial quirúrgico incluye ligadura de trompas (1975), tiroidectomía (1983), colescistectomía (2001), liberación del túnel carpiano (2008) y cirugía de glaucoma.

[0283] En el momento de iniciar esta terapia, su lesión diana era un tumor de 3,1 cm en el lóbulo izquierdo del hígado. Las lesiones no diana incluían varias masas hipoatenuadas en el hígado. Su CEA basal era de 781 ng/mL.

[0284] IMMU-132 se administró en un esquema de infusión una vez por semana durante 2 semanas consecutivas, luego un descanso de una semana, constituyendo esto un ciclo de tratamiento. Estos ciclos se repitieron según la tolerancia. La primera infusión de IMMU-132 (8mg/kg) se inició el 15 de febrero de 2013 y se completó sin acontecimientos destacables. Experimentó náuseas (grado 2) y fatiga (grado 2) durante el transcurso del primer ciclo y ha continuado el tratamiento desde entonces sin acontecimientos adversos importantes. Informó de alopecia y estreñimiento en marzo de 2013. La primera evaluación de la respuesta realizada (después de 6 dosis) el 04/08/2013 mostró una reducción de la lesión diana en un 29% por tomografía computarizada (CT). Su nivel de CEA disminuyó a 230 ng/mL el 25 de marzo de 2013. En la segunda evaluación de la respuesta (tras 10 dosis), el 23 de mayo de 2013, la lesión diana se redujo un 39 %, lo que constituyó una respuesta parcial según los criterios RECIST. Ha continuado el tratamiento, recibiendo 6 ciclos que constituyen 12 dosis de hRS7-SN-38 (IMMU-132) a 8 mg/kg. Su salud general y sus síntomas clínicos mejoraron considerablemente desde el inicio de este tratamiento en investigación.

Ejemplo 9. Terapia ADC con IMMU-132 para cánceres sólidos metastásicos

[0285] IMMU-132 es un ADC que comprende el metabolito activo de CPT-11, SN-38, conjugado por un engarce sensible al pH (relación media fármaco-anticuerpo = 7,6) con el anticuerpo monoclonal humanizado hRS7 anti-Trop-2, que presenta una rápida internalización cuando se une a Trop-2. IMMU-132 se dirige a Trop-2, una proteína transmembrana de tipo I expresada con gran prevalencia y especificidad por muchos carcinomas. En este ejemplo se presenta un ensayo clínico de fase I de 25 pacientes con diferentes tipos de cáncer metastásico (páncreas, 7; mama triple negativo [TNBC], 4; colorrectal [CRC], 3; gástrico, 3, esofágico, prostático, ovárico, pulmón no microcítico, pulmón microcítico [SCLC], renal, amigdalario, vejiga urinaria, 1 cada uno) tras fracasar una media de 3 tratamientos previos (algunos incluían fármacos inhibidores de la topoisomerasa-I y -II).

[0286] IMMU-132 se administró en ciclos repetidos de 21 días, con cada tratamiento administrado en los días 1 y 8. La dosificación se inició con 8 mg/kg/dosis (es decir, 16 mg/kg/ciclo), y se aumentó hasta 18 mg/kg antes de encontrar neutropenia limitante de la dosis, en un diseño de ensayo 3+3. La fatiga, la alopecia y la diarrea ocasional de leve a moderada fueron algunas de las toxicidades no hematológicas más frecuentes, y 2 pacientes notificaron también una erupción cutánea. Más del 80% de los 24 pacientes evaluables presentaron enfermedad estable o reducción tumoral (SD y PR) entre los diversos cánceres metastásicos como mejor respuesta mediante CT. Tres pacientes (CCR, CMNT, CPCP) tienen RP según RECIST; la mediana del TTP para todos los pacientes, excluidos los que padecen cáncer de páncreas, es >18 semanas. La neutropenia se ha controlado reduciendo la dosis a 8-10 mg/kg/dosis (16-20 mg/kg/ciclo).

[0287] La inmunohistoquímica mostró una fuerte expresión de Trop-2 en la mayoría de los tumores de pacientes archivados, pero no se detecta en el suero. Las correspondientes reducciones de los títulos de marcadores tumorales en sangre (por ejemplo, CEA, CA19-9) reflejaban las respuestas tumorales. No se han detectado anticuerpos o anticuerpos anti-SN-38 a pesar de las dosis repetidas. Las evaluaciones de las concentraciones máximas y mínimas de IMMU-132 en el suero muestran que el conjugado se elimina completamente en 7 días, un resultado esperado basado en estudios *in vitro* que muestran que el 50% del SN-38 se libera en el suero cada día. Estos resultados indican que este nuevo ADC, administrado en dosis que oscilan entre 16 y 24 mg/kg por ciclo, muestra un alto índice terapéutico en diversos cánceres sólidos metastásicos.

Ejemplo 10. IMMU-130, un ADC SN-38 dirigido contra CEACAM5, es terapéuticamente activo en el cáncer colorrectal metastásico (mCRC)

[0288] IMMU-130, un ADC de SN-38 conjugado por un engarce sensible al pH (7.6 relación promedio fármaco-anticuerpo) con el anticuerpo humanizado anti-CEACAM5 (labetuzumab), está completando dos ensayos de Fase I. En ambos casos, los pacientes elegibles con CCRm avanzado debían haber fracasado o haber recaído en tratamientos estándar, uno de los cuales era el fármaco inhibidor de la topoisomerasa I, CPT-11 (irinotecán), y un CEA plasmático elevado (>5 ng/mL).

[0289] IMMU-130 se administró cada 14 días (EOW) a dosis a partir de 2,0 mg/kg en el primer protocolo (IMMU-130-01). Se produjo neutropenia febril en 2 de 3 pacientes con 24 mg/kg; de lo contrario, con ≤16 mg/kg, se observó neutropenia (≥ Grado 2) en 7 pacientes, y uno de ellos también experimentó trombocitopenia. Un paciente [de 8 que recibieron ≥ 4 dosis (2 ciclos)] mostró una disminución del 40,6% de las lesiones diana hepáticas (a partir de 7 cm) y pulmonares (PR según RECIST) durante 4,7 meses, sin toxicidad importante, tolerando un total de 18 dosis a 16 mg/kg. El estudio continúa con una dosis de 12 mg/kg de EOW.

[0290] Dado que el SN-38 es más efectivo en células en fase S, una exposición más prolongada podría mejorar la eficacia. Así pues, en un segundo ensayo de fase I (IMMU-130-02), se intensificó la dosificación a dos veces por semana,

comenzando con 6 mg/kg/dosis durante 2 semanas (4 dosis) con 1 semana de descanso, como ciclo de tratamiento, en un diseño de ensayo 3+3. La neutropenia y la diarrea manejable fueron los principales efectos secundarios, hasta la reducción de la dosis a 4,0 mg/kg dos veces por semana, con resultados iniciales que indican que los ciclos múltiples son bien tolerados. Actualmente, se ha producido una reducción tumoral en 3 pacientes, con 1 en PR continuado (-46%) según RECIST, entre 6 pacientes que completaron ≥ 4 dosis (1 ciclo). En ambos ensayos, los títulos de CEA en sangre se correlacionaron con la respuesta tumoral, y los niveles altos no interfirieron con la terapia. No se han producido reacciones de anticuerpos ni de anticuerpos anti-SN-38, según las pruebas ELISA. En cada estudio, el ADC se aclaró en un 50% en las primeras 24 h, lo que supone una exposición mucho más prolongada que con las dosis típicas de la molécula parental, CPT-11. Estos resultados indican que este nuevo ADC, administrado en diferentes regímenes con una media de ~16-24 mg/kg/ciclo, muestra un alto índice terapéutico en pacientes con mCRC avanzado. Dado que CEACAM5 tiene una expresión elevada en los cánceres de mama y pulmón, así como en otros tumores epiteliales, puede ser una diana útil también en otros tipos de cáncer.

Ejemplo 11. Actividad antitumoral del anticuerpo inhibidor del punto de control solo o combinado con bsAb anti-Trop-2 \times anti-CD3, IFN- α o ADC anti-Trop-2

[0291] Para determinar si la actividad antitumoral del anticuerpo inhibidor del punto de control ejemplar, ipilimumab (anti-CTLA4) es sinérgica o inhibida por la adición de otros agentes terapéuticos, el mAb CTLA4 se evalúa solo o en combinación con el bsAb redireccionador de células T ejemplar (E1)-3s, con interferón- α (PEGINTERFERON®), o con el ADC ejemplar hRS7-SN-38 (IMMU-132) en modelos tumorales murinos. Los modelos de carcinoma de pulmón M109, fibrosarcoma SA1N y carcinoma de colon CT26 se eligen en función de la diferente sensibilidad a los distintos agentes y al bloqueo de CTLA4. Las células T humanas se coadministran con los anticuerpos.

[0292] Todos los compuestos se prueban a su dosis y horario óptimos. Cuando se utiliza en combinación, el mAb CTLA4 se inicia un día después de la primera dosis de IMMU-132, (E1)-3s o interferón- α . Para evaluar la eficacia se utilizan el porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral y el número de días necesarios para alcanzar el tamaño tumoral deseado. La actividad antitumoral se puntúa como: regresión completa (RC; tumor no palpable) o regresión parcial (RP; reducción del 50% del volumen tumoral). La sinergia se define como una actividad antitumoral significativamente superior ($p < 0,05$) a la actividad de la monoterapia con cada agente.

[0293] En el modelo de tumor de fibrosarcoma SA1N, que es sensible al bloqueo de CTLA4 y modestamente sensible a (E1)-3s, interferón- α e IMMU-132, la sinergia limitrofe es evidente con la combinación de CTLA4 mAb y (E1)-3s, mientras que no se observa ningún efecto con interferón- α . La monoterapia con IMMU-132 no produce una actividad antitumoral SA1N significativa. Sin embargo, la combinación de IMMU-132 con CTLA4 mAb produce sinergia. En el modelo de metástasis pulmonar M109 y el modelo de carcinoma de colon CT26, se detecta sinergia para el mAb CTLA4 combinado con cada uno de IMMU-132, (E1)-3s e interferón- α .

[0294] En resumen, la adición de CTLA4 mAb a interferón- α , IMMU-132, o (E1)-3s resulta en actividades sinérgicas dependientes del modelo. La sinergia se observa independientemente de la inmunogenicidad del tumor y sólo cuando al menos una de las terapias está activa. Todos los regímenes combinados se toleran bien y las terapias combinadas no parecen inhibir la actividad del mAb CTLA4. Se observa sinergia en tumores que no responden a CTLA4 mAb solo, lo que sugiere que los otros agentes terapéuticos podrían inducir la muerte celular inmunogénica.

Ejemplo 12. Terapia combinada con Anti-Trop-2 ADC (IMMU-132) e Interferón- α (PEGINTERFERONO) para tratar el cáncer de pulmón no microcítico metastásico refractario.

[0295] El paciente es un hombre de 60 años diagnosticado de cáncer de pulmón de células no pequeñas. El paciente recibe regímenes de quimioterapia con carboplatino, bevacizumab durante 6 meses y muestra una respuesta, y luego, tras progresar, recibe más cursos de quimioterapia con carboplatino, etopósido, TAXOTERE®, gemcitabina durante los 2 años siguientes, con respuestas ocasionales que no duran más de 2 meses. La paciente presenta entonces una masa mediastínica izquierda de 6,5 \times 4 cm y derrame pleural.

[0296] Después de firmar el consentimiento informado, el paciente recibe IMMU-132 a una dosis de 18 mg/kg cada dos semanas. Tras la primera semana de tratamiento, el paciente recibe una terapia combinada con IMMU-132 y PEGINTERFERON®. Durante las dos primeras inyecciones, se experimentan breves periodos de neutropenia y diarrea, con 4 deposiciones en 4 horas, pero éstos se resuelven o responden a la medicación sintomática en 2 días. Tras un total de 6 infusiones de IMMU-132 y 5 infusiones de PEGINTERFERON®, la evaluación por TAC de la lesión índice muestra una reducción del 22%, justo por debajo de una respuesta parcial pero una reducción definitiva del tumor. La paciente continúa con este tratamiento durante otros dos meses, cuando se observa por CT una respuesta parcial del 45% de reducción tumoral de la suma de los diámetros de la lesión índice, lo que constituye una respuesta parcial según los criterios RECIST. La terapia combinada parece proporcionar una respuesta sinérgica, en comparación con los dos agentes administrados por separado.

Ejemplo 13. Terapia combinada con ADC (IMMU-130) y bsAb redireccionador de células T (MT100) para tratar el cáncer de colon avanzado

[0297] La paciente es una mujer de 75 años diagnosticada inicialmente de cáncer de colon metastásico (estadio IV). Se le practica una hemicolectomía parcial derecha y una resección del intestino delgado, y a continuación recibe terapias FOLFOX, FOLFOX + bevacizumab, FOLFIRI + ramucirumab, y FOLFIRI + cetuximab durante un año y medio, cuando muestra progresión de la enfermedad, con diseminación de la enfermedad al fondo de saco posterior, epiploon, con ascitis en la pelvis y un derrame pleural en el lado derecho de la cavidad torácica. Su título basal de CEA justo antes de esta terapia es de 15 ng/mL. Se le administran 6 mg/kg de IMMU-130 (anti-CEACAM5-SN-38) dos veces por semana durante 2 semanas consecutivas, y luego una semana de descanso (ciclo de 3 semanas). Tras el primer ciclo, el paciente recibe una terapia combinada con IMMU-132 y el bsAb MT110 redireccionador de leucocitos, que se administra mediante infusión continua en el mismo ciclo de 3 semanas. Tras 5 ciclos, que se toleran muy bien, sin toxicidades hematológicas o no hematológicas importantes, su título plasmático de CEA disminuye modestamente a 1,3 ng/mL, pero en la evaluación a las 8 semanas muestra una reducción del 21% de las lesiones tumorales índice, que aumenta a una reducción del 27% a las 13 semanas. Sorprendentemente, tanto la ascitis como el derrame pleural del paciente disminuyen (desapareciendo este último) en este momento, mejorando así notablemente el estado general del paciente. La terapia combinada parece proporcionar una respuesta sinérgica, en comparación con los dos agentes administrados por separado.

Ejemplo 14. Terapia combinada con ADC (IMMU-130), Anti-Trop-2 × Anti-CD3 bsAb ((E1)-3s) e Interferón-α para el tratamiento de pacientes con cáncer gástrico y enfermedad metastásica en estadio IV.

[0298] El paciente es un varón de 52 años que buscó atención médica debido a molestias gástricas y dolor relacionado con la alimentación durante unos 6 años, y con pérdida de peso durante los últimos 12 meses. La palpación de la zona del estómago revela un bulto firme que luego se gastroscopia, revelando una masa ulcerosa en la parte inferior de su estómago. Se hace una biopsia y se diagnostica como adenocarcinoma gástrico. Las pruebas de laboratorio no revelan cambios anormales específicos, excepto que las pruebas de función hepática, LDH y CEA están elevadas, siendo esta última de 10,2 ng/mL. La patente se somete entonces a una tomografía por emisión de positrones de cuerpo entero, que revela, además del tumor gástrico, enfermedad metastásica en la axila izquierda y en el lóbulo derecho del hígado (2 pequeñas metástasis). Al paciente se le reseca el tumor gástrico y, a continuación, se le realizan mediciones basales por CT de sus tumores metastásicos. Cuatro semanas después de la operación, recibe 3 ciclos de quimioterapia combinada consistente en un régimen de cisplatino y 5-fluorouracilo (CF), pero no lo tolera bien, por lo que se le cambia a tratamiento con docetaxel. Parece que la enfermedad se estabiliza durante unos 4 meses, según los TAC, pero entonces las quejas de la paciente de mayor pérdida de peso, dolor abdominal, pérdida de apetito y fatiga extrema hacen que se repitan los TAC, que muestran un aumento del tamaño de las metástasis en una suma del 20% y una lesión sospechosa en el lugar de la resección gástrica original.

[0299] El paciente recibe entonces terapia experimental con IMMU-130 (anti-CEACAM5-SN-38) en un esquema semanal de 8 mg/kg. Después de la primera semana, se inicia la terapia combinada con IMMU-130, (E1)-3s e interferón-α. El paciente no presenta diarrea ni neutropenia durante las 4 semanas siguientes. A continuación, el paciente se somete a un estudio de CT para medir el tamaño de su tumor metastásico y ver la zona original de resección gástrica. El radiólogo mide, según los criterios RECIST, una disminución de la suma de las lesiones metastásicas, en comparación con el valor basal previo a la terapia, del 23%. No parece haber ninguna lesión clara en la zona de la resección gástrica original. En este momento, el título de ACE de la paciente es de 7,2 ng/mL, muy inferior al valor basal de 14,5 ng/mL. El paciente continúa con la terapia combinada semanal y, tras un total de 13 infusiones, sus estudios de CT muestran que ha desaparecido una metástasis hepática y que la suma de todas las lesiones metastásicas ha disminuido en un 41%, lo que constituye una respuesta parcial según RECIST. El estado general del paciente mejora y retoma sus actividades habituales mientras sigue recibiendo terapia de mantenimiento cada tres semanas. En la última medición de CEA en sangre, el valor es de 4,8 ng/mL, que está dentro del rango normal para un fumador, que es el caso de este paciente.

Ejemplo 15. Técnicas generales para Dock-and-Lock™

[0300] Las técnicas generales discutidas a continuación pueden usarse para generar complejos DNL™ con moléculas AD o DDD unidas a cualquier anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígeno, usando los métodos y composiciones divulgados.

Vectores de expresión

[0301] El vector plasmídico pdHL2 se ha utilizado para producir varios anticuerpos y constructos basados en anticuerpos. Véase Gillies et al., J Immunol Methods (1989), 125:191-202; Losman et al., Cancer (Phila) (1997), 80:2660-6. El vector de expresión di-cistrónico de mamíferos dirige la síntesis de las cadenas pesada y ligera de la IgG. Las secuencias del vector son en su mayoría idénticas para muchos constructos diferentes de IgG-pdHL2, existiendo las únicas diferencias en las secuencias del dominio variable (V_H y V_L). Utilizando herramientas de biología molecular conocidas por los expertos en la materia, estos vectores de expresión de IgG pueden convertirse en vectores de expresión Fab-DDD o Fab-AD.

[0302] Para generar vectores de expresión Fab-DDD, las secuencias codificantes para los dominios bisagra, CH2 y CH3 de la cadena pesada se sustituyeron por una secuencia que codifica los primeros 4 residuos de la bisagra, un engarce de 14 residuos y una fracción DDD, como los primeros 44 residuos de RIIα humano (denominado DDD1, SEQ ID N.º:1). Para generar vectores de expresión Fab-AD, las secuencias de los dominios bisagra, CH2 y CH3 de IgG se sustituyeron por una secuencia que codifica los 4 primeros residuos de la bisagra, un engarce de 15 residuos y una fracción AD, como una

AD sintética de 17 residuos denominada *AKAP-IS* (denominada AD1, SEQ ID N.º:3), que se generó mediante bioinformática y tecnología de matriz de péptidos y demostró que se une a dímeros RII α con una afinidad muy alta (0,4 nM). Véase Alto, et al. Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A (2003), 100:4445-50. Se diseñaron dos vectores transportadores para facilitar la conversión de los vectores IgG-pdHL2 en vectores de expresión Fab-DDD1 o Fab-AD1, como se describe a continuación. Preparación de CH1

[0303] El dominio CH1 se amplificó por PCR utilizando el vector plásmido pdHL2 como plantilla. El cebador PCR izquierdo consistía en el extremo aguas arriba (5') del dominio CH1 y un sitio de endonucleasa de restricción SacII, que se encuentra a 5' de la secuencia codificante CH1. El cebador derecho consistía en la secuencia que codifica los 4 primeros residuos de la bisagra (PKSC, SEQ ID N.º:102) seguida de cuatro glicinas y una serina, con los dos codones finales (GS) que comprenden un sitio de restricción Barn HI. El amplímero PCR de 410 pb se clonó en el vector de clonación PCR PGEMT® (PROMEGA®, Inc.) y se examinaron los clones en busca de insertos en la orientación T7 (5').

[0304] Se sintetizó un oligonucleótido dúplex para codificar la secuencia de aminoácidos de DDD 1 precedida por 11 residuos del péptido de engarce, con los dos primeros codones comprendiendo un sitio de restricción BamHI. En el extremo 3' se añaden un codón de parada y un sitio de restricción EagI. La secuencia polipeptídica codificada se muestra a continuación.
GSGGGGSGGGGSHIQIPPLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID N.º:103)

[0305] Se sintetizaron dos oligonucleótidos, designados RIIA1-44 superior y RIIA1-44 inferior, que se solapan en 30 pares de bases en sus extremos 3', y se combinaron para comprender los 154 pares de bases centrales de la secuencia DDD 1 de 174 pb. Los oligonucleótidos se recocieron y se sometieron a una reacción de extensión de cebadores con Taq polimerasa. Tras la extensión del cebador, el dúplex se amplificó mediante PCR. El amplímero se clonó en PGEMT® y se examinó en busca de insertos en la orientación T7 (5').

[0306] Se sintetizó un oligonucleótido dúplex para codificar la secuencia de aminoácidos de AD1 precedida por 11 residuos del péptido de engarce con los dos primeros codones que comprenden un sitio de restricción BamHI. En el extremo 3' se añaden un codón de parada y un sitio de restricción EagI. La secuencia polipeptídica codificada se muestra a continuación.
GSGGGGSGGGGSQIEYLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID N.º:104)

[0307] Se sintetizaron y recocieron dos oligonucleótidos superpuestos complementarios que codifican la secuencia peptídica anterior, designados AKAP-IS Top y AKAP-IS Bottom. El dúplex se amplificó mediante PCR. El amplímero se clonó en el vector PGEMT® y se examinó en busca de insertos en la orientación T7 (5').

Ligando DDD1 con CH1

[0308] Un fragmento de 190 pb que codifica la secuencia DDD1 fue extirpado de PGEMT® con las enzimas de restricción BamHI y NotI y luego ligado en los mismos sitios en CH1-PGEMT® para generar el vector transportador CH1-DDD1-PGEMT®.

Ligando AD1 con CH1

[0309] Un fragmento de 110 pb que contiene la secuencia AD1 fue extirpado de PGEMT® con BamHI y NotI y luego ligado en los mismos sitios en CH1-PGEMT® para generar el vector transportador CH1-AD1-PGEMT®.

[0310] Con este diseño modular, tanto CH1-DDD1 como CH1-AD1 pueden incorporarse a cualquier constructo IgG en el vector pdHL2. Todo el dominio constante de la cadena pesada se sustituye por una de los constructos anteriores eliminando el fragmento de restricción SacII/EagI (CH1-CH3) de pdHL2 y sustituyéndolo por el fragmento SacII/EagI de CH1-DDD1 o CH1-AD1, que se extrae del vector transportador PGEMT® correspondiente.

C-DDD2-Fd-hMN-14-pdHL2

[0311] C-DDD2-Fd-hMN-14-pdHL2 es un vector de expresión para la producción de C-DDD2-Fab-hMN-14, que posee una secuencia de dominio de dimerización y acoplamiento de DDD2 (SEQ ID N.º:2) anexada al extremo carboxilo de la Fd de hMN-14 a través de un engarce peptídico Gly/Ser de 14 residuos de aminoácidos. La proteína de fusión secretada se compone de dos copias idénticas de hMN-14 Fab unidas por la interacción no covalente de los dominios DDD2.

[0312] El vector de expresión se diseñó de la siguiente manera. Se fabricaron sintéticamente dos oligonucleótidos superpuestos y complementarios, que comprenden la secuencia de codificación de parte del péptido de engarce y los residuos 1-13 de DDD2. Los oligonucleótidos fueron recocidos y fosforilados con T4 PNK, dando lugar a salientes en los extremos 5' y 3' que son compatibles para la ligación con ADN digerido con las endonucleasas de restricción BamHI y PstI, respectivamente.

[0313] El ADN dúplex se ligó con el vector transportador CH1-DDD1-PGEMT®, que se preparó mediante digestión con BamHI y PstI, para generar el vector transportador CH1-DDD2-PGEMT®. Se extirpó un fragmento de 507 pb de CH1-

DDD2-PGEMT® con SacII y EagI y se ligó con el vector de expresión de IgG hMN-14(I)-pdHL2, que se preparó mediante digestión con SacII y EagI. El constructo de expresión final se designó C-DDD2-Fd-hMN-14-pdHL2. Se han utilizado técnicas similares para generar proteínas de fusión DDD2 de los fragmentos Fab de diversos anticuerpos humanizados.

5 h679-Fd-AD2-pdHL2

[0314] h679-Fab-AD2, fue diseñado para acoplarse a C-DDD2-Fab-hMN-14. h679-Fd-AD2-pdHL2 es un vector de expresión para la producción de h679-Fab-AD2, que posee una secuencia de dominio de anclaje de AD2 (SEQ ID N.º:4) anexada al extremo carboxilo terminal del dominio CH1 a través de un engarce peptídico Gly/Ser de 14 residuos de aminoácidos. AD2 tiene un residuo de cisteína que precede y otro que sigue a la secuencia del dominio de anclaje de AD1.

[0315] El vector de expresión se diseñó de la siguiente manera. Se fabricaron sintéticamente dos oligonucleótidos superpuestos y complementarios (AD2 Top y AD2 Bottom), que comprenden la secuencia codificante de AD2 y parte de la secuencia de engarce. Los oligonucleótidos fueron recocidos y fosforilados con T4 PNK, dando lugar a salientes en los extremos 5' y 3' que son compatibles para la ligación con ADN digerido con las endonucleasas de restricción BamHI y SpeI, respectivamente.

[0316] El ADN dúplex se ligó al vector transportador CH1-AD1-PGEMT®, que se preparó mediante digestión con BamHI y SpeI, para generar el vector transportador CH1-AD2-PGEMT®. Un fragmento de 429 pares de bases que contenía las secuencias codificantes CH1 y AD2 se extirpó del vector transportador con las enzimas de restricción SacII y EagI y se ligó al vector h679-pdHL2, preparado por digestión con esas mismas enzimas. El vector de expresión final es h679-Fd-AD2-pdHL2.

25 *Generación de Constructo DNL™TF2*

[0317] Se obtuvo un constructo DNL™ trimérico designado TF2 haciendo reaccionar C-DDD2-Fab-hMN-14 con h679-Fab-AD2. Se generó un lote piloto de TF2 con un rendimiento >90% como sigue. La proteína L purificada C-DDD2-Fab-hMN-14 (200 mg) se mezcló con h679-Fab-AD2 (60 mg) en una proporción molar 1,4:1. La concentración total de proteínas fue de 1,5 mg/ml en PBS con 1 mM de EDTA. Los pasos subsiguientes consistieron en la reducción TCEP, cromatografía HIC, oxidación DMSO y cromatografía de afinidad IMP 291. Antes de la adición de TCEP, la SE-HPLC no mostró ninguna evidencia de formación de a₂b. La adición de 5 mM de TCEP dio lugar rápidamente a la formación de un complejo a₂b consistente con una proteína de 157 kDa esperada para la estructura binaria. TF2 se purificó hasta casi la homogeneidad mediante cromatografía de afinidad IMP 291 (no se muestra). El IMP 291 es un péptido sintético que contiene el hapteno HSG al que se une el Fab 679 (Rossi et al., 2005, Clin Cancer Res 11:7122s-29s). El análisis SE-HPLC de la fracción no unida de IMP 291 demostró la eliminación de las cadenas a₄, a₂ y kappa libres del producto (no mostrado).

[0318] La funcionalidad de TF2 se determinó mediante el ensayo BIACORE®. TF2, C-DDD1-hMN-14+h679-AD1 (utilizado como muestra de control del complejo a₂b no covalente), o C-DDD2-hMN-14+h679-AD2 (utilizado como muestra de control de los componentes a₂ y b no reducidos) se diluyeron a 1 µg/ml (proteína total) y se pasaron por un sensorchip inmovilizado con HSG. La respuesta de TF2 fue aproximadamente el doble que la de las dos muestras de control, lo que indica que sólo el componente h679-Fab-AD de las muestras de control se uniría al sensorchip y permanecería en él. Inyecciones posteriores de WI2 IgG, un anticuerpo antiidiotípico para hMN-14, demostraron que sólo TF2 tenía un componente DDD-Fab-hMN-14 que estaba estrechamente asociado con h679-Fab-AD, como indicaba una respuesta de señal adicional. El aumento adicional de unidades de respuesta resultante de la unión de WI2 a TF2 inmovilizado en el sensorchip correspondía a dos sitios de unión plenamente funcionales, cada uno de ellos aportado por una subunidad de C-DDD2-Fab-hMN-14. Esto se confirmó por la capacidad de TF2 para unirse a dos fragmentos Fab de WI2 (no mostrado).

50 *Producción de Constructo DNL™TF10*

[0319] Se utilizó un protocolo similar para generar un constructo DNL™ TF10 trimérico, que comprendía dos copias de un C-DDD2-Fab-hPAM4 y una copia de C-AD2-Fab-679. El anticuerpo biespecífico TF10 ([hPAM4]₂ × h679) se produjo utilizando el método descrito anteriormente para la producción del bsAb TF2 (anti CEA)₂ × anti HSG. El constructo TF10 lleva dos Fabs PAM4 humanizados y un Fab 679 humanizado.

[0320] Las dos proteínas de fusión (hPAM4-DDD2 y h679-AD2) se expresaron independientemente en células de mieloma transfectadas de forma estable. Se combinaron los líquidos sobrenadantes de los cultivos tisulares, con lo que se obtuvo un exceso molar doble de hPAM4-DDD2. La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente durante 24 horas en condiciones reductoras suaves utilizando 1 mM de glutatión reducido. Tras la reducción, la reacción se completó mediante oxidación suave utilizando 2 mM de glutatión oxidado. El TF10 se aisló mediante cromatografía de afinidad utilizando resina IMP291-afgig, que se une con alta especificidad al Fab h679.

Ejemplo 16. Producción de proteínas de fusión Fab e IgG ligadas a AD y DDD a partir de múltiples anticuerpos

[0321] Utilizando las técnicas descritas en el Ejemplo anterior, se construyeron las proteínas de fusión IgG y Fab mostradas en la Tabla 11 y se incorporaron en constructos DNL™. Las proteínas de fusión conservaron las características

de unión a antígeno de los anticuerpos parentales y los constructos DNL™ mostraron las actividades de unión a antígeno de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos incorporados.

Tabla 11. Proteínas de fusión que comprenden IgG o Fab

Proteína de Fusión	Especificidad de Unión
C-AD1-Fab-h679	HSG
C-AD2-Fab-h679	HSG
C-(AD)₂-Fab-h679	HSG
C-AD2-Fab-h734	Indio-DTPA
C-AD2-Fab-hA20	CD20
C-AD2-Fab-hA20L	CD20
C-AD2-Fab-hL243	HLA-DR
C-AD2-Fab-hLL2	CD22
N-AD2-Fab-hLL2	CD22
C-AD2-IgG-hMN-14	CEACAM5
C-AD2-IgG-hR1	IGF-1R
C-AD2-IgG-hRS7	EGP-1
C-AD2-IgG-hPAM4	MUC
C-AD2-IgG-hLL1	CD74

C-DDD1-Fab-hMN-14	CEACAM5
C-DDD2-Fab-hMN-14	CEACAM5
C-DDD2-Fab-h679	HSG
C-DDD2-Fab-hA19	CD19
C-DDD2-Fab-hA20	CD20
C-DDD2-Fab-hAFP	AFP
C-DDD2-Fab-hL243	HLA-DR
C-DDD2-Fab-hLL1	CD74
C-DDD2-Fab-hLL2	CD22
C-DDD2-Fab-hMN-3	CEACAM6
C-DDD2-Fab-hMN-15	CEACAM6
C-DDD2-Fab-hPAM4	MUC
C-DDD2-Fab-hR1	IGF-1R
C-DDD2-Fab-hRS7	EGP-1
N-DDD2-Fab-hMN-14	CEACAM5

55 Ejemplo 17. Uso de bsAbs dirigidos a leucocitos NK

[0322] El uso de bsAbs para reorientar leucocitos no se limita a anticuerpos contra células T. En realizaciones alternativas, los bsAbs que se unen a monocitos, células NK o neutrófilos también pueden usarse con fines de redireccionamiento.

60 [0323] CD16 es un receptor Fc-γ activador de baja afinidad para IgG, altamente expresado por el subconjunto ^{CD56dim} de células NK (Gleason et al., 2012, Mol Cancer Ther 11:2674-84). Además de su uso en el redireccionamiento de células NK, los bsAbs con un componente de anticuerpo anti-CD16 tienen la capacidad de activar la citotoxicidad mediada por NK a través de la señalización directa de CD16, induciendo la secreción dirigida de gránulos líticos y la muerte de la célula diana (Gleason et al., 2012).

65 [0324] Un generador biespecífico de células asesinas CD16/CD19 (BiKE) y un generador trispecífico de células asesinas

CD16/CD19/CD22 (TriKE) se preparan de acuerdo con (Gleason et al., 2012, Mol Cancer Ther 11:2674-84), utilizando técnicas de mezcla y ligación de ADN como se informó anteriormente (Vallera et al., 2005, Clin Cancer Res 11:3879-88). La BiKE y la TriKE expresadas se purifican mediante intercambio iónico secuencial y cromatografía en columna de exclusión por tamaño. Las PBMC en reposo se exponen a células tumorales primarias de ALL y CLL en presencia de CD16/CD19 BiKE o CD16/CD19/CD22 TriKE (10 µg/mL). Se observa un aumento significativo de la citotoxicidad para las células tumorales en presencia de BiKE o TriKE, en comparación con las células sin el anticuerpo de redireccionamiento. No se observa ningún efecto en las células tumorales expuestas a BiKE o TriKE en ausencia de PBMC. La TriKE tiene un mayor efecto sobre la toxicidad de las células tumorales que la BiKE, lo que indica que la unión a un antígeno adicional de las células tumorales puede potenciar el efecto de redireccionamiento. Se obtienen resultados similares utilizando células NK purificadas en lugar de PBMC.

[0325] Se prepara un CD16/CD33 BiKE como se describe en Wiernik et al. (2013, Clin Cancer Res 19:3844-55). El BiKE se administra a ratones desnudos inyectados con células de xenoinjerto de leucemia promielocítica humana HL60, coadministradas con PBMC humanas. Los ratones tratados con BiKE muestran una disminución de la mortalidad y de la tasa de crecimiento tumoral en comparación con los ratones tratados con bsAbs de control. La adición de un ADC anti-CD33-SN-38 potencia aún más el efecto citotóxico del BiKE.

Ejemplo 18. Anticuerpos trivalentes de uso terapéutico

[0326] Se fabrica un constructo trivalente, triespecífico de orientación celular como se describe en la patente EP1309795B1 que comprende: (i) quimerizar o humanizar un mAb anti-CD16 de ratón como se describe en la patente US 618728 del que se deriva el Fab de la reivindicación 1 de EP1309795; (ii) construir un anticuerpo de cadena simple compuesto por el Fv del anticuerpo anti-Trop-2 humanizado descrito en US 7,238,785, y unir el scFv mediante un engarce al terminal carboxilo de la cadena ligera del Fab anti-CD16 de (i); y (iii) construir una cadena simple del Fv del anti-CD19 humanizado descrito en el documento US8486395 y unir el scFv mediante un engarce al terminal carboxilo del CH1 del Fab anti-CD16 del (ii).

[0327] El constructo trivalente se administra a un sujeto con cáncer de páncreas metastásico, en combinación con IMMU-132. Se observa una respuesta parcial y el tumor muestra una regresión de tamaño que dura 12 meses.

Ejemplo 19. Anticuerpo biespecífico Anti-Trop-2 × Anti-CD3

[0328] Se produjo un anticuerpo biespecífico (bsAb) como un fragmento variable de cadena única en tándem (scFv) para redirigir las células T a través de la unión de CD3 a células tumorales, particularmente carcinomas, a través de la orientación Trop-2. Trop-2 es un antígeno asociado a tumores (TAA) que podría ser muy eficaz para redireccionamiento de diversos cánceres epiteliales. Sin embargo, aún no se ha investigado en ningún formato de bsAb para la terapia redirigida a células T. Trop-2 es una glicoproteína transmembrana de 35 kDa que se sobreexpresa en relación con los tejidos normales en una variedad de cánceres humanos, incluidos los carcinomas pancreáticos y gástricos, donde el aumento de la expresión se correlaciona con un mal pronóstico (Fong et al., 2008, Br J Cancer 99:1290-5; Iacobuzio-Donahue et al., 2002, Am J Pathol 160:1239-49; Kapoor, 2013, Tumour Biol 34:1967-8; Muhlmann et al., 2009, J Clin Pathol 62:152-8; Stein et al., 1993, Int J Cancer 55:938-46). Los dominios variables (VH y VK) derivados de hRS7, la versión humanizada del mAb anti-Trop-2 murino original, RS7, se combinaron con los dominios variables del mAb anti-CD3 murino, Okt3, para generar el E1-3 bsAb.

Construcción de un vector plasmídico para la expresión de E1-3 en células de mamífero

[0329] Se sintetizó una secuencia de ADN de doble cadena (SEQ ID N.º:106) y se ensambló en el vector plásmido pUC57. SEQ ID N.º:106 se extrajo de pUC57 mediante digestión con las endonucleasas de restricción Xba I y Eag I, y se ligó al vector de expresión de mamíferos pdHL2, que se preparó mediante digestión con las mismas enzimas. La secuencia codificante dirige la síntesis de un polipéptido único (SEQ ID N.º:107) que comprende un péptido líder, hRS7VK (SEQ ID N.º:108), L1 (SEQ ID N.º:109), hRS7VH (SEQ ID N.º:110), L2 (SEQ ID N.º:111), Okt3VH (SEQ ID N.º:112), L3 (SEQ ID N.º:113), Okt3VK (SEQ ID N.º:114), y 6-His (SEQ ID N.º:105). Una representación esquemática del tándem scFv E1-3 se muestra en la FIG. 22.

Secuencia de ADN sintético que comprende el inserto E1-3

[0330]

tctagacacagggcccatcatgggatggagctgtatcatcctcttcttggtagcaacagctacaggtgtccactccgacattcagctga
 5 cccagtctccatcctcctgtctgcatctgtaggagacagagtcagcatcacctgcaaggccagtcaggatgtgagtattgctgtagcct
 ggtatcagcagaaaccagggaaagccccctaagctcctgatctactcggcatcctaccggtacactggagtcctgatagggtcagtg
 10 cagtggtatctgggacagatttactctcaccatcagcagctctgcaacctgaagattttgcagtttattactgtcagcaacattatattactcc
 gctcacgttcggtgctgggaccaaggtggagatcaaaggtggaggaggggtccggtggaggaggggtctggtggaggagggagcca
 ggtccagctgcagcaatctgggtctgagttgaagaagcctggggcctcagtgaagggttctgcaaggcttctggatacaccttcacaa
 15 actatggaatgaactgggtgaagcagggccctggacaagggcttaaatggatgggctggataaacacctacactggagagccaacat
 atactgatgacttcaaggacggtttgccttctccttggacacctctgtcagcacggcatatctccagatcagcagcctaaggctgacg
 acactgccgtgtatttctgtgcaagaggggggttcggtagtagctactggtacttcgatgtctggggccaagggtccctggtcaccgtct
 20 cctcaggtggcggaggggtccgatataagctgcagcagctctggagcagagctcgctcgaccaggagctagtgtgaagatgtcatgta
 aaacaagtggctatactttcaccgggtacactatgcactgggtcaagcagcggccaggacaggggtctggaatggatcggtacattaa
 25 ccccagcaggggatataccaactacaatcagaagtcaaggataaagccacctgactaccgacaagtccctctagtagcagcttatatgc
 agctgtcaagcctcacttccgaggactctgcagtgtattactgcgccagatattacgacgatcattattgtctggattactggggccaggg
 aacaactctcacagtgtcctctgtcgaaggtggcagtgaggaggtcaggtggcagcggaggggtccggtggagtggacgatatccagc
 30 tgaccagctctcctgccattatgagcgttccccaggcgagaaggtgacaatgacttgccgggcccagttcaagcgtcagctatatgaat
 tggatcagcagaagtctggaaccagtcctaaacgatggatctatgacacatctaaagtggcaagcgggggtcccatacaggttctctgg
 35 gagtgggtcaggcactagctattccctgaccatttctctatggaggccgaagatgcagccacctattactgtcagcagtgagggtcaaa
 tccactcaccttcggagcaggcactaaactggaactcaagcaccaccaccaccaccactaaggcggccg (SEQ ID NO: 106)

Secuencia de aminoácidos deducida de E1-3

[0331]

DIQLTQSPSSLSASVGDRVSITCKASQDVSIAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGV
 PDRFSGSGSGTDFLTITSSLQPEDFAVYYCQQHYITPLTFGAGTKVEIKGGGGSGGGG
 50 SGGGGSQVQLQQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFTNYGMNWVKQAPGQGLKWM
 GWINTYTGEPTYTDDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQISSLKADDTAVYFCARGGFGSSY
 WYFDVWGQGS�TVSSGGGGSDIKLQQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTM
 55 HWVKQRPQGQLEWIGYINPSRGYTNYNQKFQDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSED
 SAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTTLTVSSVEGGSGGSGGSGGSGGVDDIQLTQSP
 60 AIMSASPGEKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPYRFSGS
 GSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELKHSHHHHHH (SEQ ID
 NO: 107)

Secuencia de aminoácidos VK de hRS7

[0332]

5 DIQLTQSPSSLSASVGDRVSITCKASQDVSI VAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGV
PDRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQHYITPLTFGAGTKVEIK (SEQ ID
10 NO:108)

Secuencia de aminoácidos del L1 de engarce

0333); GGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID N°: 109)

15

Secuencia de aminoácidos VH hRS7

[0334]

20

QVQLQQSGSELKKPGASVKVSC KASGYTFTNYGMNWVKQAPGQGLKWMGWINTY
TGEPTYTDDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQISSLKADDTAVYFCARGGFGSSYWFYFDV
25 WGQGS LVTVSS (SEQ ID NO:110)

Secuencia de aminoácidos del L2 de engarce

30 [0335] GGGGS (SEQ ID N°:111)

Secuencia de aminoácidos VH de Okt3

[0336]

35

DIKLQQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRG
YTNYNQKFKDKATLTDDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQ
40 GTTLTVSS (SEQ ID NO:112)

Secuencia de aminoácidos del L3 de engarce

45 [0337] VEGGSGGSGGSGGSGGVD (SEQ ID N°:113)

Secuencia de aminoácidos de VK de Okt3

[0338]

50

DIQLTQSPA IMSASPGEKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASG
VPYRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLE (SEQ ID
55 NO:114)

Desarrollo de un clon de producción estable en células de mieloma SpESF

60

[0339] El vector E1-3-pdHL2 se linealizó mediante digestión con la endonucleasa de restricción Sal I y se utilizaron 30 µg para transfectar de forma estable 1×10^7 células de mieloma SpESFX (Rossi et al., 2011, Biotechnol Prog 27:766-75) mediante electroporación utilizando dos pulsos a 850 V y 10 µF. Los medios de selección y producción se complementaron con 0,2 µM de metotrexato (MTX). Los clones transfectantes se seleccionaron en placas de cultivo tisular de 96 pocillos y se analizaron para determinar la expresión de E1-3 mediante ELISA utilizando placas Ni-NTA de 96 pocillos. La proteína E1-3 se purificó a partir del caldo de cultivo de cultivos en botella de rodillo mediante cromatografía de afinidad de metales inmovilizados (IMAC) utilizando resina níquel-SEPHAROSE®, seguida de cromatografía líquida de alto rendimiento por

65

exclusión de tamaño (SE-HPLC). El producto purificado se resolvió como un único pico SE-HPLC (no mostrado) y una única banda polipeptídica por SDS-PAGE (no mostrado), con movilidades relativas coherentes con su tamaño molecular calculado de 53.423 Da.

5 Ejemplo 20: Eliminación ex vivo de células tumorales sólidas Trop-2 por células T redirigidas

[0340] Se prepararon células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a partir de la capa leucocitaria de muestras de sangre de dos donantes sanos (Blood Center of NJ), y se utilizaron para el aislamiento de células T CD8⁺ (Miltenyi). Las líneas celulares Capan-1 (cáncer de páncreas, 157.000 Trop-2/célula), BxPC3 (cáncer de páncreas, 500.000 Trop-2/célula) y NCI-N87 (cáncer gástrico, 247.000 Trop-2/célula) (ATCC) se utilizaron como células diana que expresaban niveles bajos, altos y medios de Trop-2. BxPC3 y NCI-N87 se mantuvieron en medio RPMI1640 suplementado con un 10% de FBS, mientras que las células Capan-1 se mantuvieron en un 20% de FBS/RPMI1640. Se combinaron células T CD8⁺ ($1,2 \times 10^5$ células/pocillo) con células diana (2×10^4 células/pocillo) en una proporción de 6:1 en placas de cultivo tisular de 96 pocillos. Se añadieron titulaciones de E1-3 y (E1)-3s a las placas de ensayo. Tras 48 horas de incubación a 37 °C, las placas se lavaron dos veces con PBS para eliminar las células T y, a continuación, se añadieron a cada pocillo 150 µl de medio fresco suplementado con reactivo MTS al 30% (CELLTITER 96® Aqueous One Solution, Promega). La absorbancia a 490 nm se midió tras 1-2 h a 37°C con un lector de placas ENVISION®.

[0341] La potencia *in vitro* del anticuerpo biespecífico E1-3 se comparó con la del constructo DNL equivalente, (E1)-3s, en tres líneas celulares que expresan Trop-2 (BxPC3, Capan-1 y NCI-N87) utilizando células T de tres donantes para cada línea celular (FIG. 23). Basándose en los valores IC₅₀ (Tabla 12), E1-3 es al menos 5 veces más potente que (E1)-3s en las tres líneas celulares, cuya sensibilidad relativa a E1-3 parece correlacionarse con la densidad del antígeno Trop-2, cuando se compara con células T del mismo donante. Sin embargo, la potencia varió entre las células T donantes utilizadas. *In vitro*, E1-3 mediaba una lisis altamente potente de células diana BxPC3 [IC₅₀=0,09(±0,04) pM], Capan-1 [IC₅₀=1,2(±1,1) pM] y NCI-N87 [IC₅₀=1,2(±1,2) pM].

Tabla 12. Valores IC₅₀ para la destrucción ex vivo redirigida por células T de líneas celulares de cáncer Trop-2⁺ con E1-3 y (E1)-3s.

	BxPC3			Capan-1			NCI-N87		
Trop-2	500.000/células			157.000/células			247.000/células		
	Donante	Donante	Donante	Donante	Donante	Donante	Donante	Donante	Donante
	1	2	3	1	2	4	1	2	5
E1-3	0.12	0.10	0.05	0.58	2.7	0.47	0.29	0.76	2.50
(E1)-3s	1.08	0.58	0.32	35.6	248	8.51	8.78	34	NA*

Valores de IC₅₀ = concentración pM resultando en destrucción del 50%.

* No logró destruir el de 50%. Los donantes 1 y 2 eran los mismos para cada donante. Donantes, 3, 4 y 5 fueron donantes independientes.

Ejemplo 21: Terapia in vivo de tumores sólidos con E1-3 vs. (E1)-3s

[0342] Se administraron inyecciones subcutáneas a ratones NOD/SCID hembras de 4-8 semanas de edad de una mezcla de PBMC y NCI-N87 (2:1) mezclada con un volumen igual de MATRIGEL®. La terapia consistió en inyecciones i.v. de 50 µg de (E1)-3s los días 1 y 4, o inyecciones diarias con 47 µg de (E1)-3s los días 1 a 5. El grupo no tratado recibió la mezcla de NCI-N87 y PBMC sin bsAb. El volumen tumoral (VT) se determinó dos veces por semana mediante mediciones en dos dimensiones con calibradores, definiéndose los volúmenes como: $L \times w^2/2$, donde L es la dimensión más larga del tumor y W la más corta (FIG. 24). El análisis estadístico del crecimiento tumoral se basó en el área bajo la curva (AUC). Los perfiles de crecimiento tumoral individual se obtuvieron mediante modelización de curvas lineales. Se empleó una prueba F para determinar la igualdad de varianza entre los grupos antes del análisis estadístico de las curvas de crecimiento. Una prueba Z crítica sobre los datos de supervivencia identificó cualquier valor atípico dentro de un grupo de tratamiento dado con $P < 0,05$ censurado del análisis final de datos. Se utilizó una prueba t de dos colas para evaluar la significación estadística entre los distintos grupos de tratamiento y los controles, excepto para el control no tratado, en el que se utilizó una prueba t de una cola. Además, la eficacia se determinó mediante log-rank con el programa Prism en curvas de Kaplan-Meier utilizando criterios de valoración sustitutivos de la supervivencia como el tiempo de progresión tumoral (TTP) hasta 1,0 cm³. La significación se consideró al $P \leq 0,05$ para todas las comparaciones.

[0343] Tanto E1-3 (P) como (E1)-3s retrasaron el crecimiento de tumores NCI-N87 significativamente ($P \leq 0.001$; AUC_{dia25}) (FIG. 24). El E1-3 fue superior al (E1)-3s ($P=0,0324$, AUC_{dia36}) (FIG. 24). *In vivo*, dos dosis de 50-µg de E1-3 administradas

con tres días de intervalo curaron a todos los ratones (N=8) portadores de xenoinjertos NCI-N87 ($P=0,0005$; Log-Rank). Los tumores del grupo de control (sólo PBMC) alcanzaron el criterio de valoración ($TV > 1 \text{ cm}^3$) a los 39,5 días. Todos los ratones del grupo E1-3 estaban libres de tumores al cabo de 78 días.

5 Ejemplo 22: Trogocitosis inducida por anticuerpos biespecíficos anti-CD3 anti-Trop-2

10 [0344] Trop-2 tiene una presencia limitada en tejidos normales pero está altamente expresado en diversos cánceres epiteliales. Como se ha comentado en los Ejemplos anteriores, (E1)-3s es un complejo DNL[®] trivalente de anticuerpos biespecíficos (bsAb) redireccionadores de células T, que comprende un scFv anti-CD3 unido covalentemente a un dímero estabilizado de un Fab dirigido a Trop-2. Mostramos aquí por primera vez que la trogocitosis bidireccional mediada por bsAb se produce entre células diana y células T e implica la formación de sinapsis inmunológicas.

Métodos

15 [0345] Las células BxPC3 fueron desprendidas con tripsina (que no afecta a Trop-2) y mezcladas con células T purificadas. Las mezclas celulares se trataron con 0,1 nmol/L de bsAbs a 37°C durante 1 hora. Las células se tiñeron con: (i) anti-Trop-2 MABC518 seguido de GAM-FITC, o (ii) anti-Trop-2-PE clon MR54 y anti-CD4-APC. Las células BxPC3 y T individuales se separaron de los conjugados celulares mediante dispersión frontal y lateral, así como mediante fluorescencia Trop-2 y CD4.

Resultados

25 [0346] (E1)-3s induce la formación de sinapsis inmunológicas entre las células T y las células diana. Esto se demostró utilizando células de carcinoma pancreático Capan-1 (Rossi et al., 2013, MAb 6:381-91). Aquí, la adición de 0,1 µg/mL de (E1)-3s a una mezcla de células T CD8⁺ purificadas y células de carcinoma gástrico NCI-N87, que estaban marcadas en la membrana con fluorescencia roja y verde, respectivamente, dio lugar a la formación de conjugados evidentes por microscopía de fluorescencia (no mostrado). No se observaron conjugados en presencia de (19)-3s (no mostrado) o TF12 (no mostrado), que se unen sólo a células T o NCI-N87, respectivamente. La inmersión de los portaobjetos en solución salina eliminó la gran mayoría de las células T en los pocillos que contenían (19)-3s o TF12, mientras que muchas células T permanecieron unidas a las células NCI-N87 adherentes en los pocillos tratados con (E1)-3s.

35 [0347] El tratamiento de BxPC3 (500,000 Trop-2/célula) y mezclas purificadas de células T con (E1)-3s indujo específicamente trogocitosis, por lo cual Trop-2 fue transferido de BxPC3 a células TMATRIGEL[®] (FIG. 25). Mientras que el tratamiento con (E1)-3s dio lugar a un 40% de células T Trop-2⁺, se contó con <5% de células T en la puerta Trop-2⁺ tras el tratamiento con bsAbs de control que se unían sólo a Trop-2 (TF12) o CD3 [(20)-3s], o con (E1)-3s en ausencia de células BxPC3. La captación de Trop-2 por las células T coincidió con su reducción en las células BxPC3 (FIG. 26). Durante el corto tiempo de incubación, las células T (97,5% vivas) y BxPC3 (94,5% vivas) permanecieron con una alta viabilidad, lo que indica que las células T adquirieron los antígenos tumorales por trogocitosis y no por adherencia a fragmentos de membrana de células muertas (no mostrado). La trogocitosis mediada por (E1)-3s fue bidireccional, ya que los componentes de la membrana de las células T se transfirieron a las células BxPC3, como se demostró para CD4 (datos no mostrados).

Ejemplo 23: Anticuerpos biespecíficos Anti-CD3 × Anti-Trop-2 y liberación de citoquinas

45 [0348] Como se discutió en los Ejemplos anteriores, estudiamos los efectos del interferón-α (IFNα) en la eliminación de células T mediada por (E1)-3s de líneas celulares de cáncer gástrico y pancreático humano. La activación de células T, la inducción de citocinas y la citotoxicidad se evaluaron ex vivo utilizando células mononucleares de sangre periférica (PBMC) o células T con cáncer gástrico NCI-N87 como células diana. En presencia de células diana y PBMC, (E1)-3s no provocó una producción excesiva de citoquinas. Cuando se combinó con (E1)-3s, el peginterferonalfa-2a -que por sí solo no aumentó la activación de las células T ni elevó los niveles de citocinas por encima de los basales- incrementó la expresión de CD69 pero no aumentó significativamente la inducción de citocinas. El IFNα potenció la eficacia terapéutica de (E1)-3s sin aumentar la producción de otras citocinas hasta niveles que pudieran inducir el síndrome de liberación de citocinas (CRS). La terapia adyuvante con IFNα, u otras citocinas, podría ser de aplicación universal para mejorar la eficacia de la inmunoterapia con células T.

Métodos

60 [0349] La liberación de citoquinas se midió ex vivo utilizando 5×10^5 células/0,5 mL/pocillo de NCI-N87, que se dejaron adherir durante la noche, o Raji. Se añadieron a cada pocillo PBMC recién aisladas (5×10^6 células/0,4 mL/pocillo). Los tratamientos (100 µL, 10x) que comprendían (19)-3s, 19-3 BiTE, (E1)-3s, peginterferonalfa-2a, o (E1)-3s más peginterferonalfa-2a se añadieron a 0,1 nmol/L para cada reactivo. Alternativamente, se utilizaron titulaciones que oscilaban entre 1 pmol/L y 10 nmol/L para los estudios dosis-respuesta. Tras una incubación de 20 horas a 37°C con agitación suave, el líquido sobrenadante se diluyó 1:2 (o más cuando fue necesario) y se midieron las concentraciones de TNFα, IFNγ, IL2, IL6 e IL10 utilizando kits ELISArray de un solo analito (Qiagen), siguiendo el protocolo del fabricante.

Resultados

[0350] No se disponía de un Trop-2 × CD3 BiTE (o equivalente) para la comparación con (E1)-3s. Sin embargo, la disponibilidad tanto del (19)-3s, que tiene la misma configuración molecular (X)-3s que el (E1)-3s, como del 19-3 BiTE, que tiene la misma secuencia de aminoácidos que el CD19 × CD3 BiTE, blinatumomab, permitió realizar una comparación directa para evaluar la potencia relativa inductora de citocinas de los dos formatos de bsAb.

[0351] Inicialmente, titulaciones de (19)-3s y 19-3 BiTE fueron añadidas a mezclas de PBMCs (dos donantes independientes), y células Raji NHL y los niveles de TNFα, IFNγ, e IL6 fueron medidos después de 20 horas (no mostrado). Se detectaron niveles mínimos de citoquinas a partir de PBMC solas, incluso con la adición de un bsAb. Sin embargo, debido a una reacción linfocitaria mixta que se produce entre Raji y las PBMC del donante (más fuerte para el donante A), los niveles de citocinas en las mezclas de células no tratadas fueron elevados para cada uno de TNFα (200 y 50 pg/mL), IFNγ (600 y 200 pg/mL) e IL6 (190 y 220 pg/mL). Los niveles de TNFα e IL6 aumentaron por encima de los no tratados sólo a ≥1 nmol/L (19)-3 s. Aparentemente, (19)-3s inhibió la producción de TNFα e IL6 a concentraciones más bajas. En comparación, el TNFα y la IL6 se elevaron a >1.000 pg/mL en todas las concentraciones de 19-3 BiTE probadas (≥1 pmol/L). Los niveles de IFNγ no aumentaron significativamente con (19)-3s, mientras que 19-3 BiTE mostró un aumento dependiente de la dosis hasta >2.000 pg/mL.

[0352] Para todas las comparaciones posteriores, los agentes se probaron a 0,1 nmol/L, que es aproximadamente lo que se ha utilizado en estudios similares con BiTE (Brandl et al., Cancer Immunol Immunother 2007, 56:1551-63). Comparamos los niveles de TNFα, IFNγ, IL2, IL6 e IL10 inducidos por 0,1 nmol/L (19)-3s o 19-3 BiTE de Raji mezclado con PBMC, utilizando 4 donantes diferentes (**FIG. 27A**). Con cada uno de los 4 donantes, los niveles de cada una de las cinco citocinas fueron significativamente superiores con 19-3 BiTE, en comparación con (19)-3s. La concentración media de TNFα con 19-3 BiTE (2.284 ± 1.483 pg/mL) fue 8 veces mayor ($P=0,0001$) que con (19)-3s (280 ± 188 pg/mL). El tratamiento con 19-3 BiTE, en comparación con (19)-3s, dio lugar a niveles de IFNγ (3.002 ± 560 pg/mL vs. 416 ± 169 pg/mL), IL2 (13.635 ± 2.601 pg/mL vs. 1.024 ± 598 pg/mL), IL6 (981 ± 364 pg/mL vs. 168 ± 96 pg/mL), e IL10 (4.006 ± 2.520 pg/mL vs. 493 ± 242 pg/mL) que fueron 7-, 13-, 6- y 8 veces superiores para 19-3 BiTE, respectivamente ($P < 0,0001$ para cada uno). Estos resultados indican que el formato (X)-3s bsAb es un inductor considerablemente menos potente de la liberación de citoquinas, en comparación con el formato BiTE.

[0353] En general, (E1)-3s en presencia de PBMCs y células diana causó incluso menos producción de citoquinas que (19)-3s, porque no hay reacción linfocitaria mixta para elevar los niveles basales (**FIG. 27B**). Los niveles se mantuvieron bajos para las citocinas proinflamatorias IFNγ (<100 pg/mL), TNFα (<100 pg/mL) e IL2 (<250 pg/mL) en 4 de 5 donantes. La IL6 era baja (<400 pg/mL) en 3 de los 5 donantes, y moderada (800-1.100 pg/mL) en los donantes D-2 y D-5. El donante D-2 también respondió a los (E1)-3 más que los demás para IFNγ (1.000 pg/mL) y TNFα (190 pg/mL). La IL10, una citocina antiinflamatoria, se elevó significativamente ($P < 0,0001$) por (E1)-3s hasta >1.200 pg/mL en 3 de 5 donantes. Cabe destacar que el donante D-2, que presentaba una respuesta proinflamatoria excepcionalmente potente, produjo niveles relativamente bajos de IL10 (230 pg/mL) tras el tratamiento con (E1)-3s. La peginterferonalfa-2a sola no aumentó el nivel de ninguna citocina por encima del nivel de fondo. La adición de peginterferonalfa-2a a (E1)-3s aumentó sistemáticamente el IFNγ (~1,5-3 veces) con respecto a (E1)-3s solo. Para el resto de las citocinas, hubo una aparente tendencia a una aumentó moderadamente la producción con la combinación; sin embargo, no se observó un efecto consistente.

Ejemplo 24. *In Vitro* Citotoxicidad inducida por anticuerpos biespecíficos anti-CD3 × anti-Trop-2

[0354] Se realizaron estudios adicionales para examinar la citotoxicidad *in vitro* inducida por anticuerpos biespecíficos anti-CD3 × anti-Trop-2.

Métodos

[0355] Células T CD8⁺ recién aisladas se incubaron durante 24 h con 0,1 nM peginterferonalfa-2a, 0,1 nM 20*-2b, o solo medio. Se combinaron células T tratadas o no tratadas y células NCI-N87 marcadas con fluorescencia verde PKH67 en una proporción de 5:1 (5×10^4 células diana y $2,5 \times 10^5$ células efectoras/pocillo) en placas de 48 pocillos que contenían diluciones seriadas de (E1)-3s por triplicado. Peginterferonalfa-2a o 20*-2b se mantuvieron a 0,1 nM en las mezclas celulares apropiadas. Las placas se incubaron durante 48 h a 37°C. Se extrajeron las células en suspensión y las células adheridas se desprendieron con tripsina-EDTA y se combinaron con la suspensión correspondiente. Las células se lavaron y se resuspendieron en BSA-PBS al 1% que contenía 30.000 perlas de recuento absoluto COUNTBRIGHT™ (Life Technologies) y 1 µg/mL de 7-AAD. Las células diana vivas totales (7-AAD/PKH67⁺) se contaron mediante citometría de flujo. Para cada muestra, se contaron 8.000 microesferas COUNTBRIGHT™ como referencia normalizada. La lisis específica (%) se calculó mediante la fórmula $[1 - (A_1/A_2)] \times 100$, donde A_1 y A_2 representan el número de células diana viables en las muestras de ensayo y no tratadas, respectivamente. Se determinó la significación estadística ($P \leq 0,05$) para IC₅₀ (la concentración que produce un 50% de lisis), EC₅₀ (50% de concentración efectiva) y lysis^{max} (lisis máxima de la célula diana) mediante la prueba F en curvas de regresión no lineal (dosis-respuesta sigmoideal) con el software Prism.

Resultados

[0356] Para evaluar la destrucción redirigida por células T de células tumorales que expresan Trop-2, se mezclaron células

T CD8⁺ con células NCI-N87 en presencia o ausencia de IFN- α 2 (0,1 nM peginterferonalfa-2a o 20*-2b) junto con titulaciones de (E1)-3s (**FIG. 28**). Se observó una considerable variabilidad en la potencia de las células T entre los donantes (**FIG. 28A, FIG. 28B**). Con un donante de células T muy activas, (E1)-3s mediaba una lisis de células T muy potente ($IC_{50}=0,37$ pM; $lysis^{max}=77,1\%$) de células NCI-N87, y la inclusión de peginterferonalfa-2a potenciaba su actividad, mejorando la IC_{50} (0,14 pM; $P=0,0001$) en más de 2,5 veces y aumentando la $lysis^{max}$ (84,0%; $P<0,0001$) (**FIG. 28A**). El NCI-N87 fue sólo débilmente sensible a las acciones directas del IFN- α (peginterferonalfa-2a $IC_{50} = >10$ nM, datos no mostrados), e inhibido $<10\%$ por 0,1 nM de peginterferonalfa-2a en ausencia de (E1)-3s. La forma más potente de IFN α , 20*-2b, que consiste en 4 moléculas de IFN- α fusionadas a un mA b bivalente anti-CD20 por DNL[®], mejoró la potencia de (E1)-3s en más de 7 veces ($IC_{50}=0,05$ pM; $P<0,0001$). A 0,1 nM, el 20*-2b inhibió el NCI-N87 en un 12,6% en ausencia de (E1)-3s. El 20*-2b se incluyó sólo para mostrar una mayor actividad con otra forma (más potente) de IFN- α , y que el efecto no se limita al peginterferonalfa-2a. La fracción mA b anti-CD20 no es funcional en este experimento. En un ensayo similar utilizando células T donantes muy débiles, (E1)-3s fue considerablemente menos potente ($EC_{50}=39$ pM; $lysis^{max}=21\%$); sin embargo, la adición de peginterferonalfa-2a aumentó la potencia en >25 veces ($EC_{50}=1,4$ pM; $P=0,0008$) (**FIG. 28B**). También se observó una potente destrucción de células T mediada por (E1)-3s en la línea de cáncer de páncreas humano BxPC3 ($IC_{50}=0,4$ pM); sin embargo, el efecto de añadir IFN- α no se evaluó con esta línea celular (no se muestra).

Ejemplo 25: Curvas dosis-respuesta para la activación de células T por anticuerpos biespecíficos anti-CD3 \times anti-Trop-2

[0357] La adición de 0.1 nM peginterferonalfa-2a aumentó la regulación CD69 en células T tratadas con (E1)-3s moderada, pero significativamente. En los experimentos (E1)-3s dosis-respuesta que miden el % de células T CD69⁺, la EC_{50} se redujo de 26 pM a 16 pM ($P<0,0001$) para las células T CD4⁺, y de 11 pM a 6 pM ($P=0,0204$) para las células T CD8⁺ en presencia de IFN- α (**FIG. 29A**). Peginterferonalfa-2a combinado con (E1)-3s dio lugar a más células CD69⁺ (**FIG. 29B, FIG. 29C**, $P<0,0001$), y además, las células activadas tenían una expresión de CD69 significativamente mayor con IFN- α (**FIG. 29B, FIG. 29D**; MFI= 907 vs 726; $P<0,0001$). La peginterferonalfa-2a indujo una expresión mínima de CD69 en ausencia de (E1)-3s. Asimismo, (E1)-3, solo o en combinación con peginterferonalfa-2a, no activó las células T en ausencia de células diana.

Ejemplo 26: Supervivencia *In Vivo* Ampliada con (E1)-3s se aumenta con IFN- α

[0358] Los datos preliminares sobre supervivencia *in vivo* reportados en el Ejemplo 3 anterior se extendieron hasta 126 días. Como se muestra a continuación, la combinación de (E1)-3s con IFN- α proporcionó el mayor beneficio para los animales portadores de tumores xenoinjertados Trop-2⁺.

Métodos

[0359] Ratones hembra NOD/SCID de 4-8 semanas de edad (Charles River, Wilmington, MA) fueron inyectados s.c. con una mezcla de 5×10^6 células tumorales (Capan-1 o NCI-N87) y células T ($2,5 \times 10^6$) combinadas con un volumen igual de matrigel. La terapia comenzó 1 h después mediante inyección i.v., según la metodología BiTE (Dreier et al., 2003, J Immunol 170:4397-402). Los regímenes de tratamiento, las dosis y el número de animales de cada experimento se describen en las leyendas de las figuras. El volumen tumoral se determinó dos veces por semana mediante mediciones en dos dimensiones con calibradores, definiéndose los volúmenes como: $L \times w^2/2$, donde L es la dimensión más larga del tumor y w la más corta.

[0360] El análisis estadístico del crecimiento tumoral se basó en el área bajo la curva (AUC). Los perfiles de crecimiento tumoral individual se obtuvieron mediante modelización de curvas lineales. Se empleó una prueba F para determinar la igualdad de varianza entre los grupos antes del análisis estadístico de las curvas de crecimiento. Una prueba Z crítica sobre los datos de supervivencia identificó cualquier valor atípico dentro de un grupo de tratamiento dado con $P \leq 0,05$ censurado del análisis final de datos. Se utilizó una prueba t de dos colas para evaluar la significación estadística entre los distintos grupos de tratamiento y los controles, excepto para el control no tratado, en el que se utilizó una prueba t de una cola. Además, la eficacia se determinó mediante log-rank con el programa Prism en curvas de Kaplan-Meier utilizando criterios de valoración sustitutivos de la supervivencia como el tiempo de progresión tumoral hasta 1,0 cm³. La significación se consideró al $P \leq 0,05$ para todas las comparaciones.

Resultados

[0361] La eficacia *in vivo* con cáncer pancreático humano se evaluó con xenoinjertos Capan-1. En el primer estudio, el tratamiento con una combinación de (E1)-3s y peginterferonalfa-2a [tiempo medio de supervivencia (TSM) >59 días] fue superior a todos los demás tratamientos ($P<0,0007$, log-rank), incluidos (E1)-3s (TSM = 50 días) o peginterferonalfa-2a (TSM = 53 días) solos (**FIG. 30A**). Incluso con la omisión de células T, peginterferonalfa-2a prolongó la supervivencia (MST = 45 días, $P=0,0059$ frente a solución salina, log-rank), lo que indica una acción directa sobre las células tumorales. Sin embargo, peginterferonalfa-2a fue más eficaz en presencia de células T ($P=0,0260$, AUC), lo que sugiere una estimulación de las células T por IFN- α . El TF12, que se une a las células diana pero no a las células T, no afectó al crecimiento ni a la supervivencia del tumor. Un experimento repetido, utilizando células T de un donante diferente, confirmó los resultados del primer estudio (**FIG. 30B**). El segundo estudio continuó hasta que todos los grupos alcanzaron su MST.

Al igual que en el experimento inicial, la combinación de (E1)-3s y peginterferonalfa-2a (MST = 119,5 días) fue superior a todos los demás grupos tanto en términos de inhibición del crecimiento tumoral como de supervivencia global ($P=0,0475$ frente a (E1)-3s solo; $P<0,0001$ frente a todos los demás grupos; log-rank). (E1)-3s (MST = 68 días) fue superior ($P=0,0373$, AUC en 29 días) a peginterferonalfa-2a con células T (MST = 53 días) y a las células T solas (MST = 37,5 días; $P=0,0014$ log-rank).

[0362] Para el modelo de xenoinjerto de cáncer gástrico NCI-N87 (**FIG. 30C**), la combinación de (E1)-3s y peginterferonalfa-2a (MST>88 días) fue superior a (E1)-3s solo (MST=49 días; $P=0,0007$, log-rank). En comparación con el grupo de control con sólo células T (MST=32 días), peginterferonalfa-2a solo con células T proporcionó sólo una ventaja de supervivencia menor, pero significativa (MST=35 días; $P=0,0276$). (E1)-3s más peginterferonalfa-2a sin células T no mejoró significativamente la supervivencia.

[0363] La densidad de antígeno medida para NCI-N87 [247,000(±65,000) Trop-2/célula] y Capan-1 [157,000 (±37,000) Trop-2/célula] no fue significativamente diferente. En comparación con NCI-N87, las células Capan-1 fueron >5 veces más sensibles ($IC_{50}=2$ nM frente a >10 nM) a la inhibición directa por peginterferonalfa-2a *in vitro* (no mostrado). (E1)-3s no presenta reacción cruzada con Trop-2 o CD3 de ratón (no mostrado), y los ratones NOD-SCID son deficientes en células T.

Debate

[0364] En esta sección se discuten los resultados presentados en los Ejemplos 23-26. En los Ejemplos 1 y 2 anteriores describimos el uso del formato bsAb (X)-3s para redirigir la terapia mediada por células T tanto de tumores hematopoyéticos como de tumores sólidos utilizando varios constructos de ejemplo, incluyendo (E1)-3s, (19)-3s y (20)-3s. En un experimento *in vivo* de ese estudio, en el que se trataron xenoinjertos de Capan-1 con (E1)-3s, incluimos grupos con peginterferonalfa-2a, porque datos anteriores (no publicados) mostraban que Capan-1 era inhibido por IFN- α . La sorprendente mejora observada con la adición de IFN- α dio lugar a nuevas investigaciones, que condujeron a los estudios actuales. Los resultados de los estudios con anticuerpos biespecíficos redireccionadores de células T, en combinación con peginterferonalfa-2a, se presentan en este documento. Los estudios se prolongaron hasta que todos los grupos alcanzaron su MST, lo que confirmó que el IFN- α puede potenciar la eficacia *in vivo* de la eliminación de células T de una línea celular sensible al IFN- α . El IFN- α también puede potenciar la destrucción mediada por células T de una línea celular que es poco sensible a las acciones directas del IFN- α . Estos estudios *in vivo* se llevaron a cabo siguiendo los métodos, incluidos la dosificación y los calendarios, utilizados habitualmente con los constructos BiTE.

[0365] Flieger y colegas demostraron que la destrucción *in vitro* por células NK-T CD3⁺CD56⁺, que fueron expandidas *ex vivo* y redirigidas con un EpCAMxCD3 BiTE (MT110), fue mejorada con IFN- α o IL-2 (Flieger et al., 2000, Cancer Immunol Immunother 49:441-8). Sin embargo, incluso en ausencia del bsAb, el IFN- α inhibió significativamente las células diana. Dado que faltaba un control para evaluar los posibles efectos directos del IFN- α sobre las células diana, no se pudo determinar en qué medida la citotoxicidad mejorada se debía a que el IFN- α estimulaba las células NK-T, en comparación con la inhibición directa de las células diana. Por lo tanto, medimos la sensibilidad al IFN- α para ambas células diana e incluimos grupos con peginterferonalfa-2a solamente, tanto en presencia como en ausencia de células pan-T. En el caso de los tumores Capan-1, que fueron más sensibles al IFN- α *in vitro*, el peginterferonalfa-2a mejoró la supervivencia en ausencia de células T, y aún más en presencia de células T, lo que indica que el IFN- α actuó tanto sobre Capan-1 como sobre las células T en este modelo. En ausencia de células T, peginterferonalfa-2a no mejoró la supervivencia de los ratones portadores de xenoinjertos NCI-N87, que eran poco sensibles al IFN- α *in vitro*, lo que indica que la mejora con IFN- α se debió principalmente a sus acciones sobre las células T. El mecanismo de la potenciación de las células T observada por el IFN- α no está claro. El aumento de la expresión de CD69 atribuido al IFN- α fue moderado, pero significativo, lo que sugiere que la citocina puede potenciar la activación de células T inducida con el bsAb. Además, el IFN- α aumentó específicamente (hasta 3 veces) la liberación de IFN- γ , que se considera la principal citocina citotóxica producida por las células T citotóxicas, mientras que ninguna de las otras citocinas medidas aumentó de forma consistente.

[0366] La terapia combinada con IFN- α y un bsAb redireccionador de células T no se ha investigado clínicamente, ni siquiera en modelos animales. Sin embargo, la IL-2 se combinó con un fragmento F(ab')₂ de un cuádrima anti-CD3/EpCAM en un ensayo clínico (Kroesen et al., 1997, Cancer Immunol Immunother 45:203-6), pero el tratamiento fue limitado debido a la considerable toxicidad causada muy probablemente por la inducción de citoquinas secundarias, conocida como CRS o tormenta de citoquinas. Se sabe que la administración sistémica de IL-2 induce una tormenta de citoquinas (Panelli et al., 2004, J Transl Med 2:17), y la gravedad de los acontecimientos adversos asociados a la CRS, como en el caso del ensayo catastrófico TGN1412, se correlaciona con la liberación de IL-2 (Eastwood et al., 2013, Br J Clin Pharmacol 76:299-315). Aunque no está exenta de efectos secundarios, la inmunoterapia con IFN- α , que no es producido por las células T, no suele asociarse a una tormenta de citoquinas.

[0367] La CRS es un riesgo asociado a la inmunoterapia que utiliza cualquier mAb dirigido a células T (por ejemplo, Otk3) o bsAb, incluido BiTE (Klinger et al., 2012, Blood 119:6226-33). Sin embargo, no todos los formatos de bsAb tienen necesariamente el mismo riesgo. Brandl et al. informaron de la inducción de citoquinas con blinatumomab, donde los niveles de respuesta de IL-2, IL-6, IFN- γ y TNF- α fueron variables entre los donantes y normalmente alcanzaron un máximo de > 1 ng/mL, con algunos donantes alcanzando niveles de hasta 5 ng/mL (Brandl et al., 2007, Cancer Immunol

Immunother 56:1551-63). Carecíamos de un BiTE adecuado, o constructo equivalente, para la comparación directa con (E1)-3s. Sin embargo, pudimos comparar la potencia relativa de inducción de citocinas entre los formatos (X)-3s y BiTE, utilizando un BiTE CD19XCD3 (secuencia idéntica a la de blinatumomab) y (19)-3s fabricado por DNL®. La 19-3 BiTE indujo niveles de citocinas similares a los descritos por Brandl y sus colegas en condiciones similares. Los niveles de las cinco citocinas medidas fueron entre 7 y 13 veces superiores en el caso de la 19-3 BiTE, en comparación con los de la (19)-3s. El uso de células de linfoma extrañas (Raji) provocó una reacción linfocitaria mixta, que aumentó los niveles basales de citocinas, en particular para la IL-2. El BiTE, pero no el (19)-3s, aumentó los niveles de citocinas muy por encima del nivel basal de linfocitos mixtos. El uso de células de carcinoma gástrico NCI-N87 como diana de (E1)-3s no aumentó los niveles basales de citocinas. Observamos una variabilidad esperada en la respuesta de los donantes a (E1)-3s; sin embargo, los niveles de citocinas resultantes fueron incluso inferiores a los inducidos por (19)-3s, en particular para TNF- α e IFN- γ , que fueron <100 pg/mL. No obstante, uno de los cinco donantes presentaba niveles elevados (~1 ng/mL) de IFN- γ e IL-6. La adición de IFN- α (peginterferonalfa-2a) a (E1)-3s multiplicó por 2-3 el IFN- γ , pero no afectó de forma consistente a los niveles de las demás citocinas. Estos resultados sugieren que, en comparación con otros constructos, como BiTE, el formato (X)-3s bsAb tiene menos probabilidades de inducir CRS, y la adición de IFN- α a un régimen terapéutico no aumenta este riesgo.

[0368] Observamos una variabilidad considerable en la potencia de las células T del donante. Los resultados *in vitro* mostrados en la **FIG. 28** representan las células T más y menos activas que hemos probado, con una diferencia de 100 veces en potencia ($IC_{50} = 0,37$ pM vs. 39 pM) para matar NCI-N87; sin embargo, un $IC_{50} = 1-5$ pM es lo más representativo (>10 donantes) y las células T de baja actividad fueron atípicas. En particular, la lisis con las células T más débiles aumentó con el IFN- α más que con las células T potentes.

[0369] EpCAM es un TAA ampliamente explotado que se sobreexpresa en muchos carcinomas. Sin embargo, la expresión heterogénea de EpCAM en los carcinomas y el hecho de que EpCAM no sea específica del tumor, ya que se expresa en la mayoría de los epitelios normales, hacen temer que la inmunoterapia dirigida a EpCAM pueda tener efectos secundarios graves (Balzar et al., 1999, J Mol Med (Berl) 77:699-712; Momburg et al., 1987, Cancer Res 47:2883-91). Al igual que EpCAM, Trop-2 está altamente expresada en diversos carcinomas, pero su expresión en tejidos normales es objeto de debate. Varios informes indican que, en contraste con las células tumorales, los tejidos somáticos adultos muestran poca o ninguna expresión de Trop-2, que está invariablemente regulada al alza en los tumores, independientemente de la expresión de referencia en los tejidos normales (Wang et al., 2008, Mol Cancer Ther 7:280-5; Zhang et al., 1997, Science 276:1268-72). Sin embargo, pruebas recientes indican la expresión de Trop-2 en epitelios de varios tejidos normales (Trerotola et al., 2013, Oncogene 32:222-33). No obstante, la expresión de Trop-2 en monos Cynomolgus no dio lugar a toxicidades tras la administración de dosis razonablemente altas de hRS7 (anti-Trop-2 humanizado) conjugado con SN-38 como conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) (Cardillo et al., 2011, Clin Cancer Res 17:3157-69). Además, en los estudios clínicos con este ADC anti-Trop-2, no se observó un aumento de la toxicidad en órganos normales, aparte de la neutropenia y la diarrea manejables, esperadas del fármaco (un metabolito del irinotecán), a dosis terapéuticas (Starodub et al., Proceedings of the 105th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research. 2014 (abstr CT206)). Por lo tanto, se espera que la inmunoterapia, incluida la terapia dirigida a células T, que utiliza Trop-2 como diana tumoral, tenga un índice terapéutico similar o superior en comparación con regímenes similares de redireccionamiento de EpCAM.

[0370] Este es el primer informe de trogocitosis entre el tumor diana y las células T mediada por un bsAb. Este hallazgo demuestra que los conjugados diana/célula T inducidos con (E1)-3s tienen sinapsis inmunológicas funcionales. Hemos observado una trogocitosis bidireccional similar entre los linfocitos B y los linfocitos T, mediada por (19)-3s (datos no publicados), y creemos que es probable que se trate de un fenómeno común con los bsAbs redireccionadores de linfocitos T.

Ejemplo 27: Estudios adicionales con anticuerpos biespecíficos E1-3

Resumen

[0371] Se produjo un scFv tándem biespecífico redireccionador de células T, E1-3, como se describe en el Ejemplo 19 anterior, utilizando los dominios variables de hRS7 (mAb humanizado anti-Trop-2) y Okt-3 (mAb anti-CD3). Los estudios descritos en este Ejemplo continúan y amplían los resultados mostrados en los Ejemplos 20-25. Cualquier discrepancia entre los resultados instantáneos comunicados y los mostrados en los Ejemplos 20-25 se basa en la recopilación de datos adicionales. La activación, proliferación, inducción de citocinas y citotoxicidad de las células T se evaluaron *ex vivo* utilizando PBMC o células T purificadas con líneas celulares de cáncer de páncreas humano (Capan-1 y BxPC-3) y gástrico (NCI-N87) como células diana. La actividad *in vivo* se ensayó con xenoinjertos NCI-N87 inoculados s.c. en una mezcla con el doble de PBMC humanas y matrigel.

Resultados

[0372] En presencia de células diana y PBMC, E1-3 indujo potentemente la activación de células T, la proliferación y una producción de citocinas dependiente de la dosis de IL-2 (>2 ng/mL), IL-6 (>1 ng/mL), IL-10 (>7 ng/mL), TNF- α (>1 ng/mL) e IFN- γ (>50 ng/mL). Utilizando 3 - 5 donantes de células T diferentes, E1-3 mediaba una lisis altamente potente de células diana BxPC-3 [$IC_{50}=0,09(\pm 0,04)$ pM], Capan-1 [$IC_{50}=1,2(\pm 1,1)$ pM] y NCI-N87 [$IC_{50}=1,2(\pm 1,2)$ pM] *in vitro*. *In vivo*, dos dosis de 50- μ g de E1-3 administradas con tres días de intervalo curaron a 6 de 8 ratones portadores de xenoinjertos NCI-

N87 ($P<0,0001$; Log-Rank). Los tumores del grupo de control (sólo PBMC) alcanzaron el criterio de valoración ($TV>1\text{ cm}^3$) con una mediana de 39,5 días. Siete de los 8 animales no habían alcanzado el criterio de valoración, y seis de los ratones del grupo E1-3 seguían libres de tumores cuando se dio por concluido el experimento al cabo de 176 días.

[0373] Activación y proliferación de células T - Células T CD8⁺ purificadas se mezclaron 5:1 con células NCI-N87, se trataron durante 18 h con 0,01 nM E1-3 y se analizaron por citometría de flujo. CD69 fue regulado al alza por E1-3 en presencia de células diana (no mostrado). Los tratamientos con omisión de células diana E1-3 o NCI-N87 no indujeron la expresión de CD69 (no se muestra). Además, las células T experimentaron un aumento de la dispersión frontal (FSC) y lateral (SSC) tras el cultivo en presencia de E1-3 y células diana (no mostrado). La proliferación de células T fue evidente a los tres días ($P<0,005$, datos no mostrados).

[0374] Liberación de citoquinas - Se determinó la capacidad del scFv biespecífico en tándem E1-3 para inducir la liberación de las citoquinas IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-6 e IL-10 en función de la dosis. Como se muestra en la **FIG. 31**, el anticuerpo biespecífico E1-3 indujo eficazmente la liberación de citocinas en el intervalo de concentración picomolar.

[0375] Destrucción mediada por células T *in vitro* - La capacidad de E1-3 para inducir la destrucción mediada por células T de células diana de cáncer pancreático y gástrico se determinó en presencia de células T CD8⁺ purificadas ($1,2 \times 10^5$ /pocillo). En la **FIG. 1** se muestra una curva dosis-respuesta ejemplar utilizando células T de un donante representativo. **32**. En este experimento, los valores de IC_{50} para E1-3 fueron de 0,6 pM para Capan-1, 0,1 pM para BxPC-3 y 0,3 pM para NCI-N87.

[0376] Efectos antitumorales *in vivo* de E 1-3 - Ratones desnudos portadores de xenoinjertos NCI-N87 fueron tratados con dos dosis de 50- μ g de E1-3 administradas con tres días de diferencia. El tratamiento (**FIG. 33A**) curaron a 6 de 8 ratones portadores de xenoinjertos de cáncer gástrico humano ($P<0,0001$; Log-Rank). En comparación con los tumores del grupo de control (tratados sólo con PBMCs) alcanzaron el criterio de valoración ($TV>1\text{ cm}^3$) con una mediana de 39,5 días (**FIG. 33B**). Cuando se dio por finalizado el estudio al cabo de 176 días, siete de los ocho animales del grupo E1-3 no habían alcanzado el criterio de valoración.

Conclusiones

[0377] Los estudios anteriores muestran que Trop-2 es un blanco atractivo para la destrucción mediada por células T de cánceres pancreáticos, gástricos y otros cánceres epiteliales. El anticuerpo biespecífico E1-3 anti-Trop-2 \times anti-CD3 indujo una potente activación de células T y producción de citocinas. El E1-3 fue muy eficaz para destruir tumores sólidos *in vitro* e *in vivo*.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo biespecífico para su uso en un método de tratamiento de un cáncer que expresa Trop-2 induciendo una respuesta inmunitaria frente a un cáncer que expresa Trop-2, en el que el método comprende administrar el anticuerpo biespecífico y un anticuerpo inhibidor de puntos de control a un sujeto con un cáncer que expresa Trop-2. El anticuerpo biespecífico comprende un primer fragmento de anticuerpo y un segundo fragmento de anticuerpo, en el que el anticuerpo biespecífico comprende un primer fragmento de anticuerpo y un segundo fragmento de anticuerpo, en el que tanto el primer fragmento de anticuerpo como el segundo fragmento de anticuerpo son cada uno un scFv y, en el que el anticuerpo biespecífico comprende un sitio de unión para Trop-2 y un sitio de unión para CD3, y en el que el anticuerpo biespecífico comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 107 uniéndose a Trop-2.
2. El anticuerpo biespecífico para uso según la reivindicación 1, en el que el método comprende además administrar al sujeto al menos un agente terapéutico seleccionado del grupo que consiste en (i) un interferón seleccionado del grupo que consiste en interferón- α , interferón- β , interferón- λ 1, interferón- λ 2 e interferón- λ 3; y (ii) un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC).
3. El anticuerpo biespecífico para uso según la reivindicación 2, en el que el interferón es interferón- α .
4. El anticuerpo biespecífico para uso según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo inhibidor del punto de control se selecciona del grupo que consiste en lambrolizumab (MK-3475), nivolumab (BMS-936558), pidilizumab (CT-011), AMP-224, MDX-1105, MEDI4736, MPDL3280A, BMS-936559, ipilimumab, lirumab, IPH2101 y tremelimumab.
5. El anticuerpo biespecífico para uso según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo inhibidor del punto de control se une a un antígeno seleccionado del grupo que consiste en CTLA4, PD1, PD-L1, LAG3, B7-H3, B7-H4, KIR y TIM3.
6. El anticuerpo biespecífico para uso según la reivindicación 2, en el que el conjugado anticuerpo-fármaco se selecciona del grupo que consiste en hLL1-doxorrubicina, hRS7-SN-38, hMN-14-SN-38, hLL2-SN-38, hA20-SN-38, hPAM4-SN-38, hLL1-SN-38, hRS7-Pro-2-P-Dox, hMN-14-Pro-2-P-Dox, hLL2-Pro-2-P-Dox, hA20-Pro-2-P-Dox, hPAM4-Pro-2-P-Dox, hLL1-Pro-2-P-Dox, P4/D10-doxorrubicina, gemtuzumab ozogamicina, brentuximab vedotin, trastuzumab emtansina, inotuzumab ozogamicina, glembatumomab vedotin, SAR3419, SAR566658, BIIB015, BT062, SGN-75, SGN-CD19A, AMG-172, AMG-595, BAY-94-9343, ASG-5ME, ASG-22ME, ASG-16M8F, MDX-1203, MLN-0264, ADC anti-PSMA, RG-7450, RG-7458, RG-7593, RG-7596, RG-7598, RG-7599, RG-7600, RG-7636, ABT-414, IMGN-853, IMGN-529, vorsetuzumab mafodotin y lorvotuzumab mertansine.
7. El anticuerpo biespecífico para uso según la reivindicación 2, en el que un ADC se administra antes que cualquier otro agente.
8. El anticuerpo biespecífico para uso según la reivindicación 3, en el que el interferón se administra como interferón libre, interferón PEGilado, una proteína de fusión de interferón o interferón conjugado con un anticuerpo.
9. El anticuerpo biespecífico para uso según la reivindicación 1, en el que el cáncer que expresa Trop-2 es un carcinoma de esófago, páncreas, pulmón, estómago, colon, recto, vejiga urinaria, mama, ovario, útero, riñón o próstata.
10. El anticuerpo biespecífico para uso según la reivindicación 1, en el que el método comprende además administrar al sujeto un agente terapéutico seleccionado del grupo que consiste en un segundo anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, un fármaco, una toxina, una enzima, un agente citotóxico, un agente antiangiogénico, un agente proapoptótico, un antibiótico, una hormona, un inmunomodulador, una citocina, una quimiocina, un oligonucleótido antisentido, un ARN interferente pequeño (ARNsi), un compuesto de boro y un radioisótopo.
11. El anticuerpo biespecífico para uso según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo biespecífico induce una respuesta inmunitaria frente a un cáncer que expresa Trop-2 sin aumentar la producción de citocinas a niveles capaces de inducir el síndrome de liberación de citocinas (CRS).

FIG. 1

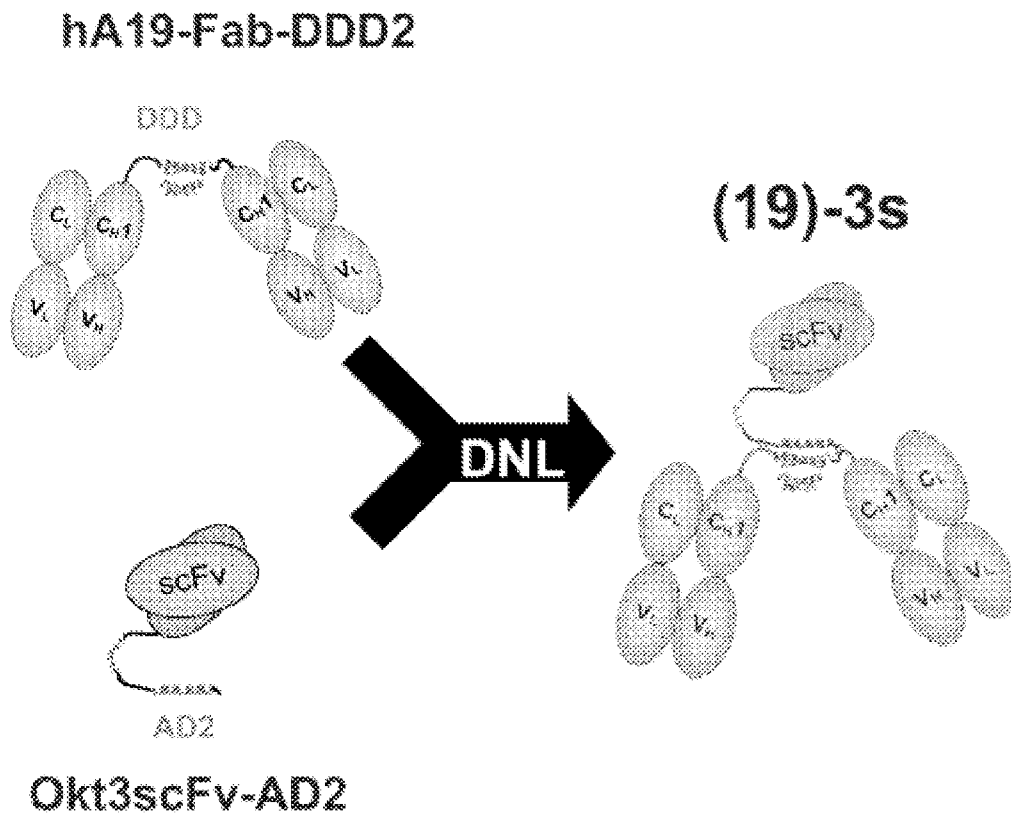


FIG. 2A

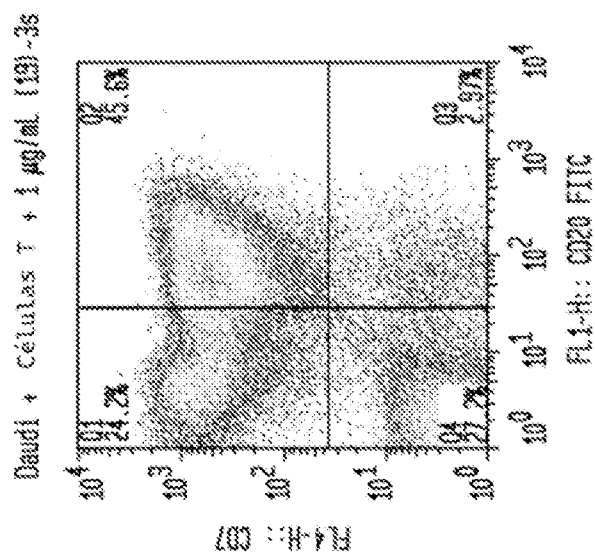


FIG. 2B

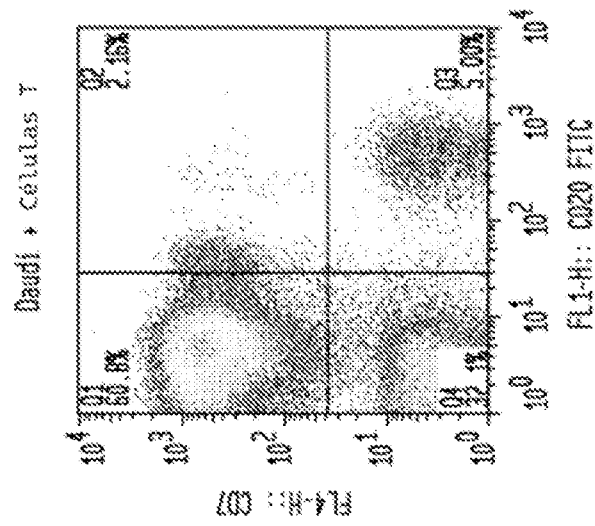
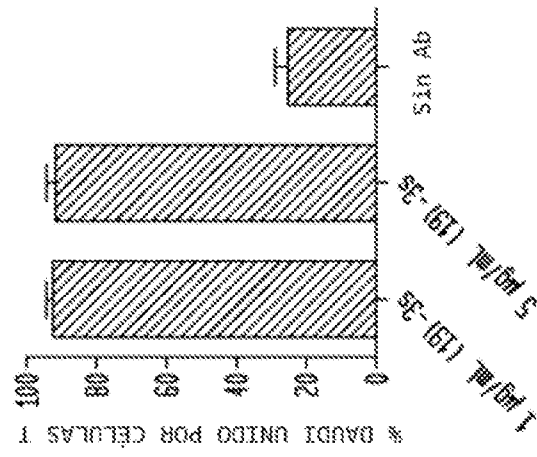


FIG. 2C



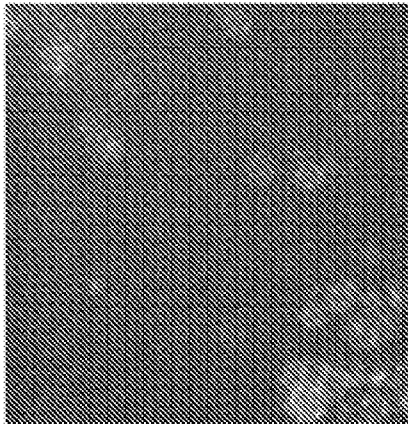


FIG. 3D

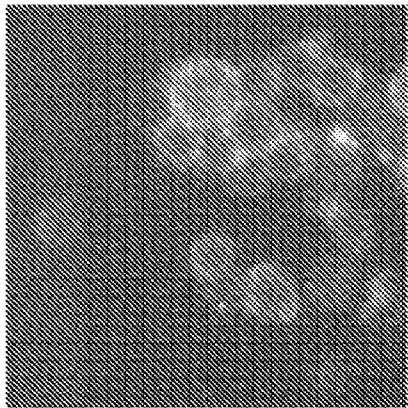


FIG. 3C

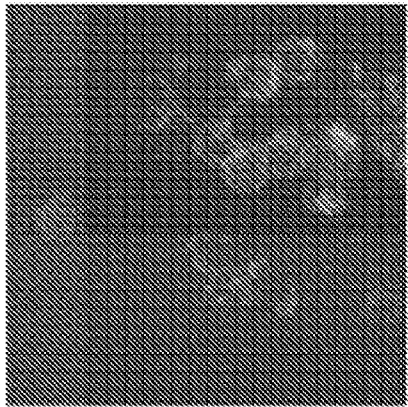


FIG. 3B

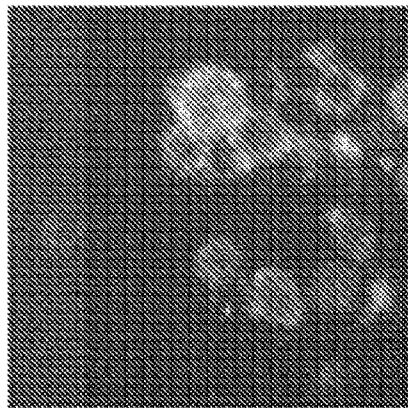
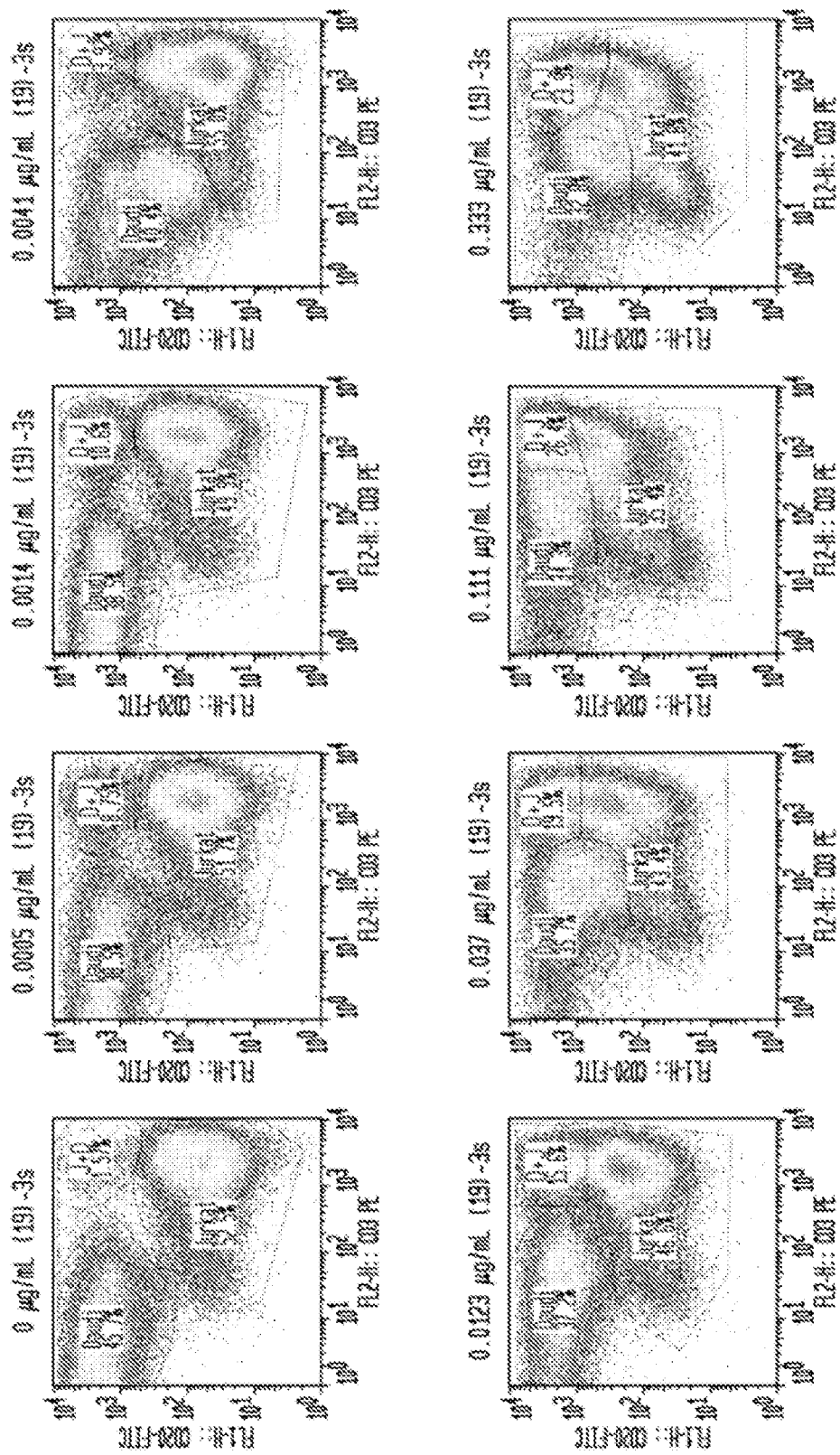


FIG. 3A

FIG. 4

Asociación célula a célula de Daudi y Jurkat mediada por (19)-3s



Comparación de la asociación célula-célula DART y BITE frente a la asociación célula-célula (19)-3s utilizando linfocitos B Daudi y células T Jurkat.

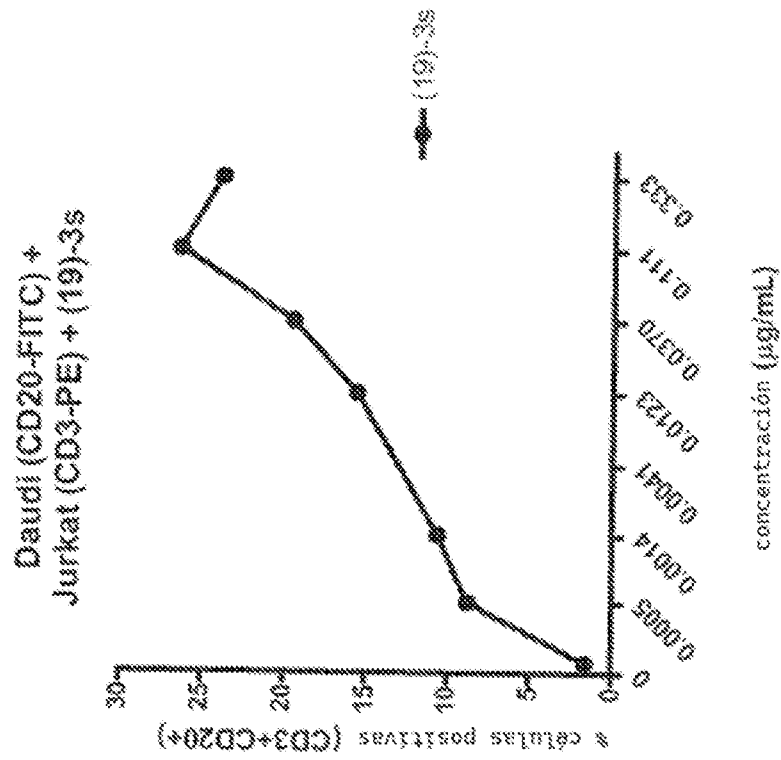


FIG. 5B

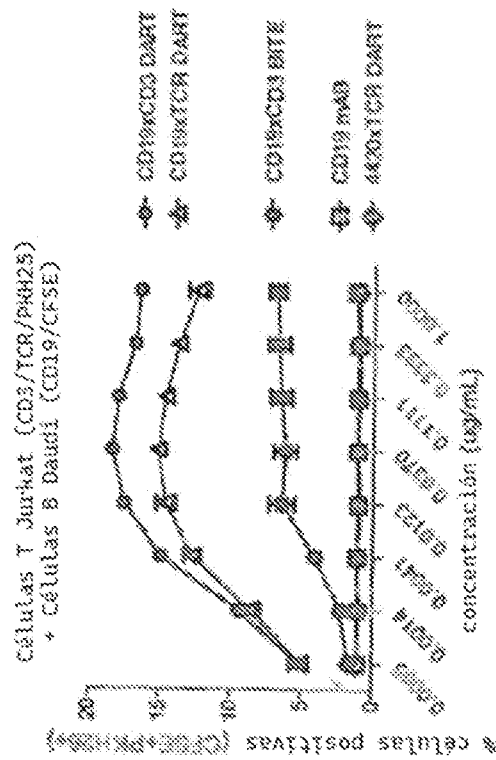


FIG. 5A

* Figura de Moore et al. Blood 2011. 117:4542-4551.

Formación de sinapsis inmunológicas entre células de adenocarcinoma
pancreático Capan-1 (MUC5AC+Trop2+CD19-) y células T Jurkat

(19)-3s

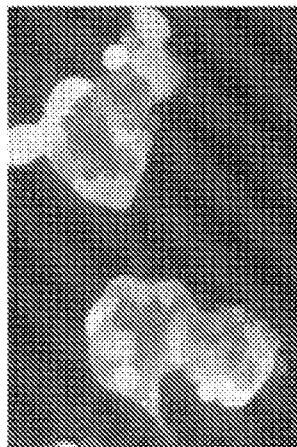


FIG. 6A

(M1)-3s

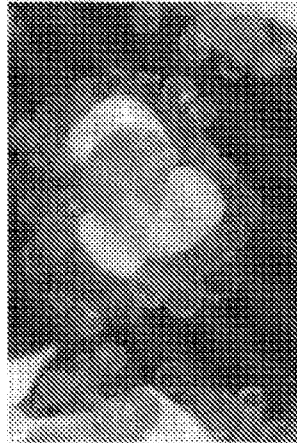


FIG. 6B

(E1)-3s

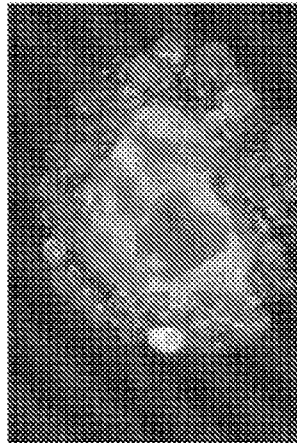


FIG. 6C

FIG. 7A

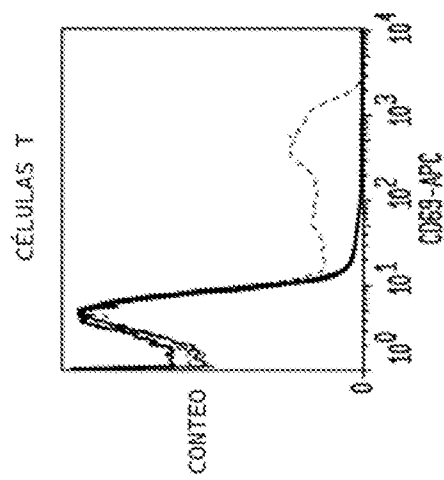


FIG. 7B

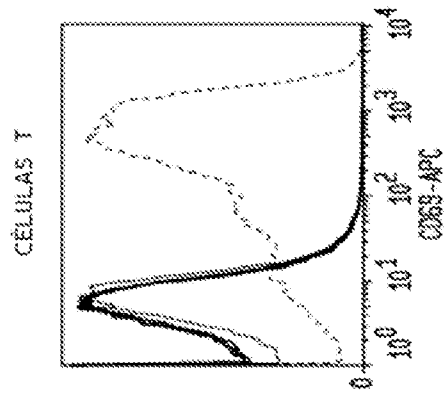
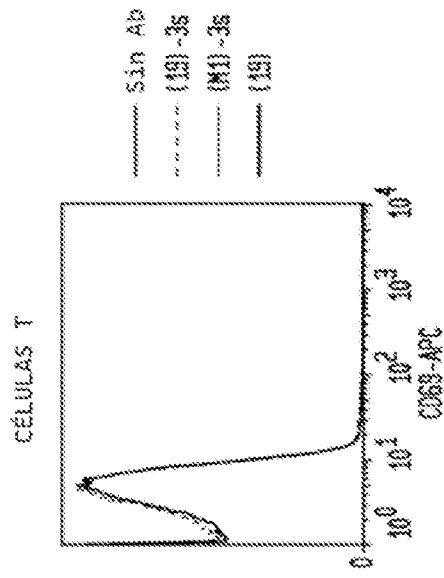


FIG. 7C



Activación de células
T: Proliferación de
células T en respuesta
a (19)-3s

FIG. 8A

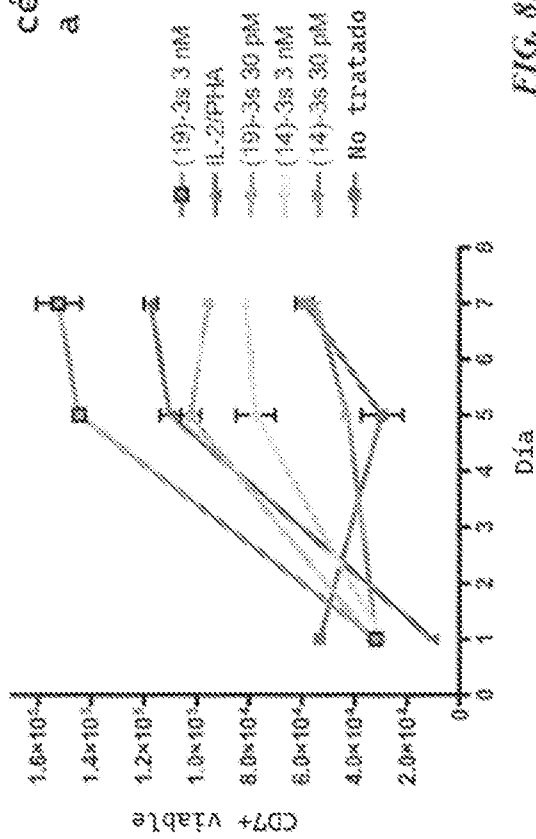


FIG. 8B

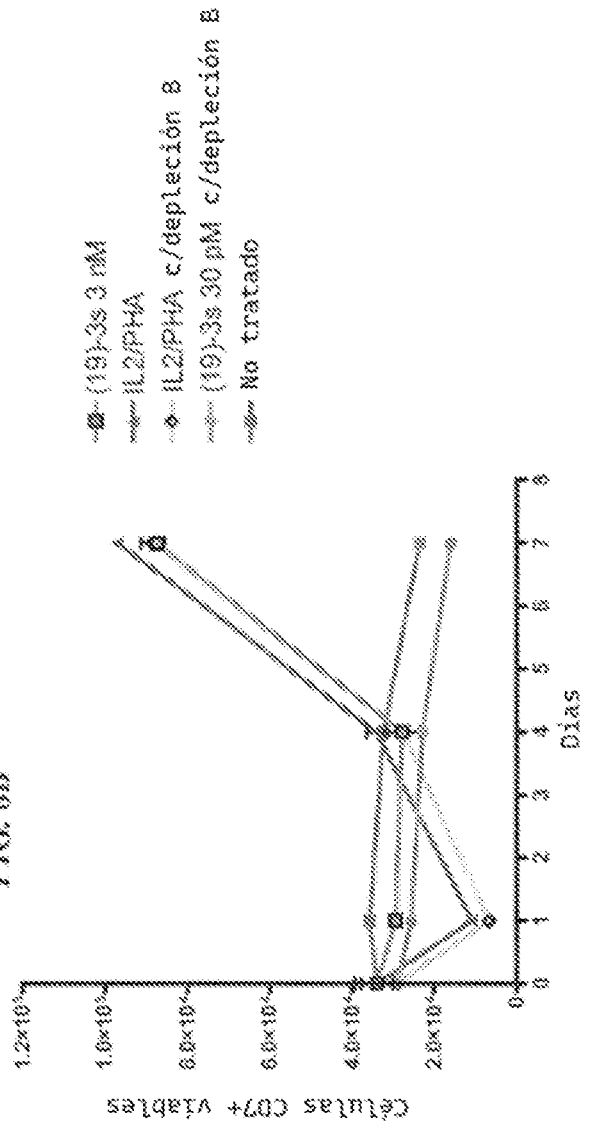


FIG. 9A

(19)-3s

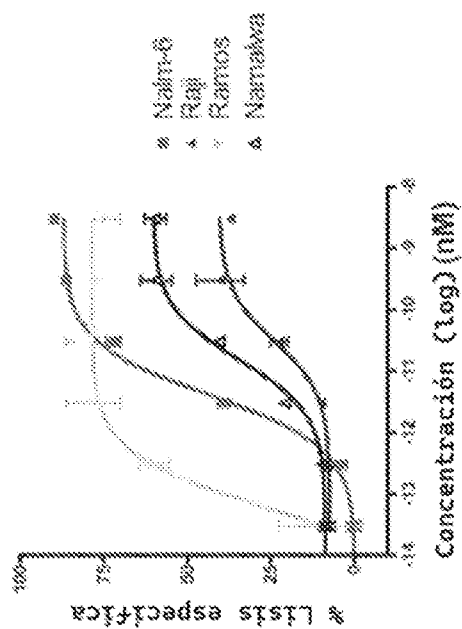


FIG. 9B

(14)-3s

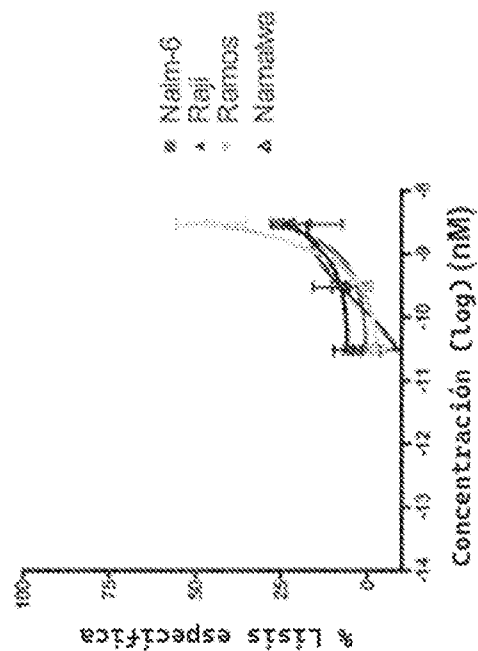


FIG. 9C

Nalm-6

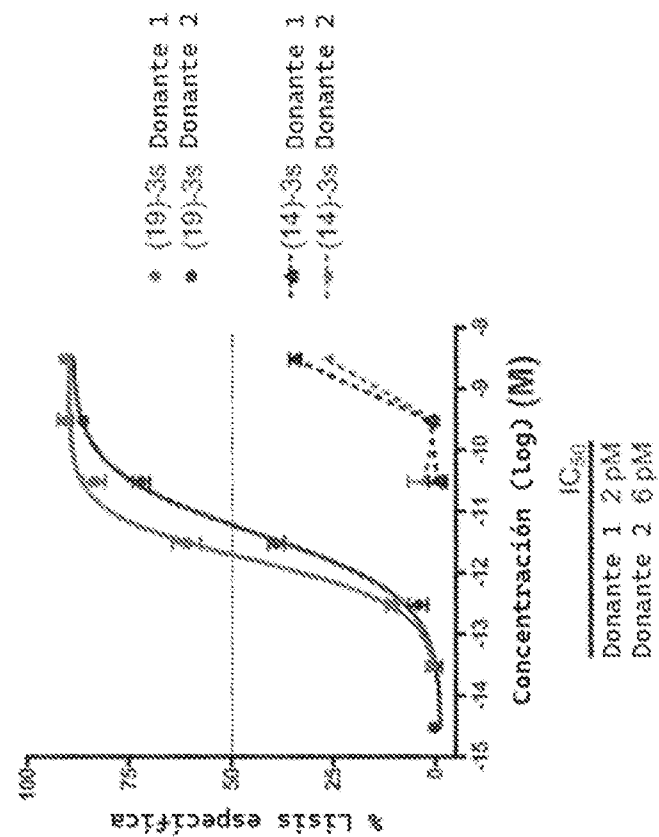


FIG. 104

Namalwa

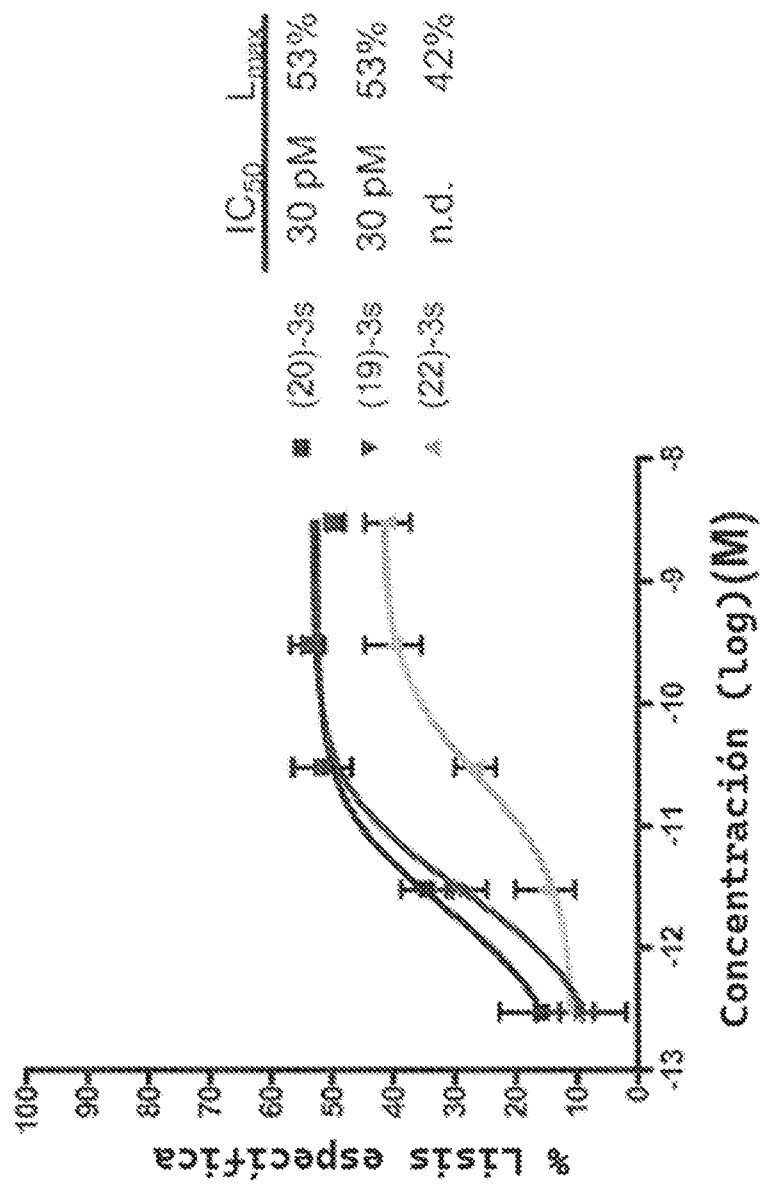
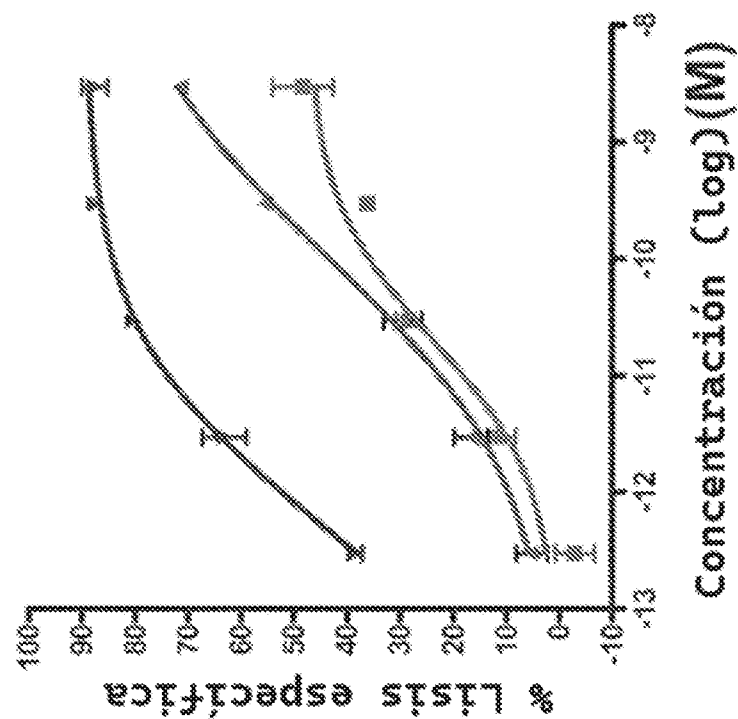


FIG. 10B

Jeko-1



	IC ₅₀	Lisis Máx.
■ (19)-3s	3 nM	50
▲ (C2)-3s	20 pM	88
▼ (20)-3s	1 pM	90

FIG. 10C

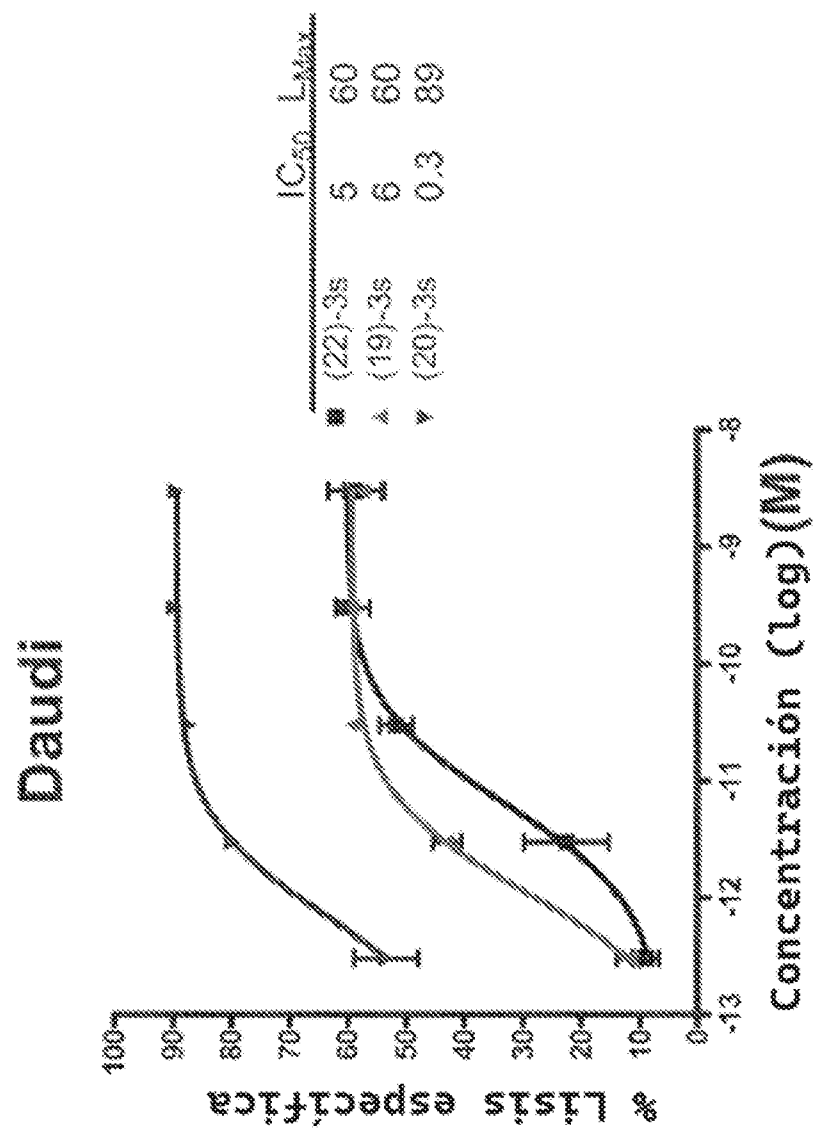


FIG. 11A

LS174T

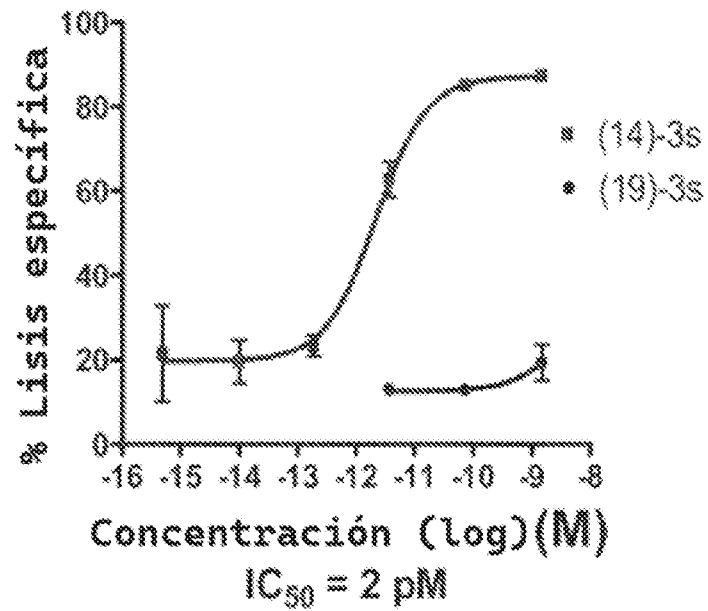


FIG. 11B

Capan-1

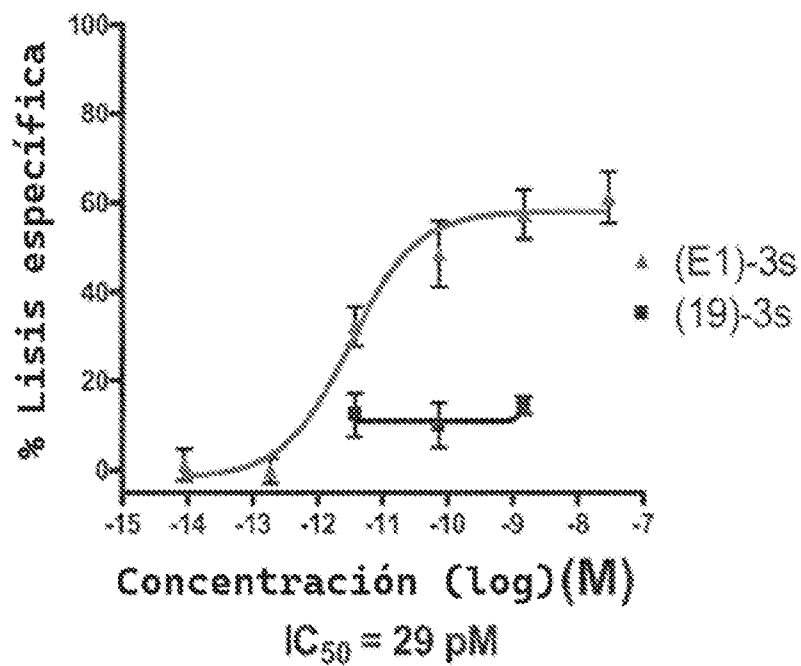


FIG. 11C

NCI-N87

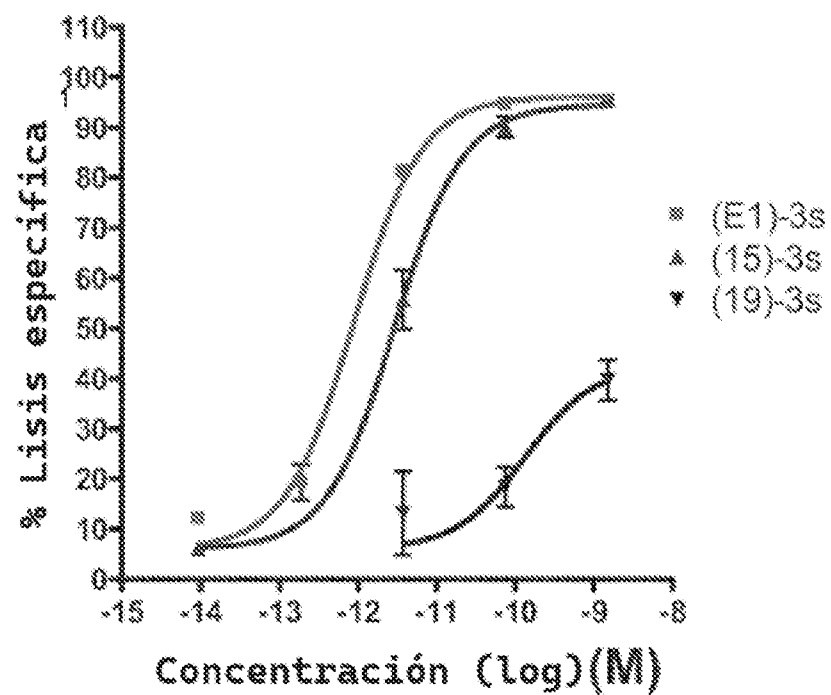


FIG. 12

			Expresion*	IC50 (pM)	Lisis Máx (%)
(20)-3s	CD20	Daudi	1	<0.3	~90
(19)-3s	CD19	Daudi	1	1	~60
(22)-3s	CD22	Daudi	1	~5	~60
(20)-3s	CD20	Nalmawa	0.11	30	53
(19)-3s	CD19	Namalwa	1.67	63	60
(22)-3s	CD22	Namalwa	0.06	ND	42
(20)-3s	CD20	Jeko-1	1.02	1	90
(19)-3s	CD19	Jeko-1	1.93	3000	50
(20)-3s	CD20	Ramos	TBD	TBD	TBD
(19)-3s	CD19	Ramos	0.84	0.17	79
(20)-3s	CD20	Nalm6	TBD	TBD	TBD
(19)-3s	CD19	Nalm6	0.75	6	~93
(20)-3s	CD20	Raji	TBD	TBD	TBD
(19)-3s	CD19	Raji	2.55	>3000	41
(C2)-3s		Daudi			
		Jeko-1		20	88

FIG. 13A

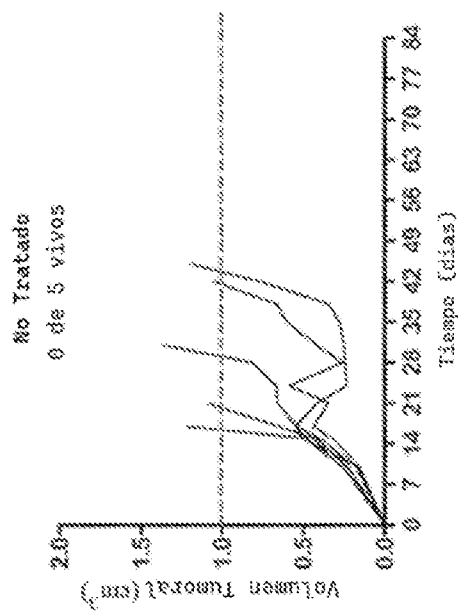


FIG. 13B

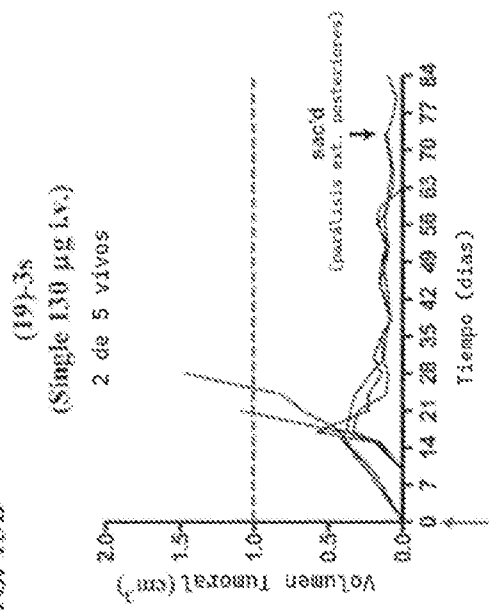


FIG. 13C

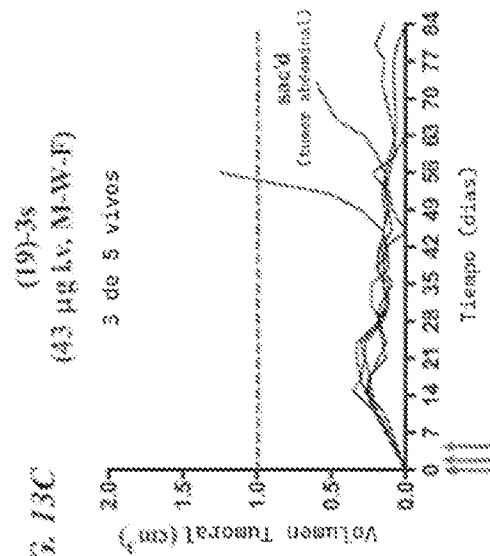


FIG. 13D

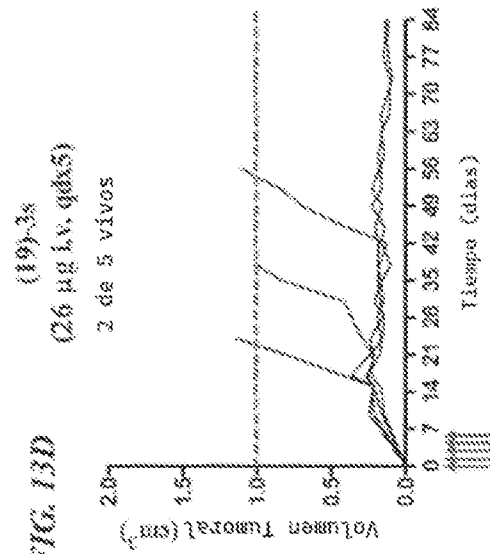


FIG. 14A

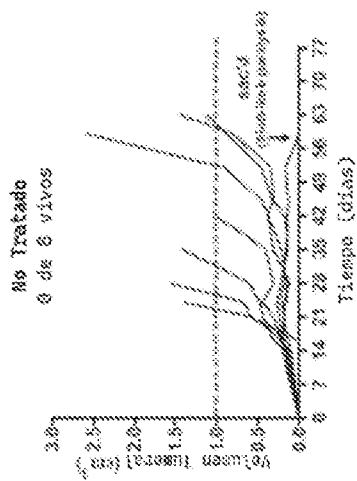


FIG. 14B

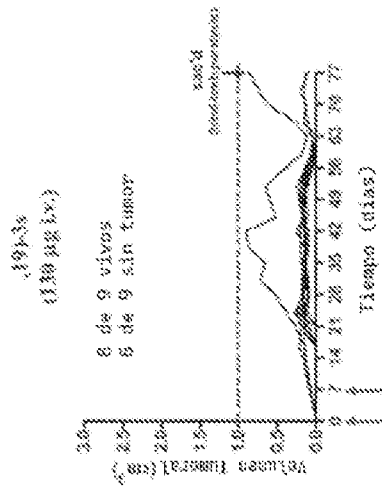


FIG. 14C

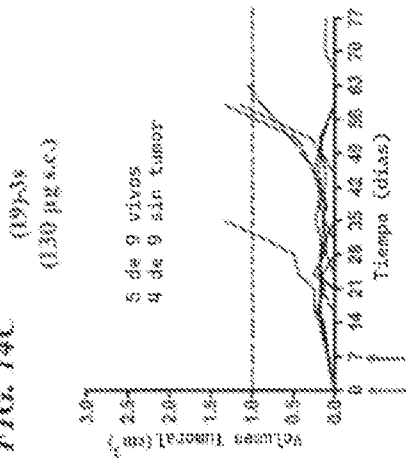


FIG. 14D

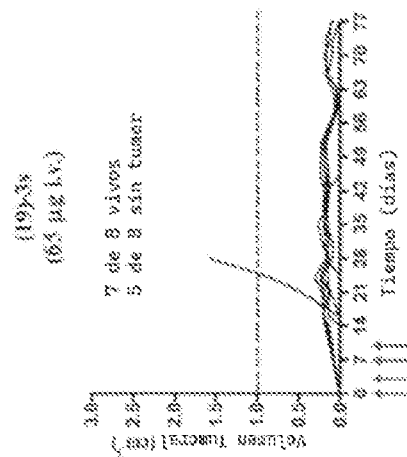


FIG. 14E

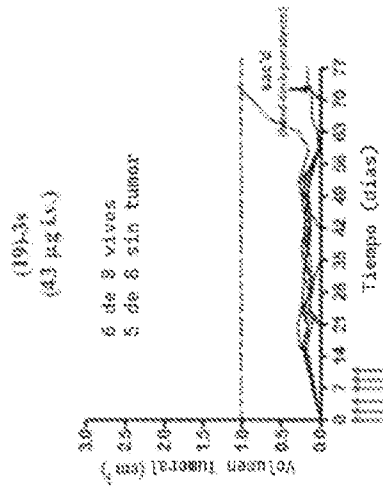


FIG. 14F

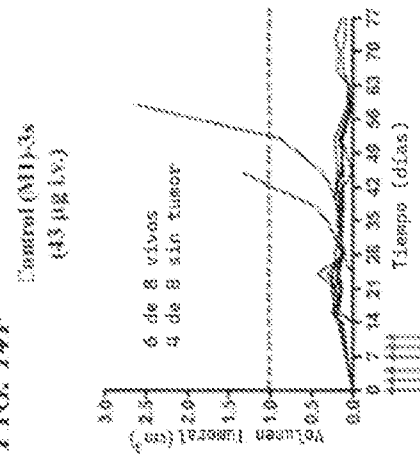


FIG. 15A

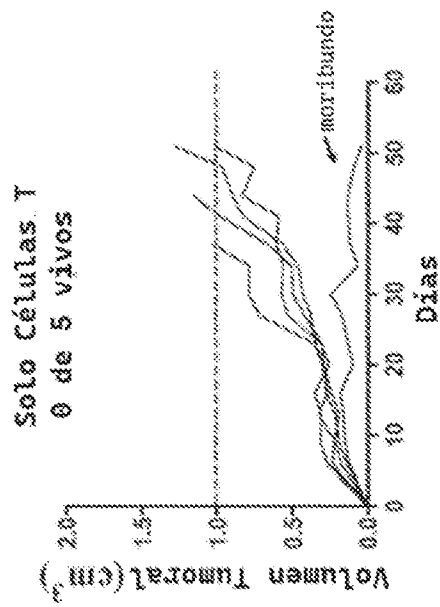


FIG. 15B

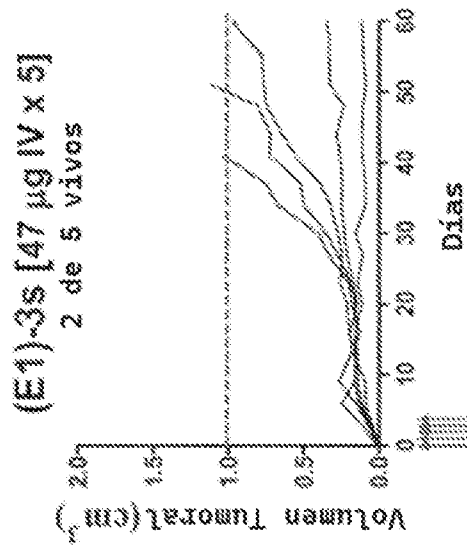


FIG. 15C

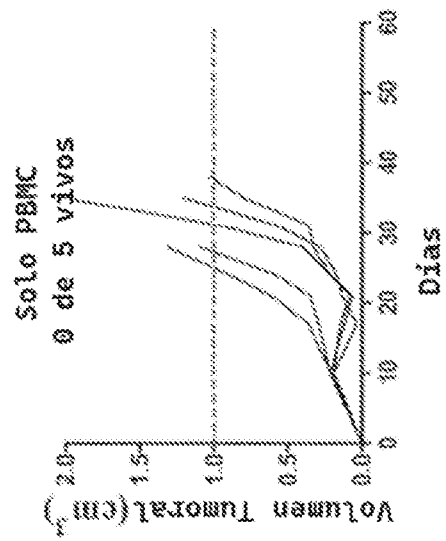


FIG. 15D

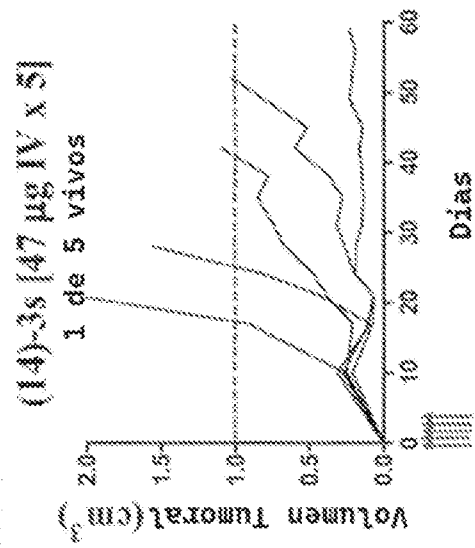


FIG. 16A

Eficacia terapéutica de la redirección de células T
(E1)-3s más E1*-2b en ratones portadores del tumor
Capan-1

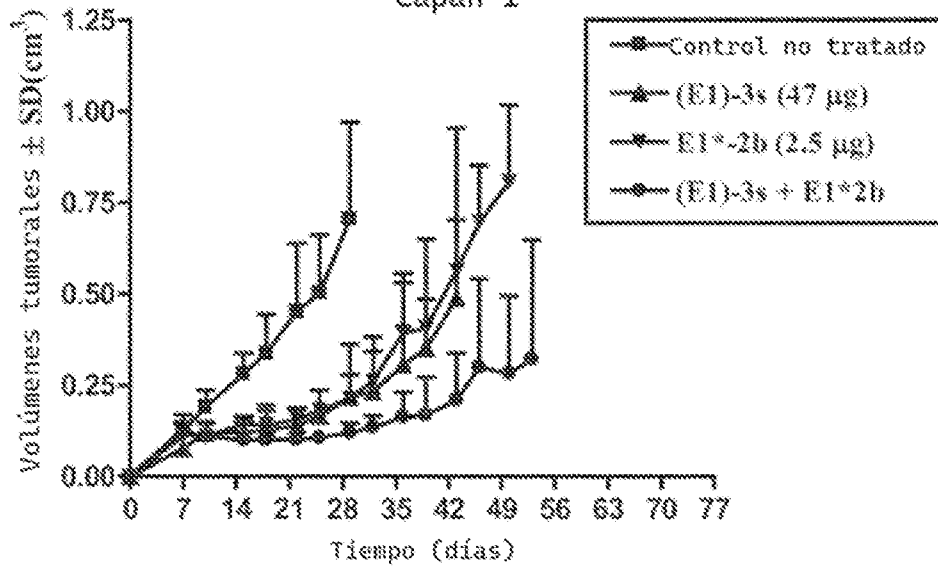


FIG. 16B

Eficacia terapéutica de la redirección de células T
(E1)-3s más PEGASYS en ratones portadores del tumor
Capan-1

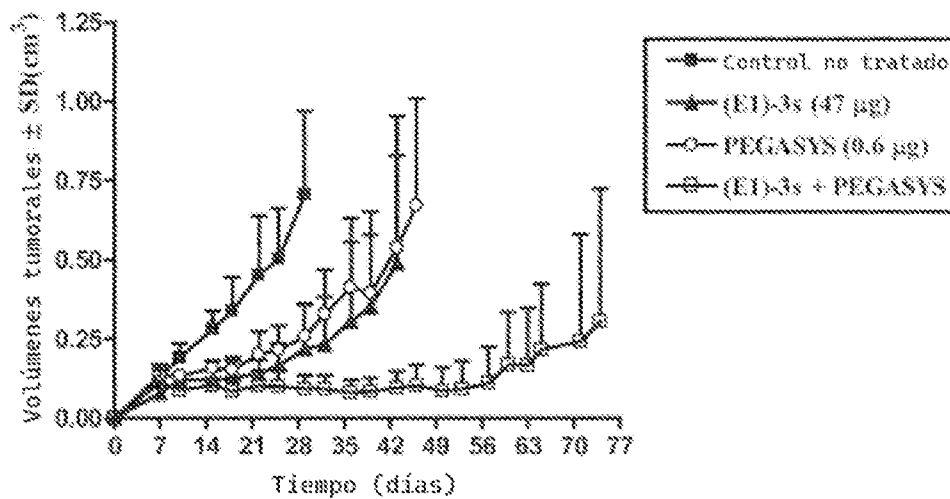


FIG. 17

Eficacia terapéutica de la redirección de células T (E1)-3s en el cáncer de páncreas experimental (Capan-1)

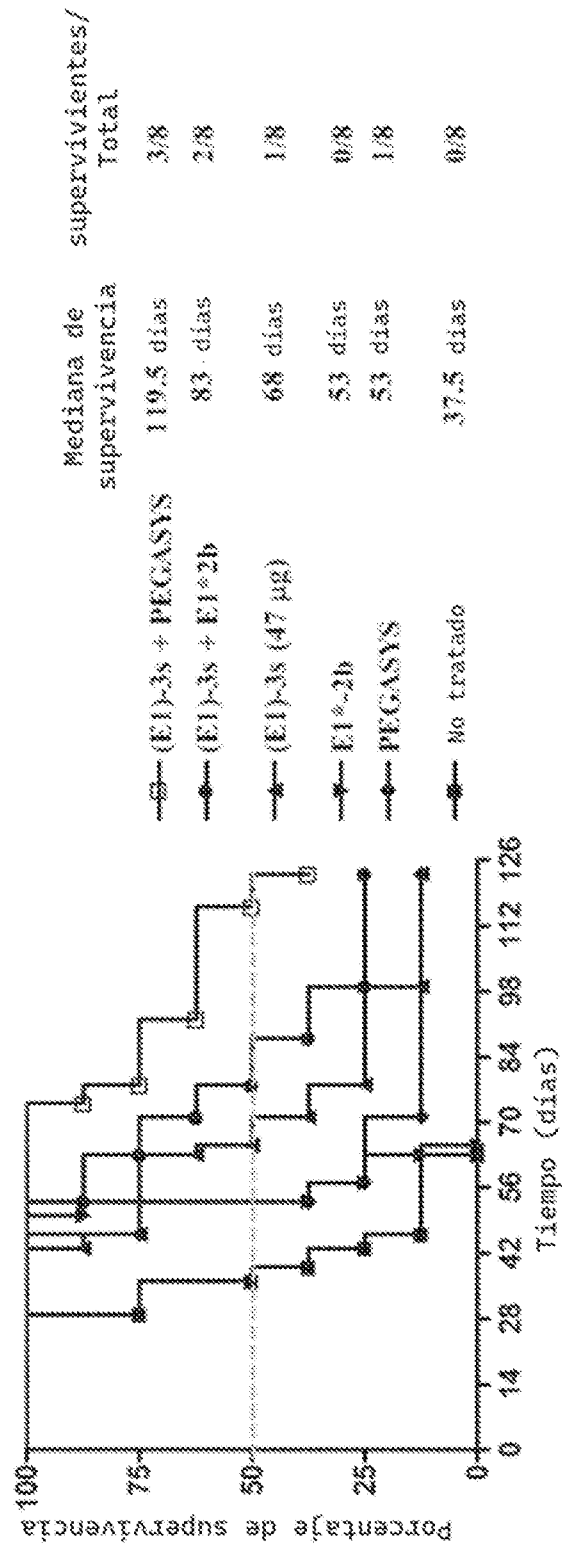


FIG. 18

Eficacia terapéutica de la redirección de células T (E1)-3s en el cáncer de páncreas experimental (Capan-1)

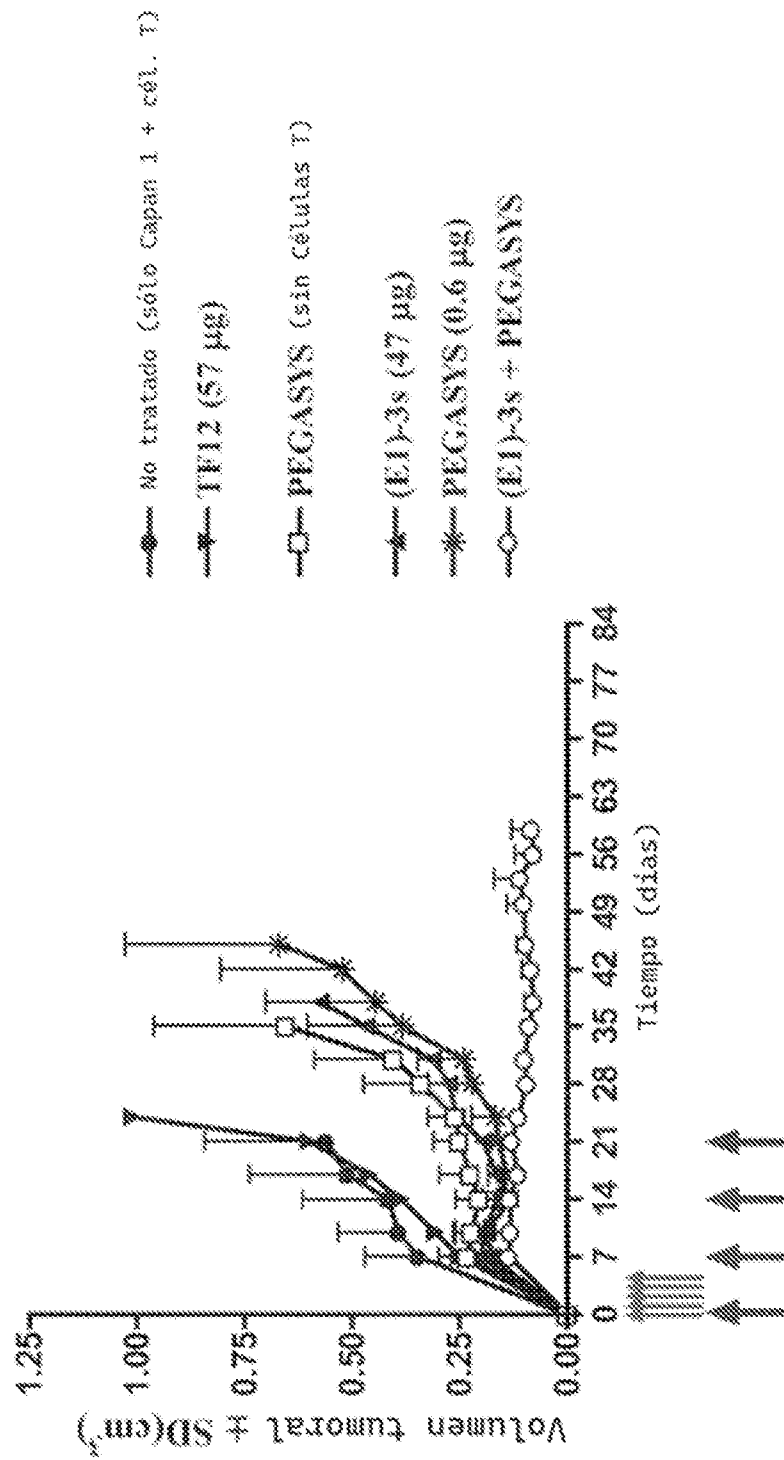


FIG. 19

Eficacia terapéutica de la redirección de células T (E1)-3s en el cáncer de páncreas experimental (Capan-1)

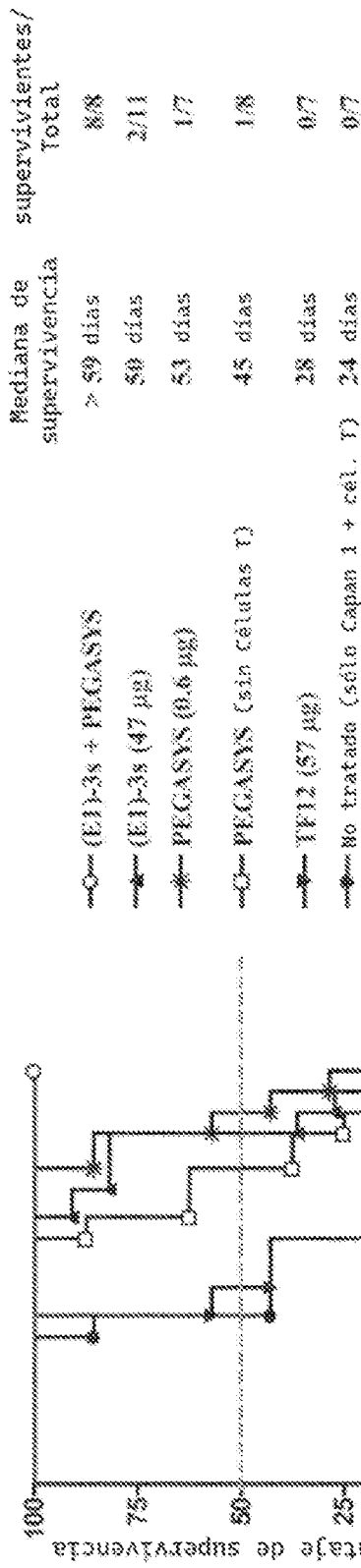


FIG. 20

Eficacia terapéutica de la redirección de células T (E1)-3s en el cáncer gástrico experimental (NCI-N87)

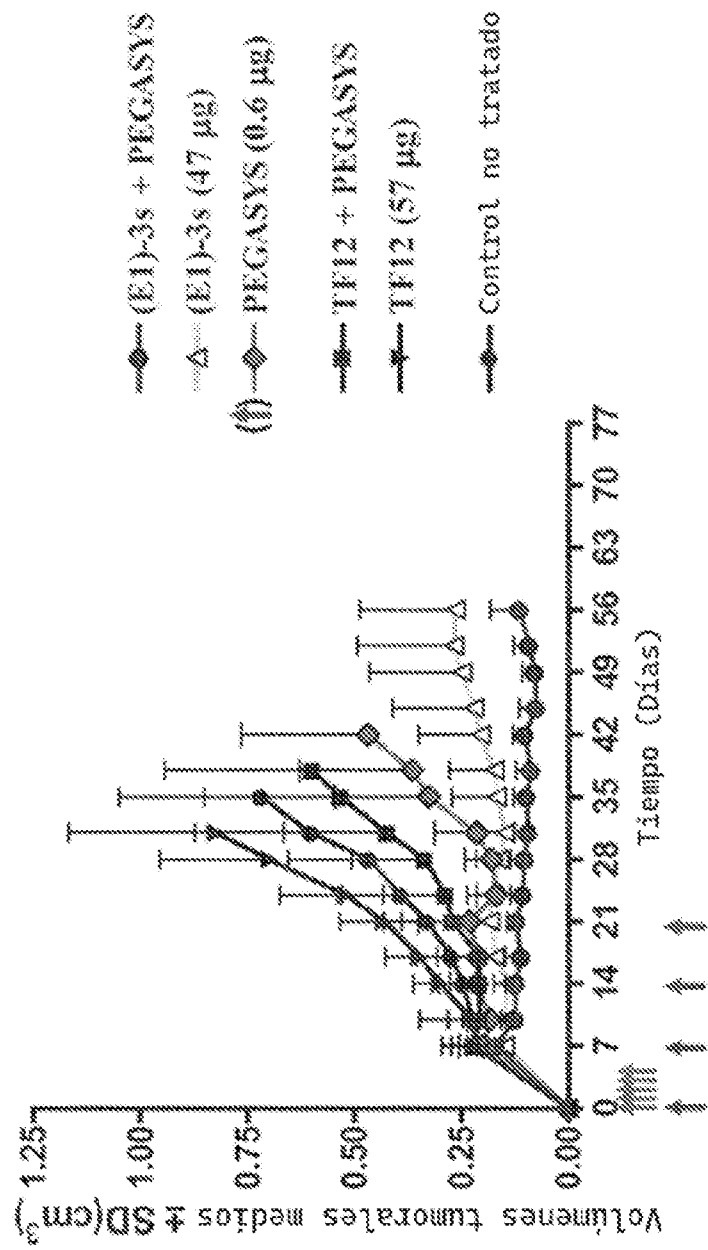


FIG. 21

Eficacia terapéutica de la redirección de células T (E1)-3s en cáncer gástrico experimental (NCI-N87)

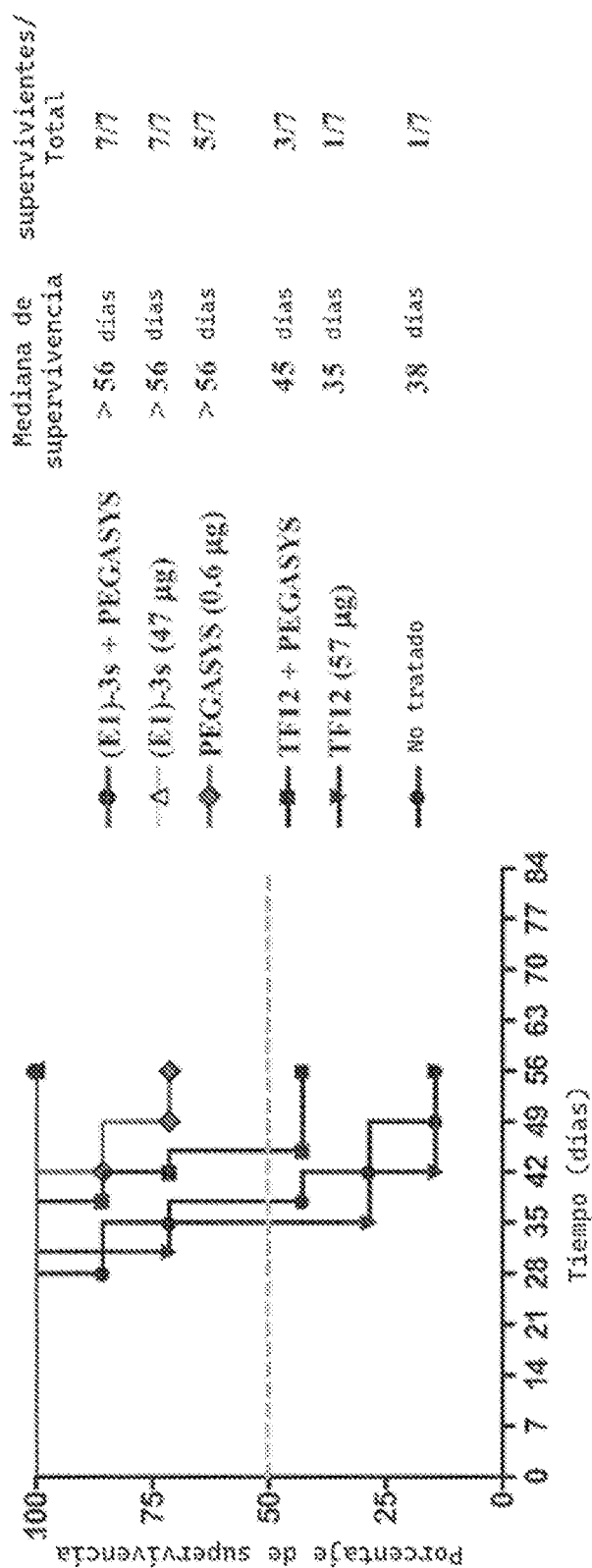


FIG. 22



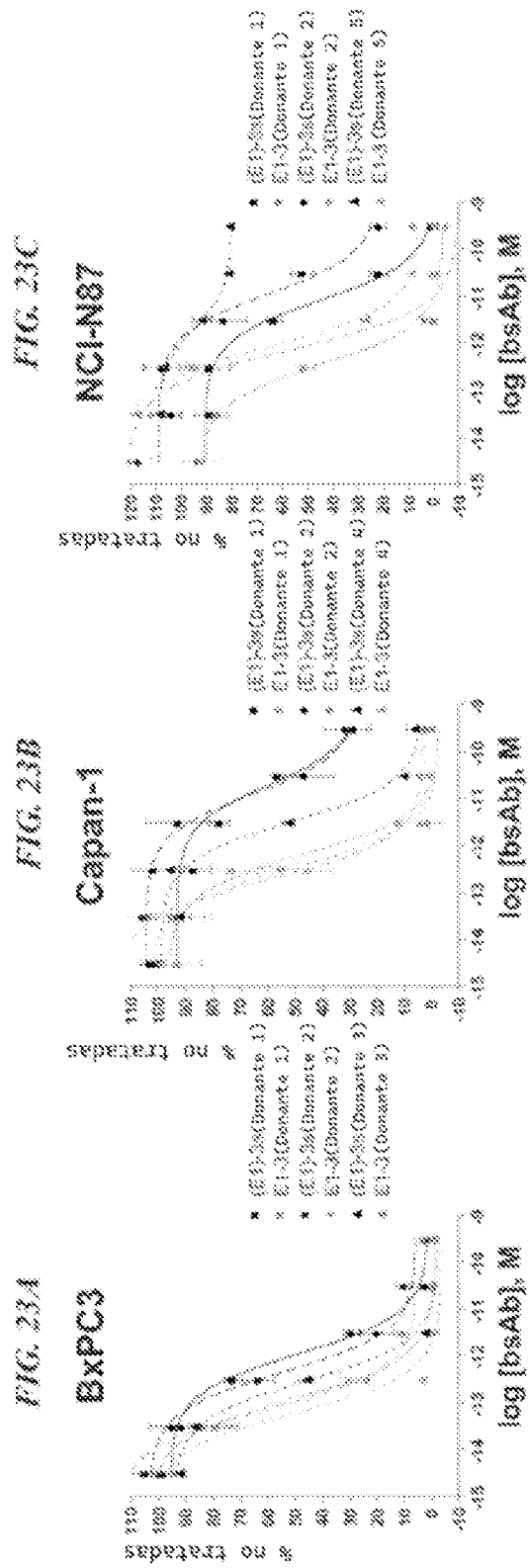


FIG. 24

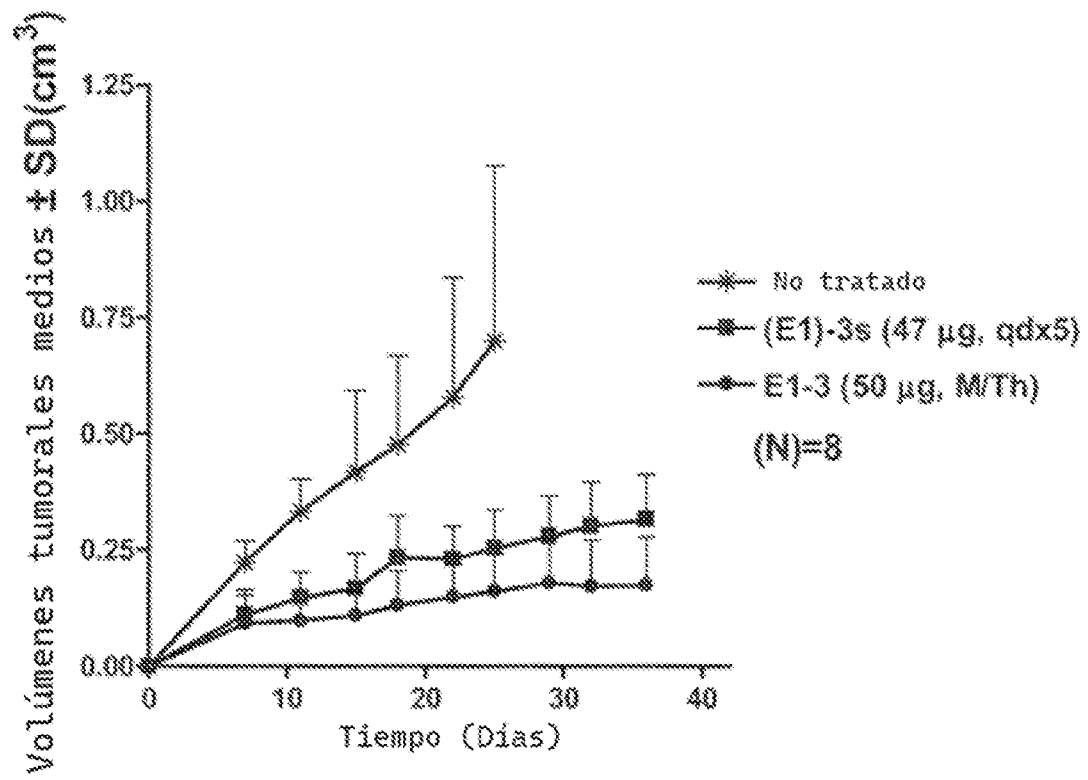


FIG. 25

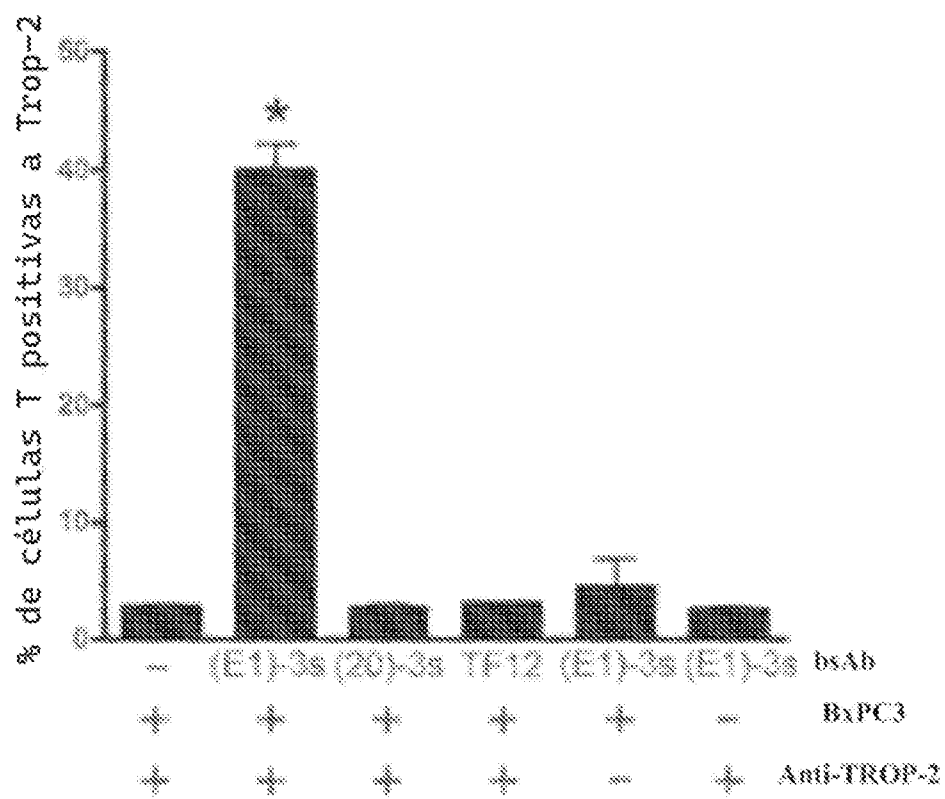


FIG. 26

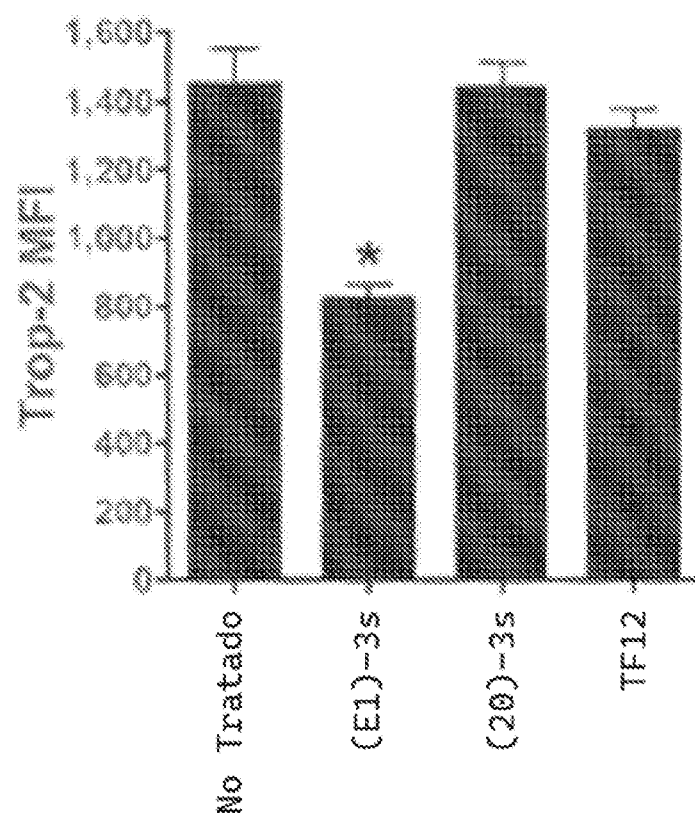


FIG. 27A

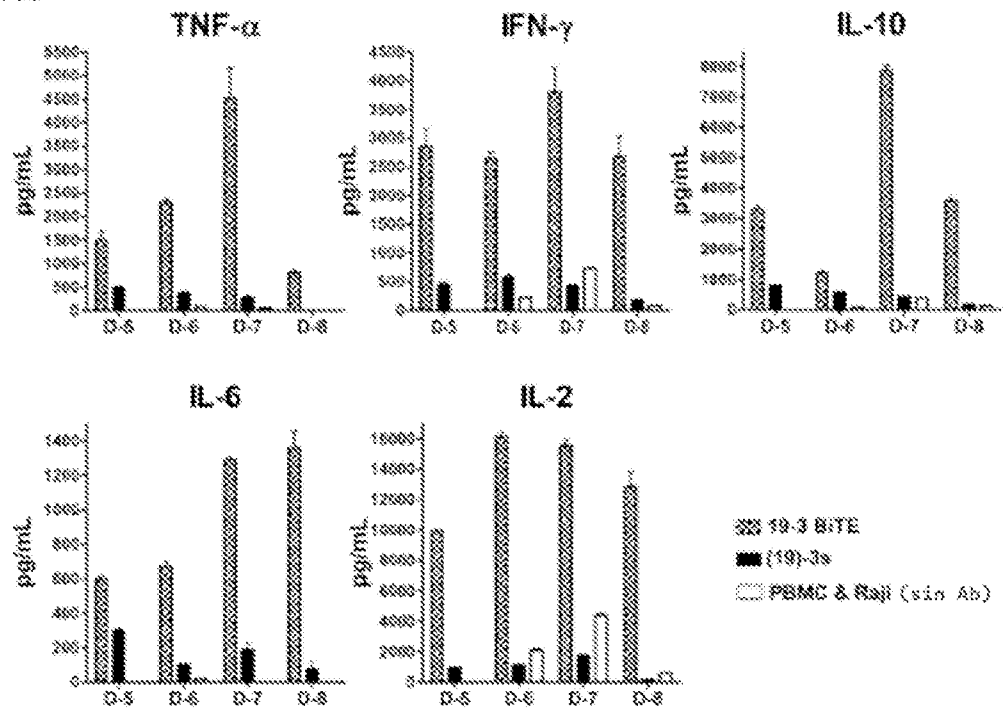
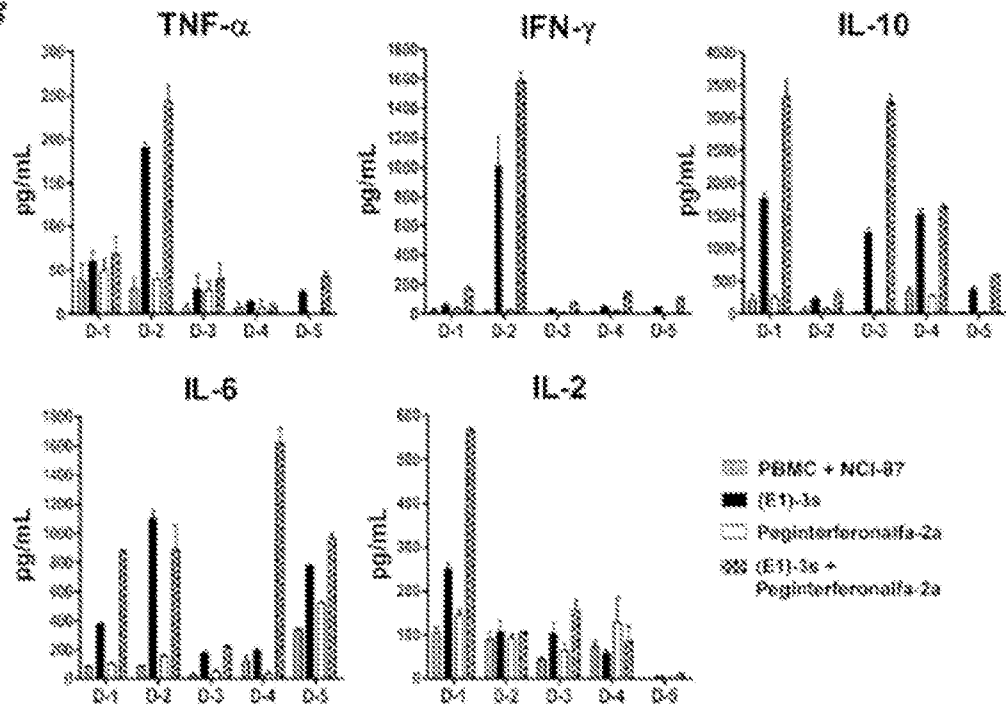


FIG. 27B



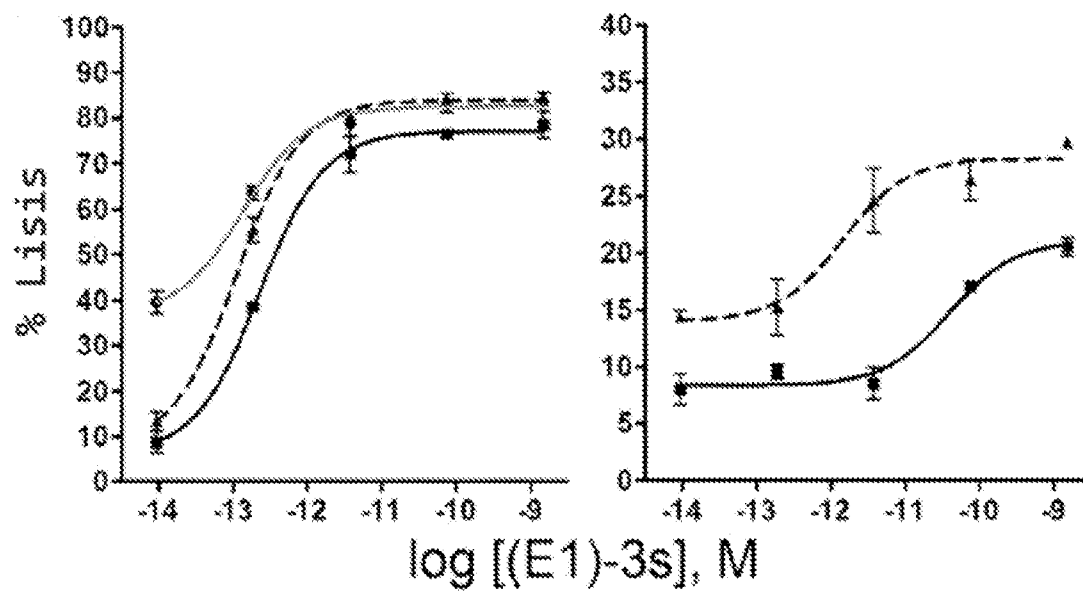


FIG. 28A

FIG. 28B

FIG. 29A

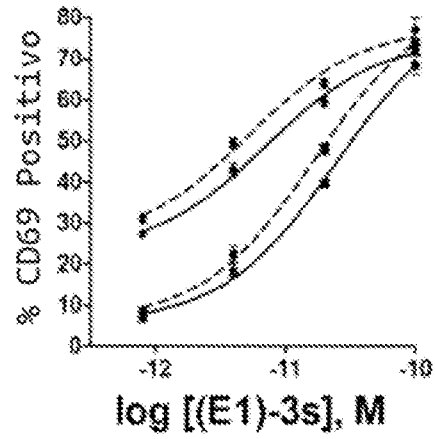


FIG. 29B

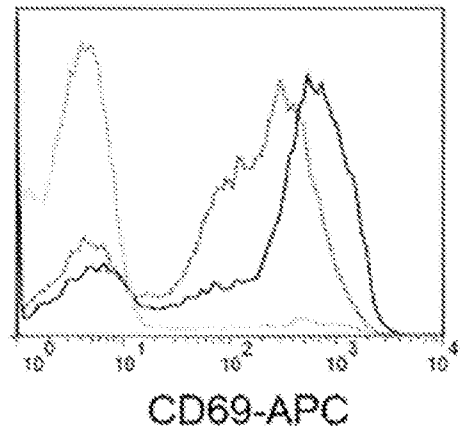


FIG. 29C

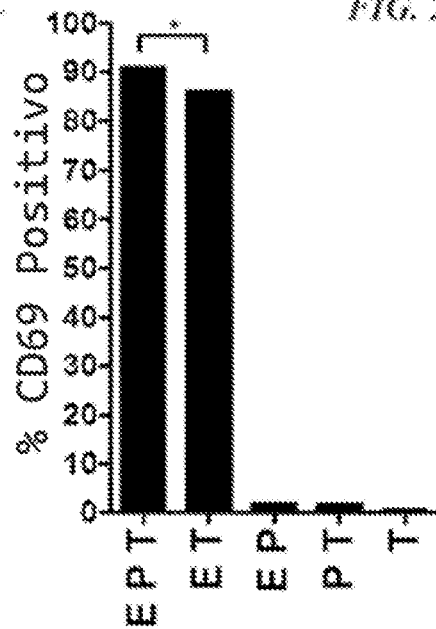
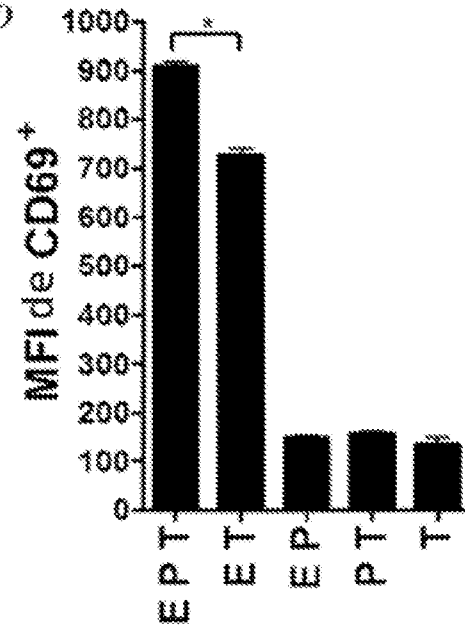


FIG. 29D



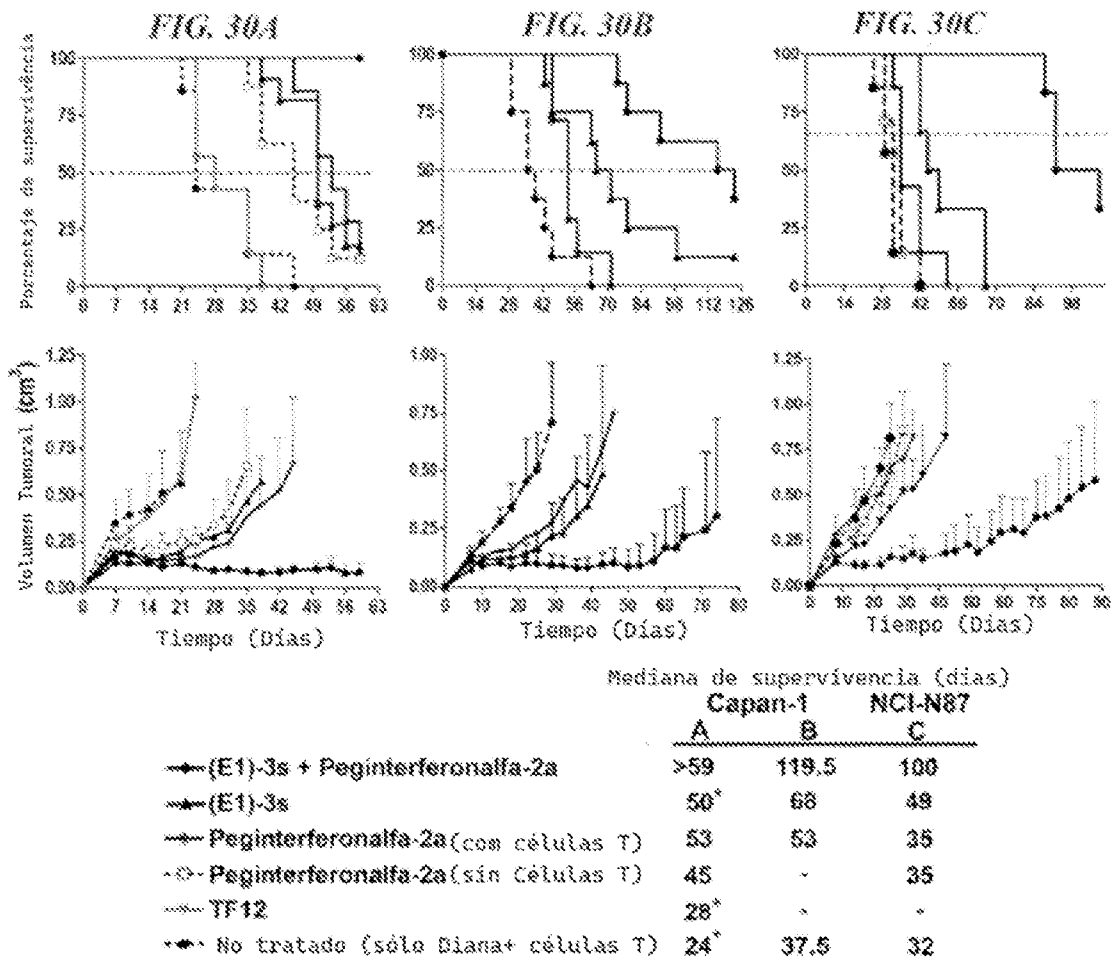


FIG. 31

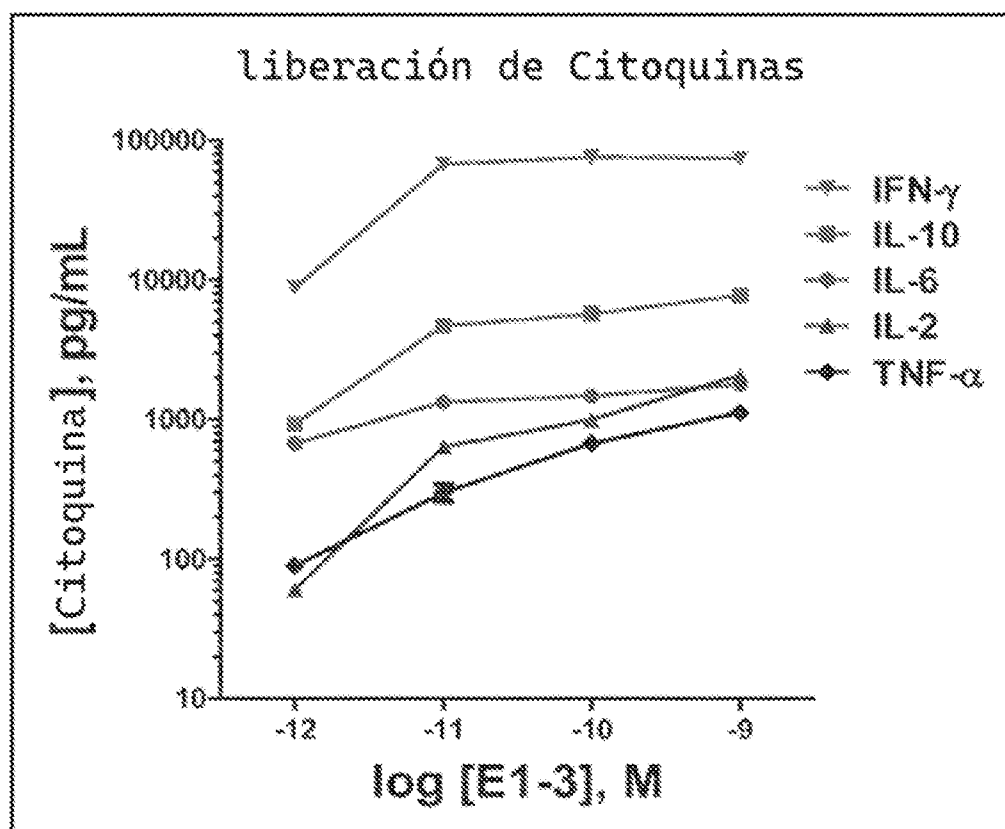
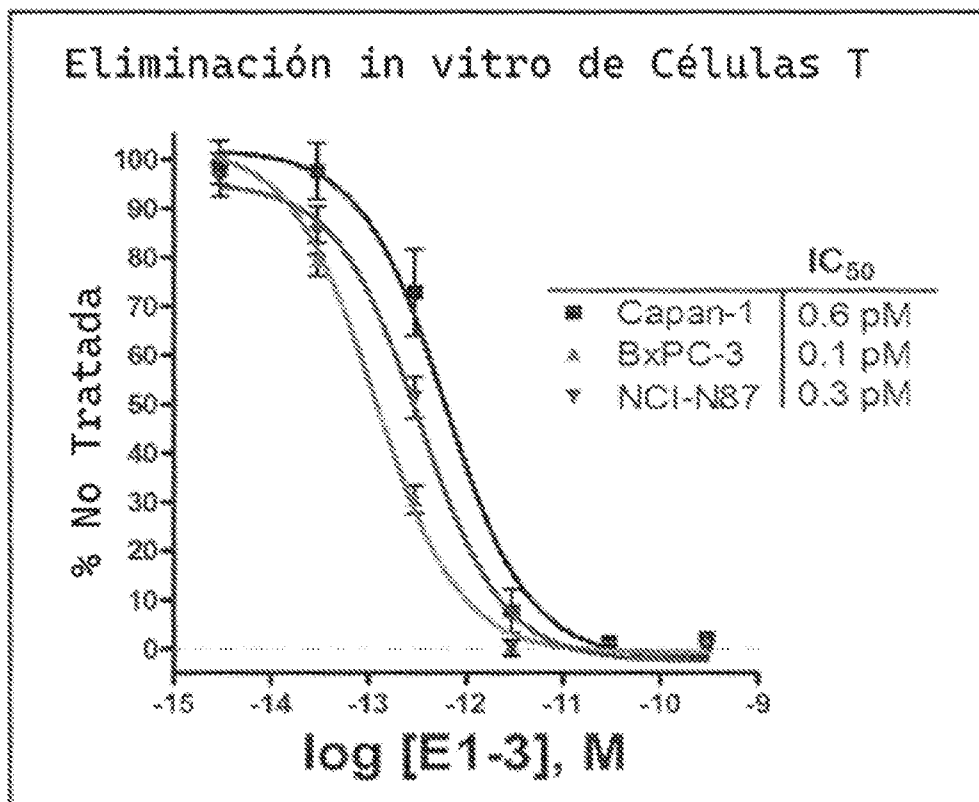


FIG. 32



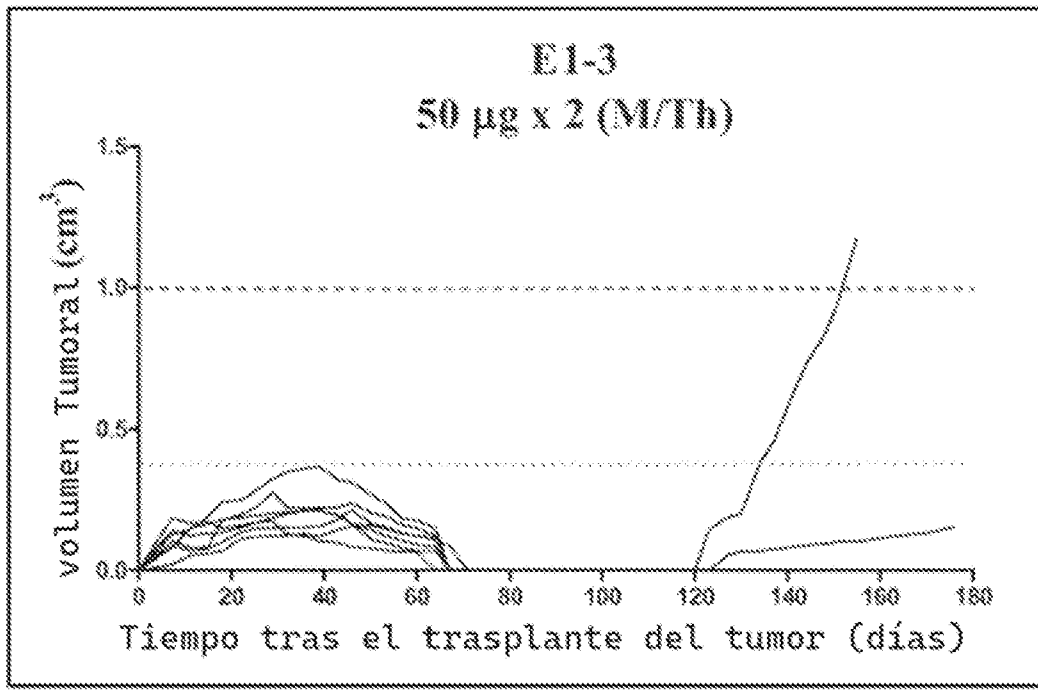


FIG. 33A

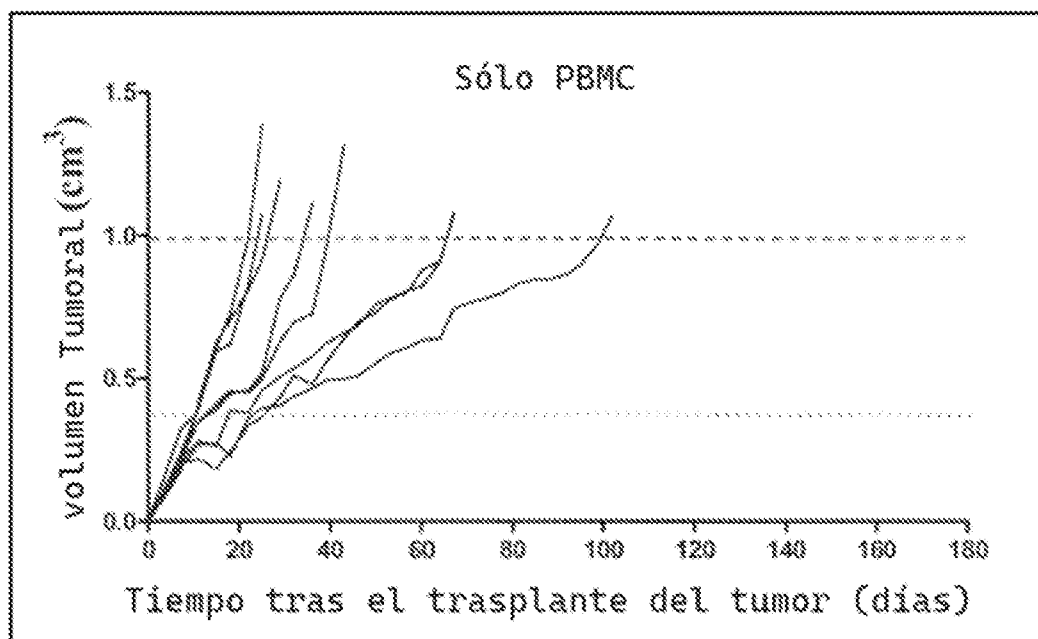


FIG. 33B