

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 969 070**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/46** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.07.2012** **E 20168633 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.10.2023** **EP 3872095**

54 Título: **Fragments Fab de anticuerpo mutados multiespecíficos**

30 Prioridad:

**07.07.2011 EP 11305872**

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

**16.05.2024**

73 Titular/es:

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE (CNRS) (25.0%)**

**3, rue Michel Ange**

**75016 Paris, FR;**

**UNIVERSITY OF LAUSANNE (25.0%);**

**AZIENDA SOCIO-SANITARIA TERRITORIALE**

**PAPA GIOVANNI XXIII (25.0%) y**

**KADOUCHE, JEAN (25.0%)**

72 Inventor/es:

**KADOUCHE, JEAN;**

**MACH, JEAN-PIERRE;**

**MICHIELIN, OLIVIER;**

**ZOETE, VINCENT;**

**IWASZKIEWICZ, JUSTYNA;**

**CERUTTI, MARTINE;**

**CHOBLET, SYLVIE y**

**GOLAY, JOSÉE**

74 Agente/Representante:

**DEL VALLE VALIENTE, Sonia**

**Observaciones:**

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

ES 2 969 070 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

Fragmentos Fab de anticuerpo mutados multiespecíficos

5 La invención se refiere a la producción de moléculas de anticuerpos multiespecíficas, en particular biespecíficas.

Entre los fármacos basados en proteínas, los anticuerpos monoclonales (mAb) tienen una característica particular, al actuar tanto como un fármaco como un sistema de suministro dirigido. Los mAb han mostrado recientemente un gran potencial en el tratamiento de diversas enfermedades, en particular incluyendo varios tipos de cáncer, donde son mucho más específicos que la quimioterapia convencional.

La estructura básica de una molécula de anticuerpo natural es una estructura cuaternaria tetramérica en forma de Y, que consiste en dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas, mantenidas juntas por interacciones no covalentes y por enlaces disulfuro intercatenarios.

En las especies de mamíferos, hay cinco tipos de cadenas pesadas:  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ , y  $\mu$ , que determinan la clase (isotipo) de inmunoglobulina: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, respectivamente. El dominio variable N-terminal de la cadena pesada (VH) es seguido por una región constante, que contiene tres dominios (numerados CH1, CH2 y CH3, desde el extremo N al extremo C) en las cadenas pesadas  $\gamma$ ,  $\alpha$ , y  $\delta$ , mientras que la región constante de las cadenas pesadas  $\mu$  y  $\epsilon$  se compone de cuatro dominios (numerados CH1, CH2, CH3 y CH4, desde el extremo N al extremo C). Los dominios CH1 y CH2, de IgA, IgG e IgD están separados por una bisagra flexible, que varía de longitud entre las diferentes clases, y en el caso de IgA e IgG, entre los diferentes subtipos: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 tienen bisagras, respectivamente, de 15, 12, 62 (o 77) y 12 aminoácidos, e IgA1 e IgA2 tienen bisagras, respectivamente, de 20 y 7 aminoácidos.

Existen dos tipos de cadenas ligeras:  $\lambda$  y  $\kappa$ , que pueden asociarse con cualquiera de los isotipos de las cadenas pesadas, pero son ambos del mismo tipo en una molécula de anticuerpo dada. Ambas cadenas ligeras parecen ser funcionalmente idénticas. Su dominio variable N-terminal (VL) es seguido por una región constante, que consiste en un solo dominio, denominado CL.

Las cadenas pesada y ligera se emparejan mediante interacciones proteína/proteína entre los dominios CH1 y CL, y las dos cadenas pesadas se asocian mediante interacciones proteína/proteína entre sus dominios CH3. La estructura de la molécula de inmunoglobulina generalmente se estabiliza mediante enlaces disulfuro intercatenarios entre los dominios CH1 y CL, y entre las bisagras.

La eficacia clínica de los anticuerpos terapéuticos se basa tanto en su función de unión al antígeno como en sus funciones efectoras, que se asocian respectivamente con diferentes partes de la molécula de inmunoglobulina.

Las regiones de unión al antígeno corresponden a los brazos de la estructura en forma de Y, que consisten cada uno en la cadena ligera completa emparejada con los dominios VH y CH1 de la cadena pesada, y se denominan fragmentos Fab (del inglés "Fragment antigen binding" [en español, Fragmento de unión al antígeno]). Los fragmentos Fab se generaron primero a partir de moléculas de inmunoglobulina nativas mediante la digestión con papaína que escinde la molécula de anticuerpo en la región bisagra, en el lado amino-terminal de los enlaces disulfuro intercatenarios, liberando así dos brazos idénticos de unión al antígeno. Otras proteasas, tales como pepsina, también escinden la molécula de anticuerpo en la región bisagra, pero en el lado carboxi terminal de los enlaces disulfuro intercatenarios, liberando fragmentos que consisten en dos fragmentos Fab idénticos, y permanecen unidos a través de enlaces disulfuro; la reducción de los enlaces disulfuro en los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> genera fragmentos Fab'.

La parte de la región de unión al antígeno correspondiente a los dominios VH y VL, se denomina fragmento Fv (del inglés "Fragment variable" [en español, Variable de fragmento]); contiene las CDR (del inglés "complementarity determining regions" [en español, regiones determinantes de complementariedad]), que forman el sitio de unión al antígeno (también denominado parátipo). Además de permitir dirigir específicamente el anticuerpo a su objetivo, la región de unión al antígeno puede inducir, al unirse a su antígeno diana, una variedad de señales biológicas, que pueden ser positivas o negativas, dependiendo tanto del antígeno diana como del epítipo reconocido por el anticuerpo en dicho antígeno. Para su uso en el campo de la terapia contra el cáncer, generalmente se favorece los anticuerpos que suministren una señal inhibidora del crecimiento o proapoptótica, lo que da como resultado la citostasis o la muerte de las células tumorales (VERMA y col., J Immunol, 186, 3265-76; 2011).

La función efectora del anticuerpo resulta de su unión a moléculas efectoras, tales como proteínas del complemento, o a receptores Fc en la superficie de las células inmunitarias, tales como macrófagos o células asesinas naturales (NK, por sus siglas en inglés). Esto da como resultado diferentes efectos que conducen a la fagocitosis o la lisis del antígeno diana, tal como la fagocitosis dependiente de anticuerpos (ADP, por sus siglas en inglés), la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés), o la citotoxicidad mediada por células dependiente del complemento (CDC, por sus siglas en inglés).

La región efectora del anticuerpo que es responsable de su unión a las moléculas o las células efectoras, corresponde al tallo de la estructura en forma de Y, y contiene los dominios CH2 Y CH3 emparejados de la cadena pesada (o los dominios CH2, CH3 Y CH4, dependiendo de la clase de anticuerpo), Y se denomina región Fc (del inglés "Fragment crystallisable" [en español, fragmento cristalizable]).

La ADCC, ADP y CDC mediadas por la región Fc desempeñan una parte importante en la actividad terapéutica de los mAb. El mecanismo de la ADCC parece ser central, ya que se ha demostrado que en ratones desnudos, genéticamente deficientes para el receptor gamma Fc, la acción terapéutica contra los xenoinjertos tumorales humanos de los dos mAb principales clínicamente exitosos, anti-HER2 y anti-CD20, fue casi completamente anulado (CLYNES y col., Nat Med, 6, 443-6, 2000). También se ha demostrado que el mecanismo ADP es de vital importancia en varios modelos murinos de tumores humanos (UCHIDA y col., J. Exp. Med. 199: 1659-69, 2004), y también se ha demostrado que la CDC desempeña un papel fundamental en la actividad terapéutica de anti-CD20 *in vivo* (DI GAETANO y col., J Immunol, 171, 1581-7, 2003).

Debido a la identidad de las dos cadenas pesadas y las dos cadenas ligeras, las moléculas de anticuerpos naturales tienen dos sitios idénticos de unión al antígeno y, por lo tanto, se unen simultáneamente a dos epítopos idénticos.

En los 1980, los anticuerpos biespecíficos que tenían en una misma molécula dos sitios de unión al antígeno que reconocían dos epítopos diferentes y, por lo tanto, capaces de unirse simultáneamente a dos dianas diferentes, se generaban fusionando dos células que producían anticuerpos con especificidades distintas (MILSTEIN & CLTELLO, Nature, 305, 537-40, 1983). Se demostró que dichos anticuerpos biespecíficos eran capaces de dirigir a las células T efectoras hacia las células tumorales (STAERZ y col., Nature, 314, 628-31, 1985).

Se ha descrito una amplia gama de aplicaciones para anticuerpos biespecíficos (SONGSIVILAI & LACHMANN, Clin Exp Immunol, 79, 315-21, 1990), incluyendo, por ejemplo, en el campo terapéutico, el direccionamiento de células efectoras (células T citotóxicas, células NK, y macrófagos), o de moléculas efectoras (toxinas, fármacos, profármacos, citocinas, radioisótopos, y sistema del complemento) y en el campo de diagnóstico, uso como reactivos en inmunoensayos.

Inicialmente, los anticuerpos biespecíficos se preparaban mediante conjugación química, o mediante el uso de cuadromas resultantes de la fusión entre dos líneas celulares de hibridoma que producían dos mAb diferentes. Sin embargo, la conjugación química puede alterar ocasionalmente los sitios de unión al antígeno, lo que da como resultado un deterioro de las propiedades biológicas del anticuerpo. El enfoque de cuadroma tiene el inconveniente de que el emparejamiento aleatorio de las cadenas pesadas y ligeras de dos anticuerpos diferentes, conduce teóricamente a diez combinaciones igualmente posibles, lo que da como resultado una mezcla de moléculas de inmunoglobulina, solo una de las cuales es el producto biespecífico deseado, que tiene que separarse de los productos mal emparejados.

Más recientemente, la ingeniería genética se convirtió en el método elegido para producir anticuerpos biespecíficos, y había llevado al desarrollo de una amplia variedad de diferentes formatos de anticuerpos biespecíficos recombinantes. Algunos de estos anticuerpos biespecíficos son muy simples, y derivan de fragmentos Fv monocatenarios (scFv) de dos (o más) anticuerpos diferentes, asociados a través de un enlazador peptídico apropiado. Estos anticuerpos son relativamente fáciles de producir y, dado que están formados por una sola cadena polipeptídica, y contienen solo las regiones Fv de los anticuerpos originales, no existe ningún problema de emparejamiento intercatenario incorrecto. Sin embargo, son más pequeños que las inmunoglobulinas de longitud completa, y carecen de regiones constantes, en particular de la región Fc. Aunque puede ser ventajoso en algunas aplicaciones, por ejemplo, cuando se desea evitar efectos mediados por Fc, es una desventaja cuando se desea la función efectora mediada por Fc, tal como CDC, ADCC o ADP. Además, debido a su pequeño tamaño y falta de región Fc, tienen una vida media muy corta *in vivo*.

Por lo tanto, se han diseñado otros formatos de anticuerpos recombinantes biespecíficos, que imitan más estrechamente la molécula de inmunoglobulina natural, y en particular que tienen una región Fc completa. Se pueden agrupar en dos formatos principales.

En el primero (scFv IgG), los fragmentos scFv de un anticuerpo A se fusionan a los extremos (generalmente, los extremos C-terminales) de las cadenas pesadas de un anticuerpo B. El anticuerpo resultante tiene solo un tipo de cadena pesada, que contiene los dominios VH, CH1, CH2 y CH3 del anticuerpo B, y los dominios VH y VL del anticuerpo A, y un tipo de cadena ligera que contiene los dominios VL y CL del anticuerpo B, el emparejamiento intercatenario incorrecto no se produce. Dicho formato se describe, por ejemplo, por QU y col. (Blood, 111, 2211-9, 2008).

En el segundo, la cadena pesada y la cadena ligera de un anticuerpo A se emparejan con la cadena pesada y la cadena ligera de un anticuerpo B. Este formato reproduce los anticuerpos biespecíficos producidos por los cuadromas y, por lo tanto, plantea problemas similares de emparejamiento incorrecto. Para resolver el problema del emparejamiento incorrecto de las cadenas pesadas, se ha propuesto mutar los dominios CH3 de los anticuerpos, a fin de favorecer su heterodimerización (es decir, el emparejamiento de la cadena pesada A con la cadena pesada B), y para evitar su homodimerización. Esto se hizo mediante el enfoque denominado "perilla en agujeros" (del inglés "knob

into holes”) (RIDGWAY y col., Protein Eng, 9, 617-21, 1996; US-7.695.936). Una mutación de “perilla” que consiste en la sustitución de un aminoácido pequeño por uno mayor, se introduce en la interfaz del dímero CH3 de la cadena pesada del anticuerpo A, lo que da como resultado un impedimento estérico que impide la homodimerización. Simultáneamente, con el fin de promover la heterodimerización, una mutación complementaria de “agujero”, que consiste en la sustitución de un aminoácido grande por uno más pequeño, se introduce en el dominio CH3 del anticuerpo B. Para solucionar el problema del emparejamiento incorrecto de la cadena pesada/cadena ligera, se ha propuesto utilizar anticuerpos de diferentes especificidades, pero compartiendo una cadena ligera común, previamente identificada a partir de una biblioteca de fagos scFv (MERCHANT y col., Nat Biotechnol, 16, 677-81, 1998; US-7.183.076). El inconveniente de este enfoque es la dificultad de identificar anticuerpos que tenga una cadena ligera común.

Los inventores ahora han descubierto que al mutar algunos residuos clave en la interfase de los dominios CH1 y CL, es posible evitar el emparejamiento incorrecto de la cadena pesada/cadena ligera y, por lo tanto, asegurar la coincidencia deseada de las cadenas.

Se han encontrado más específicamente varios conjuntos de mutaciones adecuadas para este fin. En un primer conjunto, un par de residuos de interfaz polares interactuantes se intercambia por un par de residuos formadores de puentes neutros y de sal. Se seleccionó el reemplazo de Thr192 por un Glu en la cadena CH1, y el intercambio de Asn137 a una Lys en la cadena CL. Estos dos residuos mutados forman un puente de sal, que se supone que refuerza la especificidad de la asociación, mientras que un emparejamiento no deseado debe evitarse por la falta de complementariedad estereonómica y de carga entre las cadenas de tipo salvaje y variantes. Además, se preparó una sustitución de Ser114 a Ala en la cadena CL, para evitar choques estéricos con una cadena lateral más grande de lisina.

En un segundo conjunto de mutaciones, los inventores eligieron reemplazar la Leu143 del dominio CH1 por un residuo de Gln, mientras que el residuo opuesto de la cadena CL, es decir, Val133, se reemplazó por un residuo Thr. Esta primera doble mutación constituye el cambio de interacciones hidrófobas a polares. Simultáneamente, se seleccionó una mutación de dos serinas interactuantes (Ser188 en la cadena CH1, y Ser176 en la cadena CL) a los restos de valina, para realizar el cambio de interacciones polares a hidrófobas. Se espera que este intercambio del carácter polar/hidrófobo de las interacciones de la interfaz mantenga sin cambios la afinidad entre los dominios CL y CH1 mutados, a la vez que se reduzca su afinidad respectiva por otras contrapartes de tipo salvaje, evitando así el emparejamiento incorrecto en virtud de las interacciones desfavorables que ocurren en la complejación de cadenas no coincidentes (de tipo variante/salvaje), un par de residuos apolares interactuantes se intercambian por un par de aminoácidos polares, mientras que un par de residuos polares interactuantes se intercambian simultáneamente por un par de residuos hidrófobos.

El tercer y cuarto conjunto de mutaciones son mutaciones “perilla en agujeros”. Más específicamente, en el tercer conjunto de mutaciones (KH1), la Leu124 y la Leu143 del dominio CH1 se reemplazaron, respectivamente, por un residuo Ala y uno Glu, mientras que la Val133 de la cadena CL se reemplazó por un residuo de Trp, y en el cuarto conjunto de mutaciones (KH2), la Val190 del dominio CH1 se reemplazó por un residuo de Ala, y la Leu135 y la Asn137 de la cadena CL se reemplazaron, respectivamente, por un residuo Trp y uno Ala.

Los números de posición de secuencia utilizados en la presente memoria para los dominios CH1 y CL, se refieren a la numeración de Kabat (Kabat, E.A. y col., Sequences of proteins of immunological interest. 5ª edición - Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU., publicación NIH n.º 91-3242, págs. 662, 680, 689, 1991).

La presente memoria descriptiva describe un fragmento Fab mutado, seleccionado entre:

a) un fragmento Fab que consiste en:

\* los dominios VH y VL de un anticuerpo de interés;

\* un dominio CH1 que se deriva del dominio CH1 de una inmunoglobulina, mediante la sustitución del residuo de treonina en la posición 192 de dicho dominio CH1 con un residuo de ácido glutámico; y

\* un dominio CL que se deriva del dominio CL de una inmunoglobulina, mediante la sustitución del residuo de asparagina en la posición 137 de dicho dominio CL con un residuo de lisina, y la sustitución del residuo de serina en la posición 114 de dicho dominio CL con un residuo de alanina;

b) un fragmento Fab que consiste en:

\* los dominios VH y VL de un anticuerpo de interés;

\* un dominio CH1 que se deriva del dominio CH1 de una inmunoglobulina, mediante la sustitución del residuo de leucina en la posición 143 de dicho dominio CH1 con un residuo de glutamina, y la sustitución del residuo de serina en la posición 188 de dicho dominio CH1 con un residuo de valina; y

\* un dominio CL que se deriva del dominio CL de una inmunoglobulina, mediante la sustitución del residuo de valina en la posición 133 de dicho dominio CL con un residuo de treonina, y la sustitución del residuo de serina en la posición 176 de dicho dominio CL con un residuo de valina.

5 c) un fragmento Fab que consiste en:  
\* los dominios VH y VL de un anticuerpo de interés;

10 \* un dominio CH1 que se deriva del dominio CH1 de una inmunoglobulina IgG, mediante la sustitución del residuo de leucina en la posición 124 de dicho dominio CH1 con un residuo de alanina, y la sustitución del residuo de leucina en la posición 143 de dicho dominio CH1 con un residuo de ácido glutámico;

15 \* un dominio CL que se deriva del dominio CL de una inmunoglobulina IgG, mediante la sustitución del residuo de valina en la posición 133 de dicho dominio CL con un residuo de triptófano;

d) un fragmento Fab que consiste en:

20 \* los dominios VH y VL de un anticuerpo de interés;

\* un dominio CH1 que se deriva del dominio CH1 de una inmunoglobulina, mediante la sustitución del residuo de valina en la posición 190 de dicho dominio CH1 con un residuo de alanina; y

25 \* un dominio CL que se deriva del dominio CL de una inmunoglobulina, mediante la sustitución del residuo de leucina en la posición 135 de dicho dominio CL con un residuo de triptófano, y la sustitución del residuo de asparagina en la posición 137 de dicho dominio CL con un residuo de alanina.

Según la presente memoria descriptiva, el dominio CH1 se deriva de una inmunoglobulina IgG, ventajosamente del subtipo IgG1. El dominio CL es preferiblemente un tipo kappa. Preferiblemente, para su uso en terapia humana, la inmunoglobulina a partir de la cual se derivan los dominios CH1 y CL mutados, es una inmunoglobulina humana.

30 Los dominios VH y VL pueden derivarse de cualquier anticuerpo, nativo o diseñado genéticamente, que reconozcan un epítipo que se desee dirigir.

35 Los fragmentos Fab mutados pueden usarse en cualquier constructo de anticuerpo multiespecífico donde sea necesario evitar el emparejamiento incorrecto de la cadena pesada/cadena ligera.

Ventajosamente, se usan en un nuevo constructo de anticuerpo multiespecífico diseñado por los inventores, que comprende uno o más fragmentos de unión al antígeno multiespecíficos, cada uno de los cuales consiste esencialmente en fragmentos Fab dispuestos en tándem, separados por enlazadores apropiados.

40 Un “fragmento de unión al antígeno”, se define en la presente memoria como una molécula que tiene dos o más regiones de unión al antígeno, que reconocen cada una un epítipo diferente. Los diferentes epítipos pueden ser soportados por una misma molécula antigénica o por diferentes moléculas antigénicas.

45 Por lo tanto, la presente memoria descriptiva también describe un fragmento de unión al antígeno multiespecífico, que comprende al menos dos, y hasta cinco, fragmentos Fab diferentes, seleccionados entre:

50 – un fragmento Fab (en la presente memoria también definido como un: “fragmento Fab de tipo salvaje”) que comprende dominios CH1 y CL de tipo salvaje de una inmunoglobulina

– un fragmento Fab mutado (a), como se definió anteriormente;

55 – un fragmento Fab mutado (b), como se definió anteriormente;

– un fragmento Fab mutado (c), como se definió anteriormente;

– un fragmento Fab mutado (d), como se definió anteriormente;

60 cada fragmento Fab que reconoce un epítipo diferente de interés y disponiéndose dichos fragmentos Fab en tándem en cualquier orden, uniéndose el extremo C-terminal del dominio CH1 de un primer fragmento Fab al extremo N-terminal del dominio VH del siguiente fragmento Fab, a través de un enlazador polipeptídico.

La presente invención se refiere a un fragmento de unión al antígeno multiespecífico, que comprende dos o más regiones de unión al antígeno, cada una de las cuales reconoce un epítipo diferente, que comprende al menos un fragmento Fab mutado que consiste en:

- 5 – los dominios VH y VL de un anticuerpo que reconocen un epítipo de interés;
- un dominio CH1 que se deriva del dominio CH1 de una inmunoglobulina IgG1 humana, mediante la sustitución del residuo de leucina en la posición 143 de dicho dominio CH1 con un residuo de glutamina, y la sustitución del residuo de serina en la posición 188 de dicho dominio CH1 con un residuo de valina; y
- 10 – un dominio CL del tipo kappa que se deriva del dominio CL de una inmunoglobulina humana, mediante la sustitución del residuo de valina en la posición 133 de dicho dominio CL con un residuo de treonina, y la sustitución del residuo de serina en la posición 176 de dicho dominio CL con un residuo de valina,

15 en donde los números de posición de secuencia se refieren a la numeración de Kabat.

En una realización específica, la presente invención se refiere a un fragmento de unión al antígeno multiespecífico como se describió anteriormente, que comprende al menos los dos siguientes fragmentos Fab diferentes:

- 20 a) un fragmento Fab mutado que consiste en:
  - \* los dominios VH y VL de un anticuerpo que reconocen un epítipo de interés;
  - \* un dominio CH1 que se deriva del dominio CH1 de una inmunoglobulina IgG1 humana, mediante la sustitución del residuo de leucina en la posición 143 de dicho dominio CH1 con un residuo de glutamina, y la sustitución del residuo de serina en la posición 188 de dicho dominio CH1 con un residuo de valina; y
  - 25 \* un dominio CL del tipo kappa que se deriva del dominio CL de una inmunoglobulina humana, mediante la sustitución del residuo de valina en la posición 133 de dicho dominio CL con un residuo de treonina, y la sustitución del residuo de serina en la posición 176 de dicho dominio CL con un residuo de valina;
  - 30 y
- 35 b) al menos otro fragmento Fab que se selecciona del grupo que consiste en:
  - b1) un fragmento Fab de tipo salvaje que consiste en dominios CH1 y CL de tipo salvaje de una inmunoglobulina humana, y los dominios VH y VL de un anticuerpo que reconoce un epítipo de interés;
  - b2) un fragmento Fab mutado (a) que consiste en:
    - 40 \* los dominios VH y VL de un anticuerpo que reconocen un epítipo de interés;
    - \* un dominio CH1 que se deriva del dominio CH1 de una inmunoglobulina IgG1 humana, mediante la sustitución del residuo de treonina en la posición 192 de dicho dominio CH1 con un residuo de ácido glutámico; y
    - 45 \* un dominio CL del tipo kappa que se deriva del dominio CL de una inmunoglobulina humana, mediante la sustitución del residuo de asparagina en la posición 137 de dicho dominio CL con un residuo de lisina, y la sustitución del residuo de serina en la posición 114 de dicho dominio CL con un residuo de alanina;

50 en donde los números de posición de secuencia se refieren a la numeración de Kabat, y

en donde cada fragmento Fab reconoce un epítipo diferente de interés, y disponiéndose dichos fragmentos Fab en tándem en cualquier orden, uniéndose el extremo C-terminal del dominio CH1 de un primer fragmento Fab al extremo N-terminal del dominio VH del siguiente fragmento Fab, a través de un enlazador polipeptídico.

55 Generalmente, dicho enlazador de polipéptido debe tener una longitud de al menos 20, preferiblemente al menos 25, y aún más preferiblemente al menos 30, y hasta 80, preferiblemente hasta 60, y aún más preferiblemente hasta 40 aminoácidos.

60 Ventajosamente, dicho enlazador de polipéptido comprende toda o parte de la secuencia de la región bisagra de una o más inmunoglobulinas seleccionadas entre IgA, IgG e IgD. Si el anticuerpo se va a usar en terapia humana, se preferirán secuencias de bisagra de origen humano.

Las secuencias de las regiones bisagra de IgG, IgA e IgD humanas, se indican a continuación:

65 IgA1 (SEQ ID NO: 1):

VPSTPPTPSPSTPPTSPSPS

IgA2 (SEQ ID NO: 2):

VPPPPP

IgD (SEQ ID NO: 3):

ESPKAQASSVPTAQPQAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEEKKKEKEKEEQEERETKTP

IgG1 (SEQ ID NO: 4):

EPKSCDKTHTCPPCP

IgG2 (SEQ ID NO: 5):

ERKCCVECPCPCP

IgG3:

ELKTPLGDTTHTCPCRCP (SEQ ID NO: 6) seguido de 0, o 1 a 4 repeticiones de EPKSCDTPPPCPCRCP (SEQ ID NO: 7).

IgG4:

ESKYGPPCPCPCP (SEQ ID NO: 8)

Dicho enlazador polipeptídico puede comprender toda o parte de la secuencia de la región bisagra de solo una inmunoglobulina. En este caso, dicha inmunoglobulina puede pertenecer al mismo isotipo y subclase que la inmunoglobulina a partir de la cual se deriva el dominio CH1 adyacente, o a un isotipo o subclase diferente.

Alternativamente, dicho enlazador de polipéptido puede comprender todas o parte de las secuencias de regiones bisagra de al menos dos inmunoglobulinas de diferentes isotipos o subclases. En este caso, la parte N-terminal del enlazador de polipéptido, que sigue directamente al dominio CH1, consiste preferiblemente en toda o parte de la región bisagra de una inmunoglobulina que pertenezca al mismo isotipo y subclase que la inmunoglobulina de la que se deriva dicho dominio CH1.

Opcionalmente, dicho enlazador polipeptídico puede comprender, además, una secuencia de 2 a 15, preferiblemente de 5 a 10 aminoácidos N-terminales del dominio CH2 de una inmunoglobulina.

En algunos casos, se pueden usar secuencias de regiones bisagra nativas; en otros casos, las mutaciones puntuales pueden llevarse a estas secuencias, en particular la sustitución de uno o más residuos de cisteína en las secuencias bisagra nativas de IgG1, IgG2 o IgG3, por alanina o serina, a fin de evitar enlace o enlaces disulfuro intercatenarios no deseados.

Un ejemplo no limitativo de un enlazador polipeptídico que puede usarse en un fragmento multiespecífico de unión al antígeno de la invención, es un polipéptido que tenga la siguiente secuencia: EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSTPPTPSPSGG (SEQ ID NO: 9). Dicho polipéptido consiste en la secuencia de longitud completa de la bisagra de IgG1 humana (SEQ ID NO: 4), seguida de los 9 aminoácidos N-terminales de IgG1 humana CH2 (APELLGGPS, SEQ ID NO: 10), por una parte de la secuencia de bisagra de IgA1 humana (TPPTSPSPS, SEQ ID NO: 11), y por el dipéptido GG, añadido para proporcionar flexibilidad suplementaria al enlazador.

Opcionalmente, puede usarse una parte más corta de la secuencia N-terminal del dominio CH2 de IgG1 humana. Además, puede usarse una parte más larga de bisagra de IgA1 humana, hasta su secuencia de longitud completa (preferiblemente, menos el residuo de valina N-terminal). Según una realización particular, dicha secuencia bisagra de IgA1 humana puede sustituirse por una secuencia artificial, que contenga una alternancia de residuos de treonina, serina y prolina.

Por ejemplo, una variante del polipéptido de SEQ ID NO: 9, que también es adecuada para su uso en un fragmento multiespecífico de unión al antígeno de la invención, es un polipéptido que tenga la siguiente secuencia: EPKSCDKTHTCPPCPAPELLPSTPPSPSTPGG (SEQ ID NO: 12). En este polipéptido, la secuencia de longitud completa de la bisagra de IgG1 humana es seguida por los 5 aminoácidos N-terminales de IgG1 humana CH2 (APELL, SEQ ID NO: 13), y por la secuencia PSTPPSPSTP (SEQ ID NO: 14).

En el caso de un fragmento multiespecífico de unión al antígeno de la invención, que comprenda más de dos fragmentos Fab diferentes, los enlazadores polipeptídicos que separan los fragmentos Fab pueden ser idénticos o diferentes.

5 Según una realización preferida de un anticuerpo multiespecífico de la invención, tiene dos brazos de unión al antígeno idénticos, cada uno de los cuales consiste en un fragmento multiespecífico de unión al antígeno como se definió anteriormente. Los brazos de unión al antígeno se pueden unir de diversas formas, dependiendo del uso previsto para el anticuerpo.

10 Si se desea obtener un anticuerpo sin efectos mediados por Fc, el anticuerpo no comprenderá ninguna región Fc. En este caso, los dos brazos de unión al antígeno se pueden unir entre sí, por ejemplo:

– por homodimerización de los brazos de unión al antígeno, a través de los enlaces disulfuro intercatenarios proporcionados por el enlazador o enlazadores polipeptídicos que separan los fragmentos Fab si dicho enlazador  
15 contiene residuos cisteína; y/o

– a través de la adición en el extremo C-terminal de cada brazo de unión al antígeno, de una extensión polipeptídica que contenga residuos de cisteína que permitan la formación de enlaces disulfuro intercatenarios y homodimerización de dicha extensión polipeptídica, lo que da como resultado una estructura similar a la bisagra; a  
20 modo de ejemplos no limitativos, dicha extensión polipeptídica puede ser, por ejemplo, una secuencia bisagra de una IgG1, IgG2 o IgG3;

– a través de un enlazador semirrígido que une los extremos C-terminales de las cadenas pesadas de los dos  
25 brazos de unión al antígeno, para formar una cadena polipeptídica única y mantener dichos brazos de unión al antígeno a una distancia suficiente entre sí.

Alternativamente, si se desean funciones efectoras, tales como CDC, ADCC o ADP, un anticuerpo multiespecífico de la invención comprenderá, además, un dominio Fc que proporciona estas funciones efectoras. La elección del dominio Fc dependerá del tipo de funciones efectoras que se deseen.

30 En este caso, un anticuerpo multiespecífico de la invención comprende:

– dos brazos de unión al antígeno multiespecíficos idénticos, que consisten cada uno en un fragmento multiespecífico de unión al antígeno como se definió anteriormente;

35 – los dominios CH2 y CH3 dimerizados de una inmunoglobulina;

– la región bisagra de una IgA, IgG o IgD, que une los extremos C-terminales de los dominios CH1 de los brazos de unión al antígeno a los extremos N-terminales de los dominios CH2.

40 La presente memoria descriptiva también describe un anticuerpo multiespecífico que comprende, además, la región bisagra de una IgA, IgG o IgD, que une los extremos C-terminales de los dominios CH4 de una IgM o IgE después de los dominios CH3, estando los extremos C-terminales de los dominios CH1 de los brazos de unión al antígeno, en este caso, unidos directamente a los extremos N-terminales de los dominios CH2.

45 Preferiblemente, los dominios CH2 y CH3 y o bien la región bisagra o bien los dominios CH4, se derivan de una misma inmunoglobulina o de inmunoglobulinas del mismo isotipo y subclase que los dominios CH1 del brazo de unión a los antígenos.

50 Pueden usarse los dominios CH2, CH3 y, opcionalmente, CH4, así como las regiones bisagra de las inmunoglobulinas nativas. También es posible mutar, si se desea, por ejemplo, a fin de modular la función efectora del anticuerpo. En algunos casos, todo o parte del dominio CH2 o del CH3 puede omitirse.

La presente memoria descriptiva también describe cualquier cadena de proteínas seleccionada entre:

55 – una cadena ligera de un fragmento Fab mutado;

– una cadena pesada de un fragmento Fab mutado;

60 – una cadena pesada de un fragmento de unión al antígeno;

– una cadena pesada de un anticuerpo multiespecífico similar a inmunoglobulina.

La presente memoria descriptiva también describe un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica una  
65 cadena de proteínas como se describió anteriormente. Dicho polinucleótido también puede comprender secuencias

adicionales: en particular, puede ventajosamente comprender una secuencia que codifique una secuencia líder o señal peptídica que permita la secreción de dicha cadena de proteínas.

5 La presente memoria descriptiva también describe vectores recombinantes, en particular, vectores de expresión, que comprenden un polinucleótido como se describió anteriormente, asociado con los elementos de control de la transcripción y la traducción que sean activos en la célula huésped escogida. Los vectores que pueden usarse para construir vectores de expresión se conocen en sí mismos, y se elegirán en particular como una función de la célula huésped que se pretende usar.

10 La presente invención también abarca una célula huésped transformada con un polinucleótido que codifica una cadena pesada de un fragmento de unión al antígeno multiespecífico o de un anticuerpo multiespecífico de la invención, y al menos dos polinucleótidos que codifican dos cadenas ligeras diferentes: una primera cadena ligera que se empareja específicamente con una primera región VH/CH1 de dicha cadena pesada; una segunda cadena ligera que se empareja específicamente con una segunda región VH/CH1 de dicha cadena pesada, y al menos una de dichas cadenas ligeras es una cadena ligera de un fragmento Fab mutado como se describió anteriormente.

15 Opcionalmente, dicha célula huésped puede transformarse adicionalmente con un tercer polinucleótido que codifique una tercera cadena ligera diferente de la primera y segunda cadenas ligeras, y emparejarse específicamente con una tercera región VH/CH1 de dicha cadena pesada y, opcionalmente, con un cuarto polinucleótido que codifique una cuarta cadena ligera diferente de la primera, segunda y tercera cadenas ligeras, y emparejarse específicamente con una cuarta región VH/CH1 de dicha cadena pesada y, posiblemente, con un quinto polinucleótido que codifique una quinta cadena ligera diferente de la primera, segunda, tercera y cuarta cadenas ligeras, y emparejarse específicamente con una quinta región VH/CH1 de dicha cadena pesada.

20 Dichos polinucleótidos pueden insertarse en un mismo vector de expresión, o en vectores de expresión independientes.

25 Las células huésped que pueden usarse en el contexto de la presente invención, pueden ser células procariotas o eucariotas. Entre las células eucariotas que se pueden usar, se hará mención, en particular, a las células vegetales, las células de levadura, tales como *Saccharomyces*, las células de insectos, tales como las células de *Drosophila* o de *Spodoptera*, y las células de mamíferos, tales como las células HeLa, CHO, 3T3, C127, BHK, COS, etc.

30 El constructo de vectores de expresión y la transformación de las células huésped, pueden llevarse a cabo mediante las técnicas convencionales de biología molecular.

35 Aún otro objetivo de la invención, es un método para preparar un fragmento de unión al antígeno multiespecífico o un anticuerpo multiespecífico de la invención. Dicho método comprende cultivar una célula huésped de la invención y recuperar dicho fragmento o anticuerpo de unión al antígeno de dicho cultivo.

40 Si la proteína es secretada por la célula huésped, puede recuperarse directamente del medio de cultivo; si no, la lisis celular se llevará a cabo de antemano. El anticuerpo se puede purificar a partir del medio de cultivo o del lisado celular, mediante procedimientos convencionales, conocidos por sí mismos por los expertos en la técnica, por ejemplo, mediante precipitación fraccionada, en particular, precipitación con sulfato de amonio, electroforesis, filtración en gel, cromatografía de afinidad, etc.

45 Los fragmentos de unión al antígeno multiespecíficos o anticuerpos de la invención, pueden usarse en todas las aplicaciones de anticuerpos multiespecíficos. En particular, se pueden usar para obtener medicamentos útiles en una amplia gama de aplicaciones terapéuticas. Estos productos medicinales también son parte del objeto de la invención.

50 En particular, los anticuerpos multiespecíficos de la invención pueden usarse para el tratamiento de diversas enfermedades mediante inmunoterapia, que incluyen, por ejemplo: inmunoterapia pasiva para patologías malignas, tumores hematológicos y sólidos o enfermedades autoinmunitarias, inflamación, rechazo de injertos, trasplantes; inmunoterapia activa, mediante la modulación de la interacción entre diferentes poblaciones celulares en células inmunitarias particulares durante enfermedades autoinmunitarias o inflamación; inmunoterapia adoptiva, que combina células inmunitarias con un anticuerpo multiespecífico; internalización de anticuerpos neutralizantes en un compartimento intracelular seleccionado.

A modo de ejemplos no limitativos:

- 60 – anticuerpos multiespecíficos de la invención dirigidos contra diferentes antígenos expresados por células diana, pueden usarse a fin de inducir su muerte por apoptosis, su regulación negativa o, por el contrario, su activación;
- anticuerpos multiespecíficos de la invención dirigidos contra antígenos expresados en células diana y efectoras, pueden usarse a fin de unir los dos tipos de células, para inducir, por ejemplo, la destrucción de las células diana, por las células efectoras;
- 65

– anticuerpos multiespecíficos dirigidos contra diferentes factores circulantes solubles, para eliminar o bloquear al mismo tiempo dichos factores circulantes solubles, por ejemplo, la eliminación simultánea de VEGF y PDGF en el curso de la terapia contra el cáncer, o la eliminación (o bloqueo) simultánea de diferentes moléculas que inhiban la actividad de la inmunoterapia, tal como CTLA4, muerte celular programada 1 (PD1) o TIM3 o BTLA, o en el campo de la terapia antiinflamatoria, el uso de anticuerpos multiespecíficos dirigidos contra diferentes citocinas inflamatorias, tales como Factor de necrosis tumoral (TNF, por sus siglas en inglés) e interleuquina 1 beta (IL1- $\beta$ )

La presente invención se entenderá más claramente a partir de la descripción adicional que sigue, que se refiere a ejemplos no limitantes de la preparación y propiedades de un anticuerpo biespecífico recombinante según la invención.

Ejemplo 1: Diseño de un anticuerpo biespecífico anti-CD5/anti-HLA-DR.

#### Diseño de fragmentos Fab mutantes

Los anticuerpos elegidos para el constructo de anticuerpos biespecíficos son un anticuerpo anti-CD5 y un anticuerpo anti-HLA-DR, ambos descritos en el documento PCT WO 2010/145895.

En su forma nativa, estos anticuerpos eran anticuerpos monoclonales (mAb) murinos, de los isotipos IgG2a e IgG1, respectivamente, con cadenas ligeras kappa. Ambos mAb se transformaron previamente en mAb quiméricos de ratón/humanos, siendo los dominios constantes de la cadena pesada de la subclase IgG1 humana, y siendo la parte constante de las cadenas ligeras de tipo kappa, mientras que los dominios variables de ambas cadenas siguieron siendo de origen de ratón.

Dos conjuntos diferentes de mutaciones complementarias se llevaron a sitios elegidos de cadenas CH1 y CL del anticuerpo anti-CD5, permaneciendo el anticuerpo anti-HLA-DR en su forma nativa.

Los sitios de mutación en el anticuerpo anti-CD5 se eligieron para ser importantes para la unión de CL/CH1, mientras se conservaron los restos más esenciales implicados en el plegamiento apropiado.

Se utilizaron los siguientes enfoques denominados “Residuos cargados” e “Intercambio de hidrofobicidad-polaridad”.

En el enfoque “Residuos cargados”, se intercambió un par de residuos de interfaz polares interactuantes por un par de residuos de formación de puente neutro y de sal. Se planteó la hipótesis de la introducción de un puente de sal para reforzar la especificidad de la asociación, mientras que un emparejamiento no deseado debe evitarse por la falta de complementariedad estereonómica y de carga entre las cadenas de tipo salvaje y variantes. Después de extensas pruebas *in silico*, se seleccionó la sustitución de Thr192 por Glu en la cadena CH1, y el intercambio de Asn137 a una Lys en la cadena CL. Estos dos restos mutados forman un puente de sal. Además, se preparó una sustitución de Ser114 a Ala en la cadena CL, para evitar choques estéricos con una cadena lateral más grande de lisina. El mutante resultante se indica en lo sucesivo como “mutante CR3”.

Para el enfoque de “Intercambio de hidrofobicidad-polaridad”, los dominios constantes modificados se obtuvieron mediante la introducción de una mutación cuádruple (doble mutación en cada cadena). Esta modificación intercambia la naturaleza de dos interacciones residuo-residuo en la interfaz de IgG CH1/CL. Un par de residuos apolares interactuantes se intercambian por un par de aminoácidos polares, mientras que un par de residuos polares interactuantes se intercambian simultáneamente por un par de residuos hidrófobos. Se planteó la hipótesis de este intercambio del carácter polar/hidrófobo de las interacciones de la interfaz, para mantener sin cambios la afinidad entre los dominios CL y CH1 mutados, mientras que se redujo su afinidad respectiva por otras contrapartes de tipo salvaje, evitando así el emparejamiento incorrecto en virtud de las interacciones desfavorables que ocurren tras la complejación de cadenas (de tipo salvaje/tipo salvaje) no coincidentes

Después de las pruebas *in silico*, se eligieron muchas posibles mutaciones para reemplazar la Leu143 del dominio CH1 por un residuo de Gln, mientras que el residuo opuesto de la cadena CL, es decir, Val133, se reemplazó por un residuo Thr. Esta primera doble mutación constituye el cambio de interacciones hidrófobas a polares. Simultáneamente, se seleccionó una mutación de dos serinas interactuantes (Ser188 en la cadena CH1, y Ser176 en la cadena CL) a residuo de valina, para realizar el cambio de interacciones polares a hidrófobas. El mutante resultante se indica en lo sucesivo como “mutante mut4”.

Las mutaciones seleccionadas se resumen en la Tabla I a continuación:

Tabla I

| Modificaciones                       | CH1 de cadena pesada | CL de cadena ligera   |
|--------------------------------------|----------------------|-----------------------|
| Residuos cargados <i>mutante CR3</i> | Thr192Glu            | Asn137Lys y Ser114Ala |

| Modificaciones                                              | CH1 de cadena pesada  | CL de cadena ligera   |
|-------------------------------------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| Intercambio de hidrofobicidad-polaridad <i>mutante mut4</i> | Leu143Gln y Ser188Val | Val133Thr y Ser176Val |

Se realizaron otras mutaciones mediante el uso del enfoque de “perillas en agujeros” (RIDGWAY y col., Protein Eng, 9, 617-21, 1996).

5 Estas mutaciones se resumen en la Tabla II a continuación:

Tabla I

|     | CH1/Cadena pesada     | CL/Cadena ligera      |
|-----|-----------------------|-----------------------|
| KH1 | Leu124Ala y Leu143Glu | Val133Trp             |
| KH2 | Val190Ala             | Leu135Trp y Asn137Ala |

10 Los complejos mutados que se unen a las energías libres se evaluaron utilizando el método MM-GBSA. Al mismo tiempo, se crearon los modelos de complejos mal emparejados, y se calcularon sus energías de interacción utilizando la misma metodología. Para las modificaciones elegidas, se estimó que el complejo entre las cadenas CL y CH1 modificadas era estable como complejo de tipo salvaje, mientras que se observaron interacciones significativamente desfavorables en los complejos mal emparejados.

#### 15 Diseño de un enlazador polipeptídico

Se diseñó un enlazador polipeptídico para unir el extremo C de la región CH1 del anticuerpo anti-HLADR al extremo N de la región VH del anticuerpo anti-CD5 mutante.

20 Este enlazador polipeptídico comprende una región bisagra de IgG1 de longitud completa, seguida de los 9 aminoácidos N-terminales de IgG1 humana CH2, por una parte de la secuencia de bisagra de IgA1 humana, y por el dipéptido GG. Tiene la siguiente secuencia: EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSTPPTSPSGG (SEQ ID NO: 9)

#### 25 **Ejemplo 2: Construcción de un baculovirus recombinante que expresa un anticuerpo biespecífico anti-HLADR (mAb1) y anti-CDS (mAb2).**

El anticuerpo biespecífico se ha expresado y producido mediante el uso del sistema de expresión de baculovirus/células de insectos.

30 Esta producción requirió la síntesis de una cadena pesada modificada que comprende el dominio VH/CH1/bisagra de un mAb1 fusionado a la cadena pesada de longitud completa de un mAb2, y separada por un enlazador que comprende, por ejemplo (en nuestra construcción actual), la bisagra inferior extendida con un péptido derivado de la bisagra natural de IgA1 humana + GG.

35 Las dos cadenas ligeras diferentes, una específica del primer anticuerpo, y la otra específica del segundo anticuerpo, se sintetizan independientemente y se emparejarán con las cadenas pesadas relevantes, gracias a las mutaciones recíprocas introducidas en los diferentes dominios CL y CH1, como se describió anteriormente.

40 Podría ser más fácil construir dos baculovirus diferentes; el primero que expresase la cadena pesada fusionada y solo una cadena ligera, y el segundo que expresase la cadena pesada fusionada y la segunda cadena ligera, y para coinfectar células de insectos con la mezcla. Sin embargo, este enfoque es más largo, y sería muy difícil controlar la estequiometría de cada pareja. Por lo tanto, se decidió construir solo un virus recombinante que exprese la cadena pesada fusionada y las dos cadenas ligeras.

45 Esto requirió la introducción en dicho baculovirus de dos secuencias idénticas para los dominios CL, y dos secuencias idénticas para los dominios CH1-bisagra (CH1 + Hg) de la cadena pesada. Esta identidad puede inducir una recombinación homóloga que conduzca a una reorganización del genoma y a la pérdida de información genética.

50 Para evitar este fenómeno, se introdujo solo una secuencia codificante de tipo salvaje, siendo la segunda sintética (modificación de todos los codones). En esta última, la secuencia de ADN es diferente de la original, pero codifica una proteína idéntica (100 %) al tipo salvaje.

#### 55 2.1 Construcción del ADNc que codifica la cadena pesada fusionada

Fab anti-HLADR + enlazador

Se construyó un gen sintético que codifica el dominio CH1 del anticuerpo anti-HLADR fusionado con el enlazador de polipéptido de SEQ ID NO: 9, utilizando hibridación de oligonucleótidos superpuestos sintéticos.

Después de la clonación en un plásmido pUC y del control de las secuencias, se introdujo este gen sintético, en lugar de la secuencia de tipo salvaje en el plásmido pOCy1KCH1SII/EnlazadorA1PstI/VHanti-HLADR, entre la secuencia que codifica el dominio VH anti-HLADR, y la secuencia que codifica el péptido de extensión descrito en el Ejemplo 1 anterior. El plásmido resultante se denomina pOCy1KCH1εenlazadorA1/VH.

#### Fab anti-CD5 mutado:

Para asegurar el emparejamiento adecuado entre las cadenas pesadas y las ligeras, se introdujeron mutaciones CR3, mut4, (KH1 o KH2) en el dominio CH1 del resto Fab anti-CD5. El plásmido pUCCy1mutT192E (es decir, para el mutante CR3) se digirió con NheI/BstXI, y el fragmento que porta la secuencia mutada se purificó e insertó en pUCKPSCy1/VHCD5 digerido con NheI/BstXI, dando pUCKPSCy1/VHCD5-CR3.

De la misma manera, se construyeron pUCKPSCy1/VHCD5-mut4, (pUCKPSCy1/VHCD5-KH1, y pUCKPSCy1/VHCD5-KH2).

#### Cadena pesada fusionada de longitud completa:

Se construyó el ADNc que codifica las cadenas pesadas fusionadas de longitud completa, dando pVTanti-HLADR/enlazadorA1/antiCD5/CR3, pVTanti-HLADR/enlazadorA1/antiCD5/mut4, (pVTanti-HLADR/enlazadorA1/antiCD5/KH1, pVTanti-HLADR/enlazadorA1/antiCD5/KH2), respectivamente.

Los vectores de transferencia resultantes se denominan pVTanti-HLADR/enlazadorA1/antiCD5/CR3 y pVTanti-HLADR/enlazadorA1/antiCD5/mut4 (pVTanti-HLADR/enlazadorA1/antiCD5/KH1, y pVTanti-HLADR/enlazadorA1/antiCD5/KH2), respectivamente.

### 2.2 Construcción del ADNc que codifica la cadena ligera

#### Construcción de un nuevo vector de transferencia

La producción de un anticuerpo biespecífico completamente funcional requiere la coexpresión de (i) una cadena pesada fusionada como se describió anteriormente, y de (ii) dos cadenas ligeras; la cadena ligera específica de anti-CD5, que porta las mutaciones (CR3, mut4, KH1 o KH2), y la cadena ligera del anti-HLADR (mAb1). Esto requiere elegir un tercer locus, además de la poliedina clásica y los loci p10, para insertar una tercera cadena de secuencia codificante en el genoma del baculovirus. Se eligió un locus denominado “gp37” (CHENG y col. J. Gen. Virol., 82, 299-305, 2001) que no es esencial para la replicación del baculovirus, lo que permite, por tanto, la inserción de un gen extraño.

Se construyó un nuevo vector de transferencia (pVTgp37) que contenía un sitio de clonación XbaI único, bajo el control de un promotor de P10 sintético, flanqueado por secuencias de gp37.

#### Construcción de un dominio CL sintético

Como se describe para la reconstitución del dominio CH1 de la cadena pesada, el dominio CL sintético se sintetizó utilizando oligonucleótidos sintéticos superpuestos. Se generaron dos subfragmentos, CKFr1 y CKFr2.

Después de la clonación en un plásmido pUC y del control de las secuencias, se introdujeron CKFr1 y CKFr2, en lugar de la secuencia de tipo salvaje que codifica el dominio Cκ, en el plásmido pUCK/VLanti-HLADR

#### Introducción de la cadena ligera en el vector de transferencia de gp37

La secuencia reconstituida que codifica la cadena ligera que contiene el dominio constante sintético Cκ se aisló después de la digestión con XbaI, y se introdujo en el vector de transferencia pVTgp37 en el sitio XbaI único, dando el constructo final pVTgp37P10S1CKεVLanti-HLADR.

### 2.3 Construcción de virus recombinantes

La construcción de un virus recombinante que exprese el anticuerpo biespecífico requiere dos pasos: (i) la construcción de un primer baculovirus que exprese solo la cadena ligera de mAb1, la anti-HLADR; (ii) la construcción del virus que exprese el anticuerpo biespecífico, anti-CD 5/anti-HL ADR.

#### Construcción de un virus recombinante que exprese el anti-HLADR

Para este fin, las células Sf9 se cotransfectaron con pVTgp37P10S1CKεVL/anti-HLADR y con ADN extraído de un baculovirus modificado que expresaba el gen de polihedrina bajo el control del promotor gp37 en el locus gp37.

- 5 Se aislaron virus recombinantes que presentaban un fenotipo “polihedrina negativo”, y el genoma de cuatro virus recombinantes se controló por transferencia Southern mediante el uso del ADNc kappa sintético como sonda. Se seleccionó un virus recombinante denominado BacLC/anti-HLADR.

#### Construcción de virus recombinantes que expresen el anticuerpo biespecífico

- 10 Las células Sf9 se cotransfectaron con vectores de transferencia que portan el ADNc que codifica cadenas pesadas fusionadas pVTanti-HLADR/enlazadorA1/anti-CD5 (CR3, mut4, KH1 o KH2), y los vectores de transferencia que portan el ADNc que codifica las cadenas ligeras de mAb2 pVTVLIICD5CkmutCR3, pVTVLIICD5Ckmut4, (pVTVLIICD5CkKH1, o pVTVLIICD5CkKH2) en presencia de ADN viral extraído de BacLC/anti-HLADR. Los clones productores se seleccionaron por ELISA. El genoma de los virus recombinantes se controló por transferencia Southern  
15 mediante el uso de ADNc que codifican la constante humana γ1, y la región constante κ, respectivamente, como sondas. Se utilizaron dos de los clones seleccionados (clon C683 para anti-CD5/anti-HLADR(CR3), y clon C977 para anti-CD5/anti-HLADR(mut4)) para la producción de anticuerpos.

#### 2.4 Producción y purificación de los anticuerpos recombinantes

- 20 Las células Sf9 se sembraron a una densidad de 600.000 células/ml en 400 ml de medio exento de suero, en frascos de cultivo, y se infectaron o bien con clon C683 o bien con clon C977, a una multiplicidad de infección de 2 UFP por célula. Después de 4 días de incubación a 28 °C, se recogió el sobrenadante, y se purificaron los anticuerpos recombinantes secretados en la proteína A Sepharose (GE, HealthCare). La concentración de anticuerpos  
25 biespecíficos purificados se determinó mediante el uso del ensayo BCA, según lo recomendado por el fabricante PIERCE, y con IgG bovina (ref. estándar PIERCE 23209) como estándar.

La estructura de los anticuerpos biespecíficos finales se muestra en la Figura 1.

- 30 Leyenda de la Figura 1: mAb1: Fab anti-HLA-DR; mAb2: Fab mutante anti-CD5; Enlazador: enlazador polipéptido; Bisagra: bisagra de IgG1 humana; Región Fc de IgG1 humana Fc. Debido a la presencia de 2 residuos de cisteína de la bisagra de IgG1, los dos brazos de unión al antígeno se conectan a través de dos puentes disulfuro intercatenarios.

- 35 El peso molecular de los anticuerpos mutantes anti-CD5/anti-HLADR purificados se evaluó en Superose 6. Más del 90 % de las moléculas purificadas en la proteína A Sefarosa presentaron un peso molecular estimado de aproximadamente 299 kDa en Superose 6, correlacionando así con el peso molecular teórico de 260 kDa (PM calculado sin glucanos) para el anticuerpo biespecífico recombinante de la Figura 1.

- 40 Estos anticuerpos se analizaron adicionalmente mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras. Los resultados se muestran en la Figura 2.

Leyenda de la Figura 2: (A) Muestras analizadas en condiciones reductoras; (B) Muestras analizadas en condiciones no reductoras; BS: anticuerpo biespecífico; mAb: IgG1 recombinante anti-HLADR de control.

- 45 El tamaño de la cadena pesada de los anticuerpos biespecíficos estimados en este gel, corresponde al peso molecular calculado de 78.000 Da de la cadena pesada fusionada del anticuerpo de la Figura 1.

Estos análisis indican que la metodología descrita aquí conduce a la formación de una molécula resultante de la asociación de dos cadenas pesadas fusionadas, con dos pares de cadenas ligeras.

- 50 Ejemplo 3: Propiedades funcionales de anti-CD5/anti-HLADR (CR3)

#### Funcionalidad de los sitios de unión

- 55 Fue importante mostrar que los anticuerpos biespecíficos eran capaces de unirse a través de sus 2 sitios de unión de anticuerpos diferentes. Para ese fin, probamos su unión a células que expresaron o bien CD5 o bien HLADR, mediante citometría de flujo. Brevemente, todos los anticuerpos en estudio se acoplaron con ficoeritrina (PE), mediante el uso del kit de etiquetado de IgG humana (o de ratón) de Zenon R-ficoeritrina. A continuación, las líneas celulares se incubaron con anticuerpos biespecíficos anti-CD5, anti-HLADR, CR3 etiquetados con PE, o anticuerpos de control irrelevantes de IgG1 humana o de ratón, se lavaron, y luego se analizaron mediante citometría de flujo.  
60

Los resultados de la unión a la línea celular Jurkat CD5<sup>+</sup>/HLADR<sup>-</sup>, y a la línea celular CD5<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup>, se muestra en las Figuras 3 y 4, respectivamente.

- 65 Leyenda de la Figura 3: La línea celular Jurkat (CD5<sup>+</sup>/HLADR<sup>-</sup>) se tiñó con anti-CD5 de ratón (anti-CD5m) etiquetado con PE, anti-HLADR de ratón (anti-HLADm), anticuerpo quimérico biespecífico anti-CD5/anti-HLADR CR3, o

anticuerpos de control IgG1 humano o de ratón (hlgG1 y mlgG1, respectivamente), todos etiquetados con PE. A continuación, las células se analizaron mediante citometría de flujo estándar. Se muestran los histogramas superpuestos para cada anticuerpo, con valores de intensidad de fluorescencia media (MFI) indicados entre paréntesis para cada anticuerpo. 1. mlgG-PE, 1 µg (MFI = 2,6); 2. Anti-CD5m-PE, 1 µg (MFI = 17); 3. Anti-HLADRM-PE, 1 µg (MFI = 2,5); 4. hlgG1-PE, 1 µg (MFI = 3,9); 5. Anti-CD5/anti-HLADR/chi-PE CR3, 1 µg (MFI = 103).

Leyenda de la Figura 4: La línea celular JOK1 (CD 5-/HLADR+) se tiñó con anti-CD5 de ratón (anti-CD5m) etiquetado con PE, anti-HLADR de ratón (anti-HLADRM), anticuerpo quimérico biespecífico anti-CD5/anti-HLADR CR3, o anticuerpos de control IgG1 humano o de ratón (mlgG1 y hlgG1, respectivamente), todos etiquetados con PE. A continuación, las células se analizaron mediante citometría de flujo estándar. Se muestran los histogramas superpuestos para cada anticuerpo, con valores de intensidad de fluorescencia media (MFI) indicados entre paréntesis para cada anticuerpo. 1. mlgG1-PE, 1 µg (MFI = 25); 2. (sombreados) Anti-CD5m-PE, 1 µg (MFI = 18); 3. Anti-HLADRM-PE, 1 µg (MFI = 432); 4. hlgG1-PE, 1 µg (MFI = 3); 5. Anti-CD5/anti-HLADR/chi-PE CR3, 1 µg (MFI = 3521).

La Figura 3 muestra que tanto anti-CD5 de ratón como CR3 biespecíficos, son capaces de unirse a la línea celular Jurkat CD5+, mientras que el anticuerpo anti-HLADR, no, como se esperaba. Por lo tanto, el anticuerpo biespecífico CR3 reconoce el antígeno CD5 en la línea celular positiva para CD5.

La Figura 4 muestra que los anticuerpos anti-HLADR de ratón y biespecíficos CR3, se unen con alta intensidad a la línea celular Jurkat CD5+/HLADR+, mientras que el anti-CD5 de ratón, no, como se esperaba. Esto demuestra que el anticuerpo biespecífico CR3 reconoce el antígeno HLADR en una línea celular HLADR+.

Se concluyó que el anticuerpo biespecífico CR3 reconoce ambas especificidades (CD5 y HLADR) correctamente.

#### Unión a los antígenos expresados en una misma célula

A continuación, se desea documentar adicionalmente que el anticuerpo biespecífico CR3 que se mostró, fue capaz de unirse a sus 2 dianas cuando se expresaron en la misma superficie celular, es decir, en *cis*. Con este fin, primero se identificó una muestra de paciente con B-LLC que expresaba aproximadamente las mismas cantidades de CD5 y HLADR. Las células B-CLL de pacientes se incubaron con anticuerpo de control, anti-CD5 de ratón, anti-HLADR de ratón, o IgG1 de ratón, durante 30 minutos a temperatura ambiente, y luego con anticuerpo secundario anti-IgG de ratón etiquetado con FITC. Después del lavado, las células se analizaron mediante citometría de flujo estándar. Como se muestra en la Figura 5A, las células expresaron cantidades similares de CD5 y HLADR, con intensidades de fluorescencia medias de 65 y 98, respectivamente.

Con el fin de demostrar que el anticuerpo biespecífico anti-CD5/anti-HLADR CR3 unió ambos antígenos en las mismas células, entonces se realizó un experimento de bloqueo cruzado en la misma muestra de B-LLC. Las células se incubaron con 1 µg/ml de anticuerpo biespecífico CR3 quimérico, en presencia o ausencia de anticuerpos anti-CD5 o anti-HLADR de ratón en exceso (10 µg/ml), o de ambos. Después del lavado, la unión del anticuerpo biespecífico CR3 se detectó mediante la incubación con un anticuerpo monoclonal secundario etiquetado con FITC (Sigma-Aldrich), específico para Fc humano, y no fue capaz de unirse al Fc de ratón (datos no mostrados).

Leyenda de la Figura 5:

Panel A: Las células B-CLL de pacientes se incubaron con el anticuerpo anti-CD5 de ratón (mCDS), anti-HLADR de ratón (mDR), o IgG irrelevante de ratón (mlgG), como control. Después del lavado, las células se tiñeron con anticuerpo secundario anti-ratón etiquetado con FITC, y luego se analizaron mediante citometría de flujo estándar. La MFI para mCDS y mDR se indica entre paréntesis.

Panel B: Las células del mismo paciente que en A se incubaron con 1 µg/ml de CR3 quimérico por sí solo (línea gruesa oscura), o en presencia de 10 µg/ml de anti-CD5 de ratón (línea gris clara), o anti-HLADR de ratón (línea gris oscura), o con ambos (línea discontinua). Después del lavado, las células se incubaron con anticuerpo monoclonal anti-Fc humano etiquetado con FITC, se lavaron, y se analizaron mediante citometría de flujo. Los histogramas superpuestos para cada condición se muestran con la MFI obtenida en cada caso, indicado por encima de cada curva. BS: Biespecíficos, m: ratón, h: humano, chi: quimérico.

|                                                                                     |                                         | MFI |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|-----|
|  | Control negativo (anti-IgG humana-FITC) | 6   |
|  | chBI-CR3, 1 ug/ml                       | 97  |
|  | chBI-CR3, 1 ug/ml + mCD5, 10 µg/ml      | 72  |
|  | chBI-CR3, 1 ug/ml + mDR, 10 µg/ml       | 54  |
|  | chBI-CR3, 1 ug/ml + mCD5+mDR, 10 ug/ml  | 20  |

Como se muestra en la Figura 5B, el anticuerpo biespecífico CR3 por sí solo, dio como resultado una intensidad de fluorescencia media (MFI, por su siglas en inglés) de 97. La competencia por anti-CD5 o anti-HLADR por sí solos, solo desplazó CR3 parcialmente (MFI 72 y 54, respectivamente). Por el contrario, la adición de ambos anticuerpos desplazó el anticuerpo biespecífico CR3 casi completamente (MFI 20). Estos datos sugieren que el anticuerpo biespecífico CR3 se une a las células a través o bien del resto CD5 o bien del HLADR, desplazarlo requiere competencia por una mezcla de anticuerpos anti-CD5 y anti-HLADR.

Se concluye de estos datos que el anticuerpo biespecífico CR3 y el anticuerpo quimérico anti-CD5/anti-HLADR, puede unirse tanto a HLADR como a CD5 en la misma célula.

Ejemplo 4: Funcionalidad del resto Fc y del resto de unión al antígeno de los anticuerpos biespecíficos

#### Resto Fc

El resto Fc de las moléculas de anticuerpo es capaz de activar diversas funciones inmunitarias, tales como fagocitosis (ADP) y citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC), mediante la unión a FcγR en macrófagos (FcγRI, II y III) y células NK (FcγRIII), respectivamente. Dado que los anticuerpos biespecíficos construidos tienen un resto Fc derivado de la IgG1 humana, se probó si era funcional y, por lo tanto, capaz de mediar estas funciones inmunomediadas.

#### Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) por células asesinas naturales

Primero se quería determinar si la parte Fc de la molécula biespecífica CR3 estaba activa cuando cualquiera de sus parátomos estaba unido a su molécula respectiva. Se analizó la ADCC, mediada por la unión de Fc a las células NK, inducida en una diana CD5<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup>, tal como en células Jurkat, y en dianas HLA-DR<sup>+</sup>/CD5<sup>+</sup>, tales como JOK1 y células dobles positivas JOK1.5.3 dianas. Las células NK se purificaron de células mononucleares de sangre periférica mediante selección de inmunoesferas. Las células diana se etiquetaron con 1 μM de éster succinimidílico de diacetato de carboxifluoresceína (CFSE, por sus siglas en inglés) a 4 °C durante 20 minutos, se lavaron, y se cultivaron con células NK purificadas a 37 °C durante 4 horas, a una relación entre efector y diana, de 10:1 (E:T). A continuación, las células se etiquetaron con 7AAD, y se analizaron mediante citometría de flujo. El porcentaje de destrucción se midió como el porcentaje de dianas positivas para 7AAD (CFSE<sup>+</sup>) con respecto a las células CFSE<sup>+</sup> totales.

Los resultados se muestran en la Figura 6.

Leyenda de la Figura 6: JURKAT (CD5<sup>+</sup>HLADR<sup>+</sup>, panel A), JOK1 (CD5<sup>+</sup>HLADR<sup>+</sup>, panel B) y JOK1.5.3 (CD5<sup>+</sup>HLADR<sup>+</sup>, panel C) se etiquetaron con CFSE, y se utilizaron en ensayos de ADCC en presencia de células NK humanas, a una relación E:T de 10:1, y 1 μg/ml de anti-CD5 quimérico (anti-CD5chi) o anti-HLADR quimérico (anti-HLARchi), o 2 μg/ml de anticuerpo biespecífico CR3. La citotoxicidad se midió mediante citometría de flujo después de 4 horas a 37 °C.

Los datos muestran que el anticuerpo biespecífico CR3 media la ADCC en las 3 líneas celulares (33-78 % de citotoxicidad). En contraste, anti-CD5chi y anti-HLARchi son citotóxicos solo para las líneas celulares CD5<sup>+</sup> o HLADR<sup>+</sup>, respectivamente.

Se concluyó que el resto Fc del anticuerpo biespecífico CR3 es funcional, lo que permite que el anticuerpo medie la ADCC de las dianas que expresen CD5, HLADR, o ambos antígenos.

#### Fagocitosis

Para confirmar la funcionalidad de la parte Fc de la molécula CR3 con respecto a la unión a FcγR presentes en macrófagos (FcγRI, FcγRII y FcγRIII), y la unión simultánea de sus parátomos a sus respectivas moléculas, se evaluó ADP *in vitro*. Los monocitos CD14<sup>+</sup> se purificaron a partir de células mononucleares de donantes sanos, mediante clasificación de células magnéticas con microperlas anti-CD14, según las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotec). Se cultivaron en portaobjetos de cámara de 8 pocillos (LabTek; Nunc) a 2x10<sup>5</sup>/pocillo durante 6-7 días en medio RPMI 1640 suplementado con un 20 % de suero fetal bovino y 20 ng/ml de rM-CSF humano (R&D Systems). A continuación, se realizó la fagocitosis de células diana CLL B (CD5<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup>) por estos macrófagos. Se añadieron un total de 2x10<sup>5</sup> dianas B-CLL en cada pocillo, en presencia o ausencia de 0,01 a 0,1 μg/ml de anticuerpo biespecífico CR3 o mAb anti-CD20 rituximab. Después de 2 h a 37 °C, los portaobjetos se enjuagaron suavemente en PBS, se fijaron, y se tiñeron con May-Gruenwald Giemsa. Se evaluó la fagocitosis contando en el microscopio al menos 200 células para cada condición experimental, mediante el uso del software de procesamiento y análisis de imágenes ImageJ 1.38, y se calculó el porcentaje de macrófagos que arrojaron al menos una célula diana tumoral con respecto a los macrófagos totales.

Los resultados se muestran en la Figura 7.

Leyenda de la Figura 7: El porcentaje de fagocitosis se muestra en el eje Y, y las concentraciones de anticuerpo utilizadas se muestran en el eje X, que varía de 0,01 a 1 µg/ml de anticuerpo biespecífico CR3 o anticuerpo mono-específico anti-CD20 rituximab (RTX). 0: no se añade ningún anticuerpo.

- 5 Los datos siguientes muestran que el anticuerpo biespecífico CR3 media aproximadamente el 40 % de fagocitosis por encima del fondo a 0,1-1 µg/ml, de manera similar al Rituximab. El anticuerpo de control negativo trastuzumab (anti-HER2) no media la fagocitosis (datos no mostrados).

10 Por lo tanto, se concluyó que el resto Fc de la molécula de anticuerpo biespecífica CR3 es funcional y puede mediar la fagocitosis de las células diana por los macrófagos, mediante la interacción de Fc con los FcγR en estas células.

#### Resto de unión al antígeno

#### Destrucción redireccionada por células asesinas inducidas por citocinas por anticuerpo biespecífico CR3

15 A continuación, se determinó si los parátomos del anticuerpo biespecífico CR3 pueden unirse a sus antígenos diana presentes en 2 tipos de células diferentes.

20 Las células asesinas inducidas por citocinas (CIK) son células T dobles positivos CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> que se activan, generados *in vitro* por estimulación de células mononucleares de la sangre periférica con interferón-gamma, anti-CD3 y expansión *in vitro* durante 3-4 semanas con interleucina-2 (SCHMIDT WOLFF y col. J. Exp. Med. 174:139-149; 1991). Las células CIK tienen una actividad citotóxica natural significativa contra las células tumorales, pero no contra las normales *in vitro*, de manera similar a las células NK. Sin embargo, las células CIK no expresan FcγR y, por lo tanto, no median la ADCC en presencia de anticuerpos mono-específicos IgG, tales como rituximab. Las células CIK expresan CD5. Por esta razón, las células CIK pueden redirigirse hacia células tumorales positivas para HLADR, pero no las negativas por anticuerpo biespecífico CR3 que reconoce CD5 en CIK y HLA-DR en la diana tumoral. A diferencia de la ADCC, esta destrucción redireccionada utiliza las dos especificidades Fab del anticuerpo, y no la parte Fc.

#### Método

30 Se cultivaron células mononucleares de la sangre periférica a 3x10<sup>6</sup>/mL en un medio X-VIVO 15 sin suero (BioWhittaker, Walkersville, MD, EE. UU.), con 1000 U/mL de IFN-γ (Gammaka; Boehringer Ingelheim, Viena, Austria) añadido en el día 0. 50 ng/mL de anti-CD3 (OKT-3, Janssen-Cilag S.p.a., Italia) añadido en el día 1, y 500 U/mL de rhlL-2 incluido en el medio desde el día 1 en adelante. La expansión se realizó durante 21-28 días, ajustando las células a 1x10<sup>6</sup>/ml en un medio que contenía rhlL-2 fresco, cada 3-4 días y. Al final de la expansión, las células CIK citotóxicas CD3<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> eran un 40-70 % de la población. Las células restantes son principalmente células CIK precursoras CD3<sup>+</sup>CD56.

40 Las líneas celulares diana tumorales humanas BJAB (CD5<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup>), JOK1.5.3 (CD5<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup>), Jurkat (CD5<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>-</sup>), y KCL22 (CD5<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>-</sup>) se mantuvieron en un medio RPMI-1640 (Lonza, Basilea, Suiza) suplementado con suero bovino fetal al 10 % (Euroclone, Wetherby, West Yorkshire, Reino Unido), 2 mM de L-glutamina (Euroclone) y 110 µM de gentamicina (PHT Pharma, Milano, Italia).

45 Para los ensayos de citotoxicidad redirigida, las líneas celulares diana se etiquetaron durante 30 minutos a 37 °C, con 3,5 µM de Calceína-AM (Fluka, Sigma-Aldrich Company, Ayrshire, Reino Unido). Después del lavado, las células diana etiquetadas se distribuyeron en placas de 96 pocillos, a 5x10<sup>3</sup>/pocillo. Se añadieron células CIK a una relación entre efector y diana, de 10:1, en presencia o ausencia de 1 µg/ml de anticuerpo biespecífico CR3. Después de 4 horas, las células se sedimentaron por centrifugación, se recogieron 100 µl de sobrenadante, y se determinó la liberación de calceína mediante el uso de un lector de microplacas de fluorescencia (GENios, TECAN, Austria GmbH, Salzburg, Austria) con excitación a 485 nm y emisión a 535 nm. El porcentaje (%) de lisis específica se calculó como: (liberación de calceína de prueba-liberación espontánea de calceína) × 100 / (liberación máxima de calceína - liberación espontánea de calceína). La lisis máxima se logró agregando Triton X-100 al 1 %.

55 Los resultados se muestran en la Figura 8.

60 Leyenda de la Figura 8: Las líneas celulares diana cargadas con calceína-AM, BJAB, JOK1.5.3, Jurkat y KCL22, se incubaron en presencia (barras abiertas) o ausencia (barras negras) de 1 µg/ml de anticuerpo biespecífico CR3, y en presencia de células CIK a una relación efector:diana de 10:1. Después de 4 horas, se recogieron los sobrenadantes, y se midió la calceína liberada. Los datos muestran la lisis porcentual medida (eje Y) como medias y desviaciones estándar, de 2-6 experimentos distintos con cada línea celular. CTRL: Control sin anticuerpo.

65 Los resultados muestran que *in vitro*, el porcentaje de destrucción (lisis) de dianas positivas de HLADR (BJAB, JOK15.3), pero no de dianas negativas de HLADR (Jurkat, KCL22), se incrementa en un 50-60 % mediante la adición de 1 µg/ml de anticuerpo CR3 en presencia de células CIK a una relación efector:diana de 10:1. Esto demuestra que el puente intercelular formado por el anticuerpo biespecífico CR3 mejora drásticamente la destrucción de las dianas

de HLADR<sup>+</sup> por células CIK. No se observa potenciación de la destrucción de dianas negativas de HLADR, lo que demuestra especificidad.

La especificidad de la potenciación por el anticuerpo biespecífico CR3 del efecto citotóxico de las células CIK con respecto a las células T normales, se demostró adicionalmente de la siguiente manera: Las células diana BJAB HLADR<sup>+</sup> se incubaron con diferentes cantidades de células mononucleares de la sangre periférica como células efectoras a relaciones efector:diana, que varían de 1:1 a 10:1, en presencia o ausencia de 1 µg/ml de CR3. La lisis se midió a las 4 horas.

Los resultados se muestran en la Figura 9.

Leyenda de la Figura 9: Los experimentos de citotoxicidad se realizaron con PBMC como efectores y BJAB como células diana, a diferentes relaciones efector:diana, en presencia (círculos negros) y ausencia (círculos abiertos) de anticuerpo biespecífico CR3. Eje X: Relación efector:diana; Porcentaje de lisis en el eje Y; CR3: anticuerpo biespecífico CR3; CTRL: control sin anticuerpo.

No se observa efecto del anticuerpo CR3 sobre la lisis de las dianas de HLADR<sup>+</sup> por T normal.

Estos resultados muestran que el anticuerpo biespecífico CR3 divalente puede utilizarse junto con células asesinas inducidas por citocinas (CIK) en el tratamiento de inmunoterapia adoptiva. En este caso, se utilizan las diferentes especificidades de los 2 pares Fab, un par (en este caso, anti-HLADR) que reconoce la célula diana, y el otro (anti-CD5) las células CIK efectoras. Estos resultados indican que podrían insertarse diferentes antígenos diana, tales como HER1, HER2, EpCAM, CD19, CD20 u otros, en lugar de HLADR. Los resultados también indican que otros antígenos expresados por células efectoras podrían utilizarse en lugar de CD5, tal como CD3 expresado por células T, FcγRIII o NKG2D presentes en células NK, o FcγRI-III en macrófagos en el marco de diferentes formas de terapia contra el cáncer.

#### Destrucción redireccionada por células asesinas inducidas por citocinas por anticuerpo biespecífico MUT 4

Se determinó si el anticuerpo biespecífico MUT 4 puede unirse a sus antígenos diana presentes en 2 tipos de células diferentes, y redirigir la destrucción de células asesinas inducidas por citocinas (CIK) CD5<sup>+</sup> hacia una diana de linfoma HLADR<sup>+</sup> (JOK1.5.3). CIK son células T dobles positivos CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> que se activan, generados *in vitro* por estimulación de células mononucleares de la sangre periférica con interferón-gamma, anti-CD3 y expansión *in vitro* durante 3-4 semanas con interleucina-2 (SCHMIDT WOLFF y col. J. Exp. Med. 174:139-149; 1991). Las células CIK tienen una actividad citotóxica natural significativa contra las células tumorales, pero no contra las células normales *in vitro*, de manera similar a las células NK. Sin embargo, las células CIK no expresan FcγR y, por lo tanto, no median la ADCC en presencia de anticuerpos monoespecíficos IgG, tales como rituximab. Las células CIK expresan CD5. Por esta razón, las células CIK pueden redirigirse hacia células tumorales positivas para HLADR, pero no las negativas por anticuerpo biespecífico MUT 4, que reconoce CD5 en CIK, y HLADR en el tumor diana. A diferencia de la ADCC, esta destrucción redireccionada utiliza las dos especificidades Fab del anticuerpo, y no la parte Fc.

#### Método

Se cultivaron células mononucleares de la sangre periférica a 3x10<sup>6</sup>/mL en un medio X-VIVO 15 sin suero (BioWhittaker, Walkersville, MD, EE. UU.), con 1000 U/mL de IFN-γ (Gammaka; Boehringer Ingelheim, Viena, Austria) añadido en el día 0. 50 ng/mL de anti-CD3 (OKT-3, Janssen-Cilag S.p.a., Italia) añadido en el día 1, y 500 U/mL de rhIL-2 incluido en el medio desde el día 1 en adelante. La expansión se realizó durante 21-28 días, ajustando las células a 1x10<sup>6</sup>/ml en un medio que contenía rhIL-2 fresco, cada 3-4 días y. Al final de la expansión, las células CIK citotóxicas CD3<sup>+</sup>/CD5<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup> eran aproximadamente un 50 % de la población. Las células restantes son principalmente células CIK precursoras CD3<sup>+</sup>/CD56.

La línea celular diana tumoral humana JOK1.5.3 (CD5<sup>+</sup>/HLADR<sup>+</sup>) se mantuvo en un medio RPMI-1640 (Lonza, Basilea, Suiza) suplementado con suero bovino fetal al 10 % (Euroclone, Wetherby, West Yorkshire, Reino Unido), 2 mM de L-glutamina (Euroclone) y 110 µM de gentamicina (PHT Pharma, Milano, Italia).

Para los ensayos de citotoxicidad redirigida, las líneas celulares diana se etiquetaron durante 30 minutos a 37 °C, con 3,5 µM de Calceína-AM (Fluka, Sigma-Aldrich Company, Ayrshire, Reino Unido). Después del lavado, las células diana etiquetadas se distribuyeron en placas de 96 pocillos, a 5x10<sup>3</sup>/pocillo. Se añadieron células CIK a una relación entre efector y diana, de 10:1, en presencia o ausencia de 1 o 5 µg/ml de anticuerpo biespecífico CMUT 4, anticuerpo CR3, o rituximab (RTX), como controles. Después de 4 horas, las células se sedimentaron por centrifugación, se recogieron 100 µl de sobrenadante, y se determinó la liberación de calceína mediante el uso de un lector de microplacas de fluorescencia (GENios, TECAN, Austria GmbH, Salzburg, Austria) con excitación a 485 nm y emisión a 535 nm. El porcentaje (%) de lisis específica se calculó como: (liberación de calceína de prueba - liberación espontánea de calceína) × 100 / (liberación máxima de calceína - liberación espontánea de calceína). La lisis máxima se logró agregando Triton X-100 al 1 %.

Los resultados se muestran en la Figura 10.

Leyenda de la Figura 10: Se incubaron células diana cargadas con calceína-AM JOK15.3, en presencia o ausencia de 1 o 5 µg/ml de anticuerpos biespecíficos MUT 4, CR3 o rituximab (RTX), y en presencia de células CIK a una relación efector:diana de 10:1. Después de 4 horas, se recogieron los sobrenadantes, y se midió la calceína liberada. Los datos muestran la lisis porcentual medida (eje Y) como lmedias y desviaciones estándar de 2 experimentos independientes. -: control sin anticuerpo.

Los resultados muestran que, *in vitro*, el porcentaje de destrucción (lisis) de JOK15.3 positivo HLADR, aumenta en un 60-70 % mediante la adición de 1-5 µg/ml de anticuerpo MUT 4, y en un 40-50 % mediante la adición de anticuerpo CR3, en presencia de células CIK a una relación efector:diana de 10:1. El Rituximab, en contraste, no tiene un efecto significativo. Esto demuestra que el puente intercelular formado por el anticuerpo biespecífico MUT 4 mejora drásticamente la destrucción de la dianas de HLADR<sup>+</sup> por células CIK, a un grado similar o superior a la obtenida con CR3.

# REIVINDICACIONES

1. Un fragmento de unión al antígeno multiespecífico, que comprende dos o más regiones de unión al antígeno, que reconocen cada una un epítipo diferente, que comprende al menos un fragmento Fab mutado que consiste en:

- los dominios VH y VL de un anticuerpo que reconocen un epítipo de interés;
- un dominio CH1 que se deriva del dominio CH1 de una inmunoglobulina IgG1 humana, mediante la sustitución del residuo de leucina en la posición 143 de dicho dominio CH1 con un residuo de glutamina, y la sustitución del residuo de serina en la posición 188 de dicho dominio CH1 con un residuo de valina; y
- un dominio CL del tipo kappa que se deriva del dominio CL de una inmunoglobulina humana, mediante la sustitución del residuo de valina en la posición 133 de dicho dominio CL con un residuo de treonina, y la sustitución del residuo de serina en la posición 176 de dicho dominio CL con un residuo de valina,

en donde los números de posición de secuencia se refieren a la numeración de Kabat.

2. El fragmento multiespecífico de unión al antígeno de la reivindicación 1, que comprende al menos los dos siguientes fragmentos Fab diferentes:

a)un fragmento Fab mutado que consiste en:

- \*los dominios VH y VL de un anticuerpo que reconocen un epítipo de interés;
- \*un dominio CH1 que se deriva del dominio CH1 de una inmunoglobulina IgG1 humana mediante la sustitución del residuo de leucina en la posición 143 de dicho dominio CH1 con un residuo de glutamina, y la sustitución del residuo de serina en la posición 188 de dicho dominio CH1 con un residuo de valina; y
- \*un dominio CL del tipo kappa que se deriva del dominio CL de una inmunoglobulina humana mediante la sustitución del residuo de valina en la posición 133 de dicho dominio CL con un residuo de treonina, y la sustitución del residuo de serina en la posición 176 de dicho dominio CL con un residuo de valina;

y

b)al menos otro fragmento Fab que se selecciona del grupo que consiste en:

b1)un fragmento Fab de tipo salvaje que consiste en dominios CH1 y CL de tipo salvaje de una inmunoglobulina humana, y los dominios VH y VL de un anticuerpo que reconoce un epítipo de interés;

b2)un fragmento Fab mutado (a) que consiste en:

- \*los dominios VH y VL de un anticuerpo que reconocen un epítipo de interés;
- \*un dominio CH1 que se deriva del dominio CH1 de una inmunoglobulina IgG1 humana mediante la sustitución del residuo de treonina en la posición 192 de dicho dominio CH1 con un residuo de ácido glutámico; y
- \*un dominio CL del tipo kappa que se deriva del dominio CL de una inmunoglobulina humana mediante la sustitución del residuo de asparagina en la posición 137 de dicho dominio CL con un residuo de lisina, y la sustitución del residuo de serina en la posición 114 de dicho dominio CL con un residuo de alanina;

en donde los números de posición de secuencia se refieren a la numeración de Kabat, y en donde cada fragmento Fab reconoce un epítipo diferente de interés, y dichos fragmentos Fab se disponen en tándem en cualquier orden, el extremo C-terminal del dominio CH1 de un primer fragmento Fab que se une al extremo N-terminal del dominio VH del siguiente fragmento Fab, a través de un enlazador polipeptídico.

3. El fragmento de unión al antígeno multiespecífico de la reivindicación 2, en donde el enlazador polipeptídico tiene una longitud de al menos 20 aminoácidos.

4. El fragmento de unión al antígeno multiespecífico de cualquiera de las reivindicaciones 2 o 3, en donde el enlazador polipeptídico comprende toda o parte de la secuencia de la región bisagra de una o más inmunoglobulinas seleccionadas entre IgA, IgG, e IgD.

5. El fragmento multiespecífico de unión al antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en donde el enlazador polipeptídico tiene la siguiente secuencia:

EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGPPSTPPTPSPSGG

- 5 6. Un anticuerpo multiespecífico que tiene dos brazos idénticos de unión al antígeno, consistiendo cada uno en un fragmento multiespecífico de unión al antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
7. El anticuerpo multiespecífico de la reivindicación 6, que comprende:
  - 10 -dos brazos de unión al antígeno idénticos, consistiendo cada uno en un fragmento multiespecífico de unión al antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5,
  - los dominios CH2 y CH3 dimerizados de una inmunoglobulina;
  - la región bisagra de una IgA, IgG o IgD, que une los extremos C-terminales de los dominios CH1 de los brazos de unión al antígeno, a los extremos N-terminales de los dominios CH2.
- 15 8. Una célula huésped transformada con un polinucleótido que codifica una cadena pesada de un fragmento de unión al antígeno multiespecífico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o de un anticuerpo multiespecífico de cualquiera de las reivindicaciones 6 o 7 y al menos dos polinucleótidos que codifican dos cadenas ligeras diferentes; una primera cadena ligera que se empareja específicamente con una primera región VH/CH1 de dicha cadena pesada; una segunda cadena ligera que se empareja específicamente con una segunda región VH/CH1 de dicha cadena pesada, y al menos una de dichas cadenas ligeras es una  
20 cadena ligera de un fragmento Fab mutado, como se define en la reivindicación 1.
9. La célula huésped de la reivindicación 8, que se transforma adicionalmente con un tercer polinucleótido que codifica una tercera cadena ligera que es diferente de la primera y segunda cadenas ligeras, y que se empareja específicamente con una tercera región VH/CH1 de dicha cadena pesada.  
25
10. Un método para preparar un fragmento multiespecífico de unión al antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o un anticuerpo multiespecífico de cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6, en donde dicho procedimiento comprende cultivar una célula hospedadora de las reivindicaciones 8 o 9, y recuperar dicho fragmento o anticuerpo de unión al antígeno de dicho cultivo.  
30
11. Un fragmento multiespecífico de unión al antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o un anticuerpo multiespecífico de cualquiera de las reivindicaciones 6 o 7, para su uso como un medicamento.

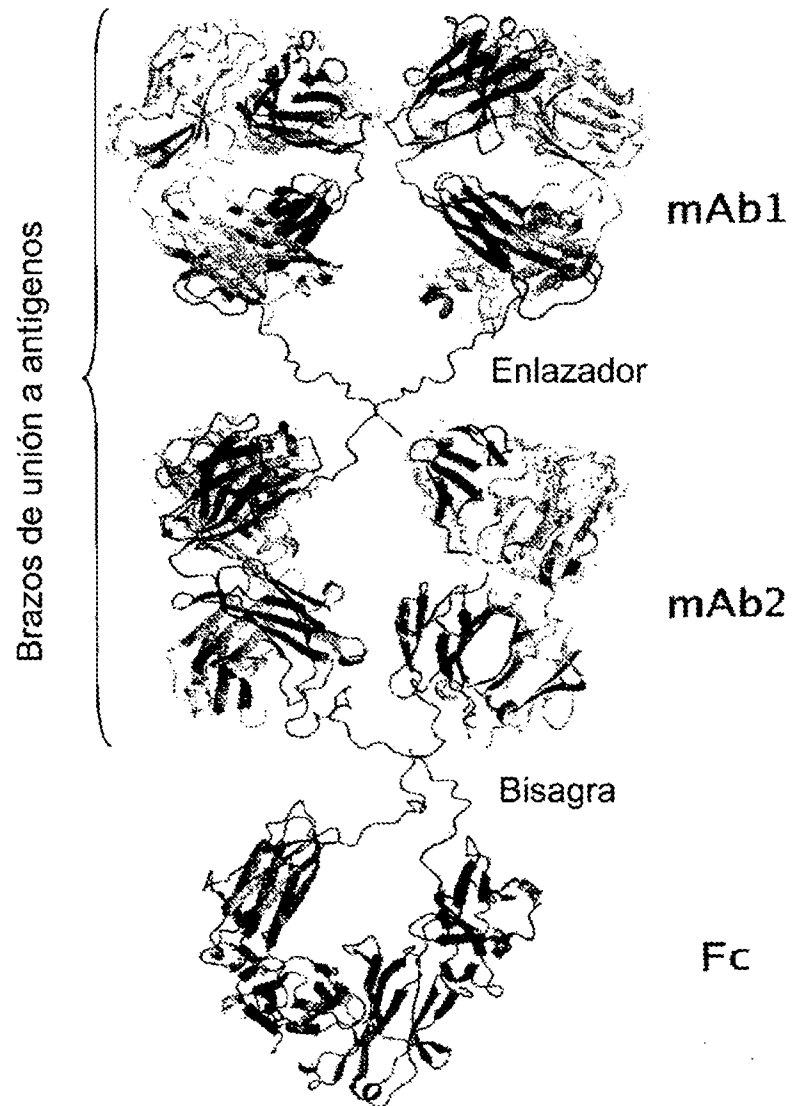
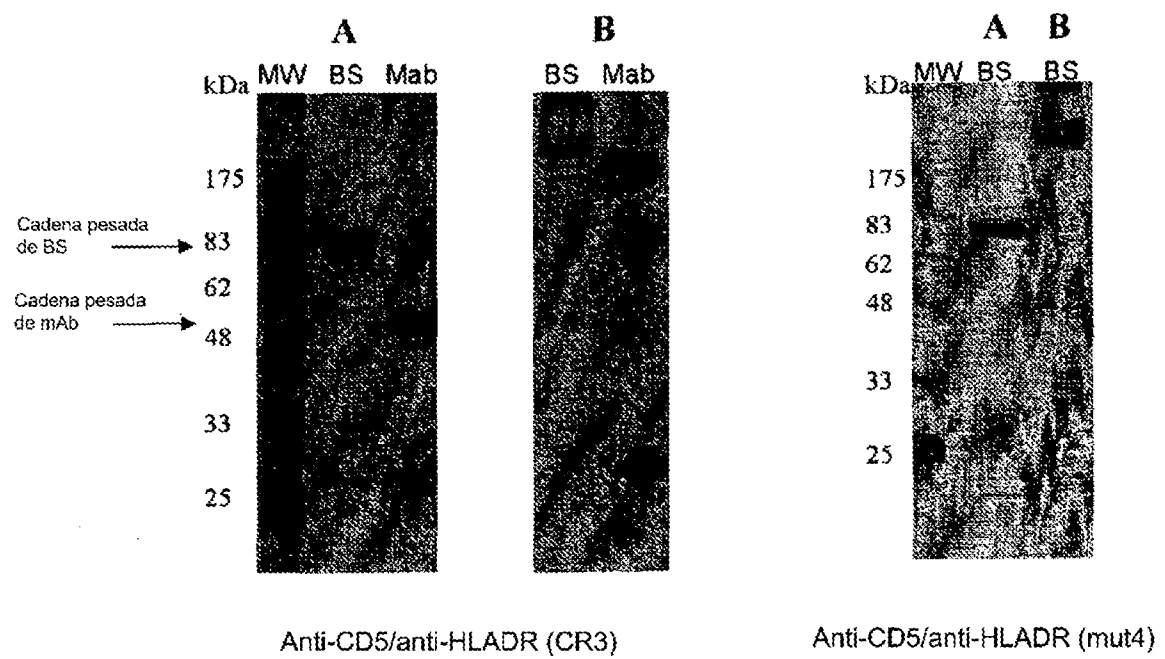
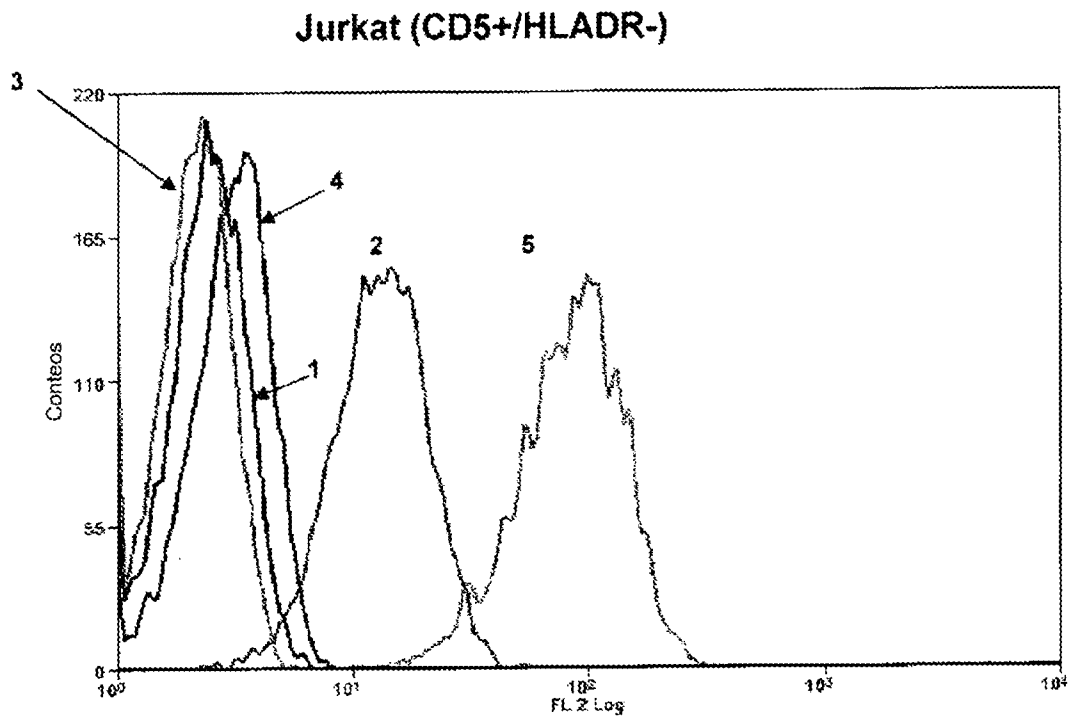


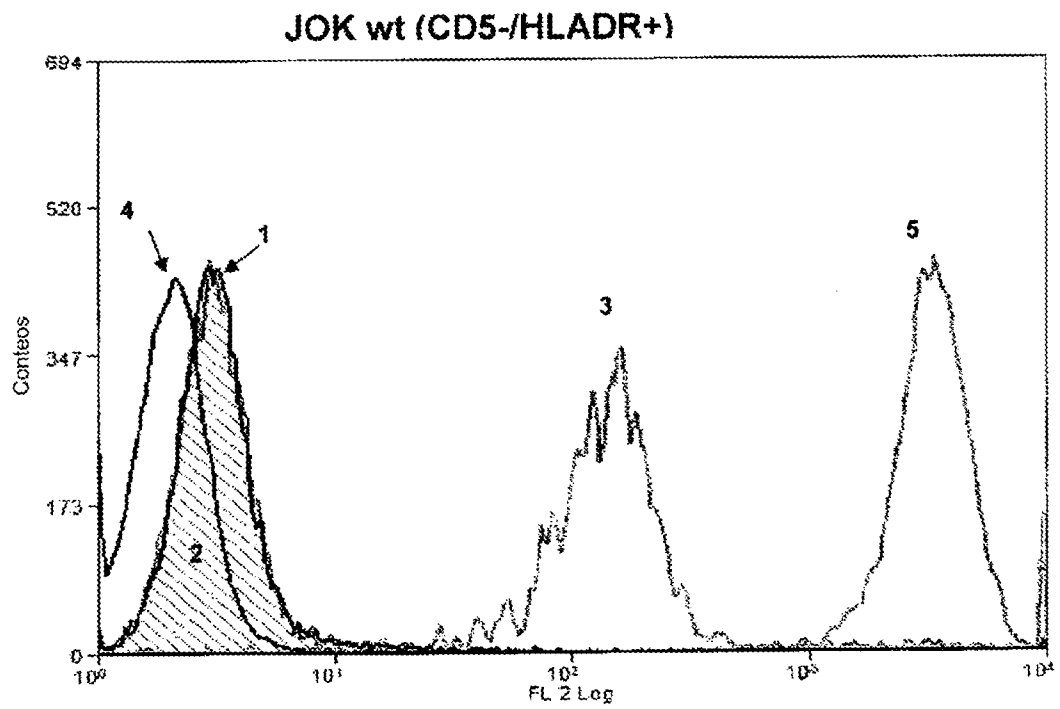
Figura 1



**Figura 2**



**Figura 3**



**Figura 4**

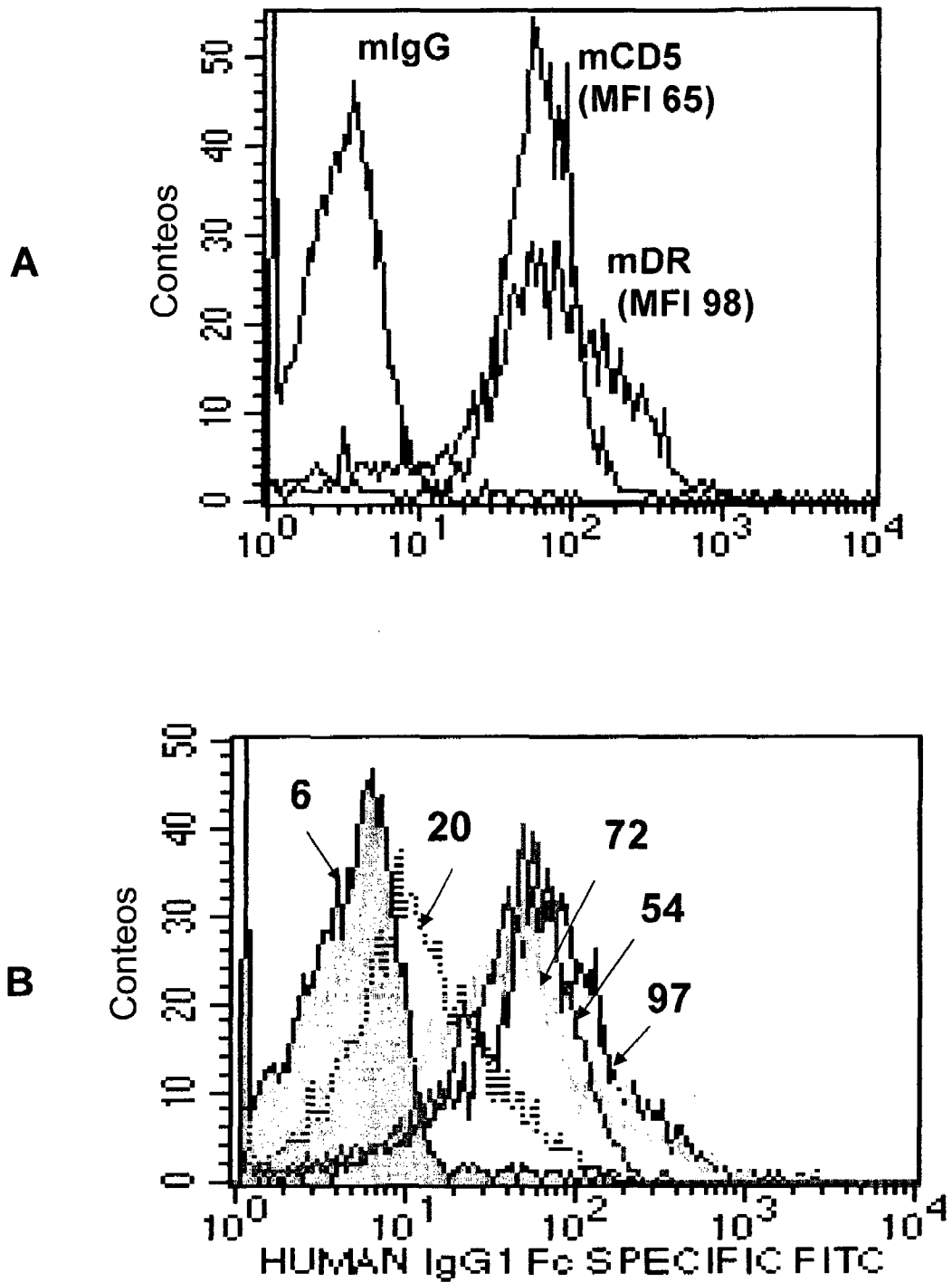
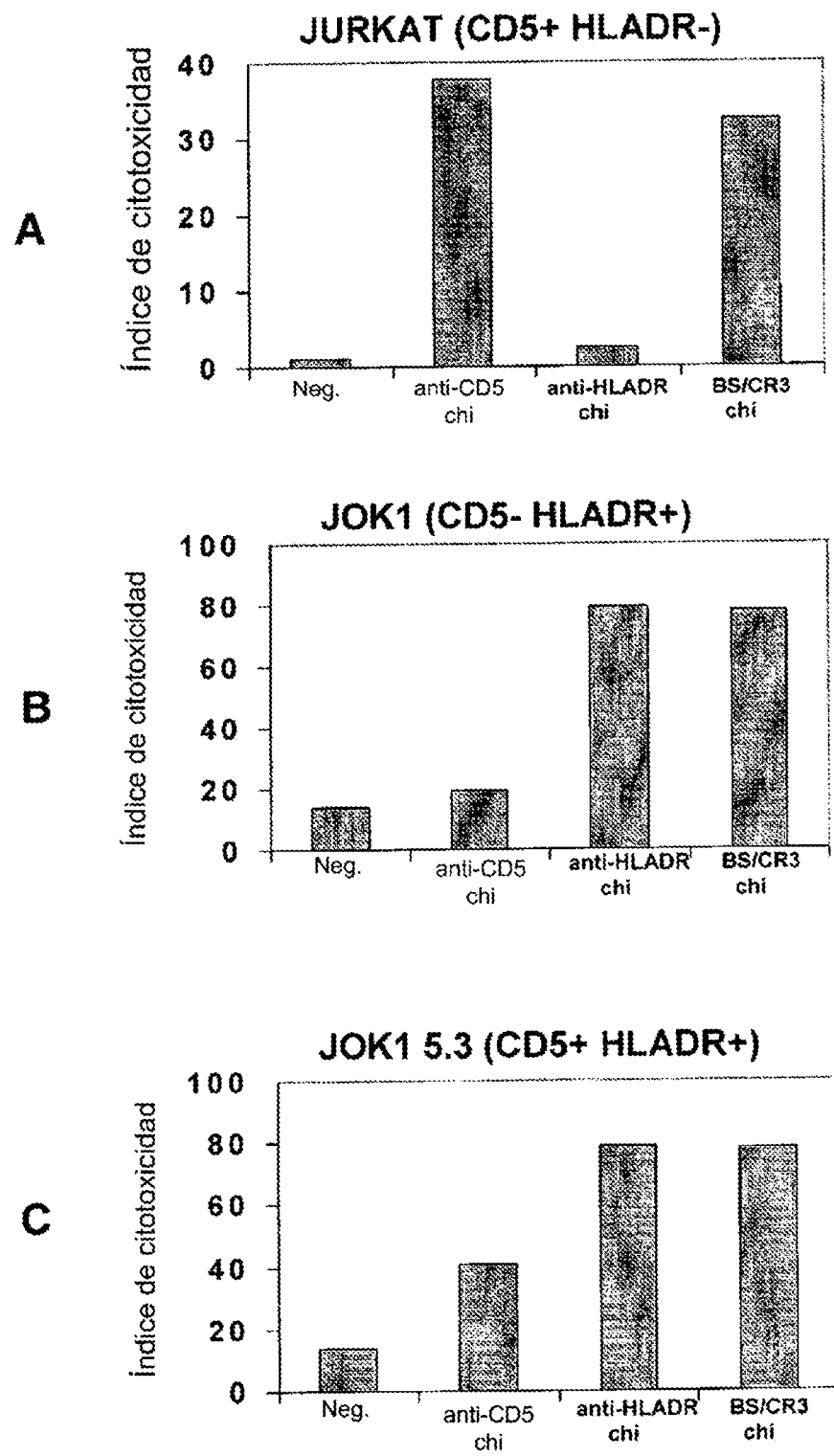
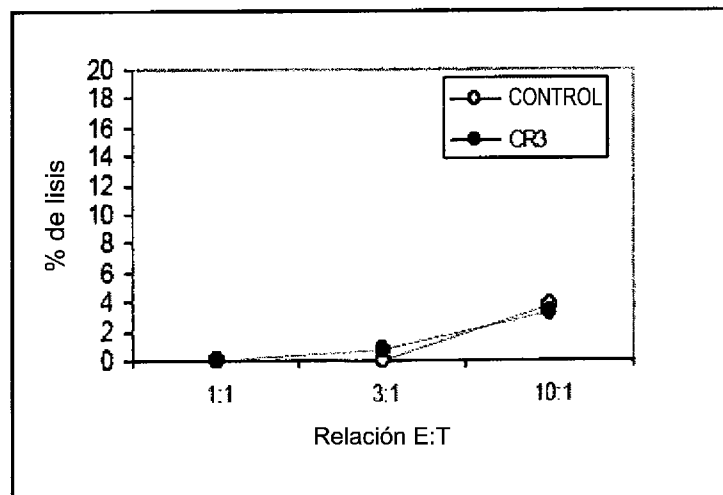
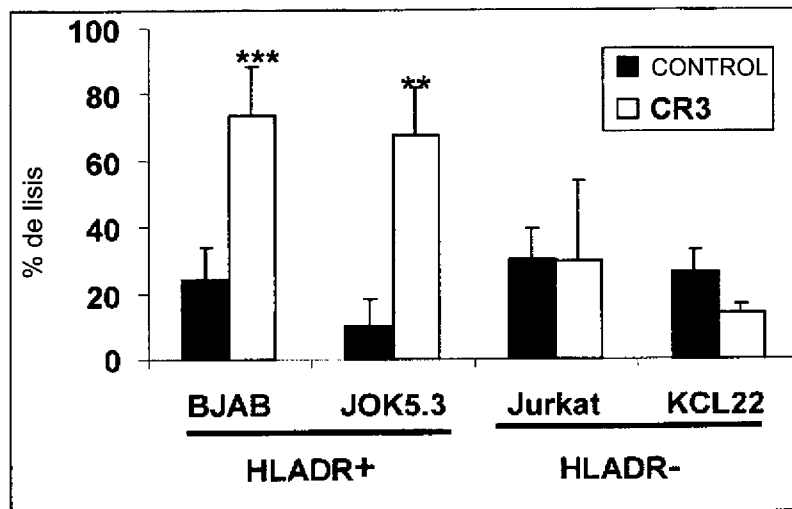
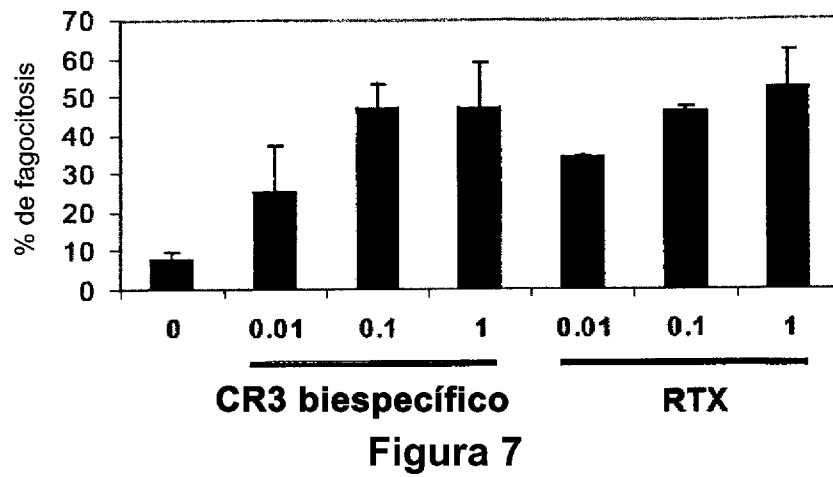


Figura 5



**Figura 6**



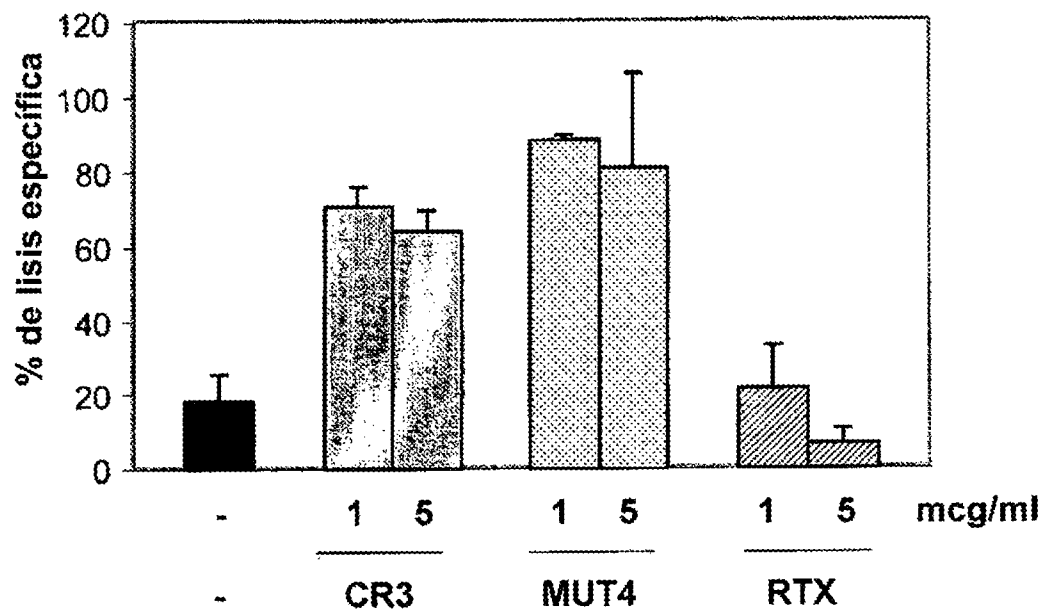


Figura 10