

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 981 736**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.12.2015** **PCT/EP2015/080795**
87 Fecha y número de publicación internacional: **23.06.2016** **WO16097408**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2015** **E 15817832 (7)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2024** **EP 3233917**

54 Título: **Proteína de fusión que comprende tres dominios de unión a 5T4 y CD3**

30 Prioridad:

19.12.2014 EP 14199493

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.10.2024

73 Titular/es:

CHIOME BIOSCIENCE, INC (100.0%)
3-12-1, Honmachi, Shibuya-ku
Tokyo 151-0071, JP

72 Inventor/es:

MERTENS, NICO;
CUNNAH, PHILIP JEFFREY y
DA FONSECA RICARDO, ANA RITA

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

Observaciones:

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

ES 2 981 736 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

Proteína de fusión que comprende tres dominios de unión a 5T4 y CD3

5 **Campo**

[0001] Los aspectos y formas de realización descritos en el presente documento se refieren al campo de las proteínas de fusión heterodiméricas que comprenden tres dominios de unión, en donde un primer y/o un segundo dominio de unión son capaces de unirse al antígeno 5T4 extracelular y el/los dominio(s) de unión restante(s) es/son capaz/capaces de unirse al complejo receptor CD3 en linfocitos T.

Estado de la técnica

[0002] El antígeno de superficie celular definido por el anticuerpo monoclonal 5T4 es una glicoproteína de 72 kD que se expresa por todos los tipos de trofoblastos tan pronto como a las 9 semanas de desarrollo. En tejidos adultos, la expresión de 5T4 está limitada a unos pocos tipos de células epiteliales especializadas, pero no se detecta en el hígado, los pulmones, los bronquios, el corazón, los testículos, los ovarios, el cerebro o los músculos de los adultos. El antígeno se expresa selectivamente por diversas líneas celulares tumorales, incluyendo las de origen en el desarrollo. Las características moleculares, la distribución y la expresión de tejidos normales relativamente restringidas por ciertos tipos de células tumorales hacen que este antígeno sea valioso para su uso como marcador de diagnóstico de malignidad (Hole & Stern, Br J Cancer. (1988) 57(3), 239-46). Hay pruebas claras de la implicación de 5T4 en el cáncer y la progresión del cáncer. Se han observado niveles elevados de expresión de 5T4 en la superficie de células cancerosas en cáncer de ovario (Wrigley E, McLean AT, Rennison J, et al. 5T4 oncofetal antigen expression in ovarian carcinoma. Int J Gynecol Cancer. 1995; 5: 269-274), cáncer de colon (Starzynska T, Marsh PJ, Schofield PF, Roberts SA, Myers KA, Stern PL. Prognostic significance of 5T4 oncofetal antigen expression in colorectal carcinoma. Br J Cancer 1994; 69:899-902), cáncer de cuello uterino (Jones H, Roberts G, Hole N, McDicken IW, Stern P. Investigation of expression of 5T4 antigen in cervical cancer. Br J Cancer. 1990;6:69-100), cáncer gástrico (Starzynska T, Rahi V, Stern PL. The expression of 5T4 antigen in colorectal and gastric carcinoma. Br J Cancer. 1992;66:867-869 y anteriores) y cáncer de pulmón (Forsberg G, Ohlsson L, Brodin T, et al. Therapy of human non-small-cell lung carcinoma using antibody targeting of modified superantigen. Br J Cancer. 2001; 85:129-136.). También se ha demostrado una asociación con la progresión de la enfermedad, a saber, metástasis (Mulder WM, Stern PL, Stukart MJ, et al. Low intercellular adhesion molecule 1 and high 5T4 expression on tumor cells correlate with reduced disease-free survival in colorectal carcinoma patients. Clin Cancer. 1997; 3: 1923-1930 y Starzynska T, Wiechowaska-Kozłowska A, Marlicz K, et al. 5T4 oncofetal antigen in gastric carcinoma and its clinical significance. Eur J Gastroenterol Hepatol. 1998; 10: 479-484. y Naganuma H, Kono K, Mori Y, et al. Oncofetal antigen 5T4 expression as a prognostic factor in patients with gastric cancer. 2002; 22:1033-1038). Puesto que la expresión de 5T4 en tejidos normales en contraste con lesiones cancerosas está restringida (AN A, Langdon J, Stern PL, Partidge M. The pattern of expression of 5T4 oncofetal antigen on normal, dysplastic and malignant oral mucosa. Oncol oral. 2001; 37:57-64), se ha sugerido que 5T4 es un antígeno diana adecuado para la terapia dirigida contra el cáncer (Woods AM, Wang WW, Shaw DM, et al. Characterization of the murine 5T4 oncofetal antigen: a target for immunotherapy in cancer. Biochem J. 2002; 366:353-365 y Hole N, Stern PL. Isolation and characterization of 5T4, A tumor-associated antigen. Int J Cancer. 1990;45:179-184).

[0003] Las terapias contra el cáncer basadas en anticuerpos requieren un antígeno diana firmemente unido a la superficie de las células cancerosas para tener actividad. Mediante la unión a la diana de superficie, el anticuerpo puede transmitir directa o indirectamente una señal mortal a la célula cancerosa. Como se requiere para una situación de tratamiento ideal, el antígeno diana 5T4 está presente en abundancia y es accesible en células cancerosas específicas y está ausente, protegido o es mucho menos abundante en células normales. Sin embargo, aunque el antígeno 5T4 se identificó como una diana oncológica hace más de 20 años, no se ha aprobado ninguna inmunoterapia contra 5T4 para tratar el cáncer. Por consiguiente, existe una clara necesidad de un agente terapéutico eficaz dirigido a este antígeno.

[0004] En el campo, es conocida la terapia basada en anticuerpos proporcionados en forma de una molécula biespecífica que se une con un dominio a células citotóxicas, es decir, linfocitos T citotóxicos (Tribodies: Fab-scFv fusion proteins as a platform to create multi-functional pharmaceuticals. En: Kontermann, R. (eds) Bispecific Antibodies. Springer. 2011.) y con un segundo dominio de unión a 5T4 en la superficie de células tumorales. Más específicamente, en el documento WO2013041687 se describe una molécula biespecífica que comprende un primer y un segundo dominio de unión, (a) donde el primer dominio de unión es capaz de unirse al agrupamiento de epítomos 4 de 5T4; y (b) donde el segundo dominio de unión es capaz de unirse al complejo receptor CD3 de los linfocitos T.

[0005] Se conocen proteínas de fusión de dos proteínas o péptidos idénticos o diferentes a cada una de las cadenas de un brazo de unión a antígenos de un anticuerpo, denominado Fab, o derivados de este. En su significado más tradicional, un Fab es un heterodímero entre una cadena Fd que comprende un dominio de anticuerpo VH y CH1, y una cadena L que comprende un dominio de anticuerpo VL y CL. Los dominios variables

VH y VL pueden derivarse de diferentes especies o subclases de anticuerpos. Además, los dominios constantes CH1 y CL pueden derivarse de diferentes especies y subclases. La proteína de fusión aprovecha la interacción del heterodímero CH1:CL para heterodimerizar la proteína de fusión Fab. En el documento WO9937791 (derivados de anticuerpos multiuso) se divulga el uso de un Fab en una conformación tradicional. El heterodímero VH-CH1:VL-CL se extiende en el extremo C y/o en el extremo N terminal con una segunda y tercera función, o incluso con una cuarta y quinta función. Las funciones extendidas están codificadas en péptidos, proteínas o partes de proteínas o derivados. En el documento WO9937791 se divulga el uso de fusiones con un dominio variable de cadena pesada VH seguido de un dominio constante de cadena pesada CH1-1 para formar un heterodímero con fusiones con el dominio de anticuerpo ligero variable VL seguido de un dominio de anticuerpo ligero constante CL. El heterodímero VH-CH1:VL-CL (o escrito como VH-CH1:VL-CL) puede extenderse con hasta cuatro fusiones peptídicas o proteicas.

Resumen de la invención

[0006] La presente invención se expone en las reivindicaciones adjuntas y se refiere a un heterodímero de proteínas de fusión (también denominado: "proteína de fusión" o "proteína de fusión Tribody" o "proteína de fusión Tb-5T4") que comprende dos cadenas diferentes:

- primera cadena: VH(5T4)-CH1-L1-VH(CD3)-L2-VL(CD3) en combinación con
- segunda cadena: VL(5T4)-CL-L1-VH(5T4)-L2-VL(5T4),

donde VH, VL son dominios de unión variables de anticuerpo, CH1 y CL son dominios constantes de anticuerpo y L1 y L2 son porciones conectoras, y donde el heterodímero de proteínas de fusión contiene una interacción heterodimérica entre el CH1 de la primera cadena y el dominio constante de anticuerpo CL de la segunda cadena, y el heterodímero de proteínas de fusión es tal que (a) dos dominios de unión VH/VL combinados formados dentro de dicho heterodímero de proteínas de fusión son capaces de unirse al antígeno 5T4 extracelular; y (b) el dominio de unión VH/VL combinado restante formado dentro de dicho heterodímero de proteínas de fusión es capaz de unirse al complejo receptor CD3 en linfocitos T, donde la primera cadena comprende o tiene la SEQ ID N.º 51, y donde la segunda cadena comprende o tiene la SEQ ID N.º 52. Además, la invención se refiere a una secuencia de ácido nucleico que codifica dicho heterodímero de proteínas de fusión, un vector que comprende dicha secuencia de ácido nucleico y una célula hospedadora transformada o transfectada con dicho vector. Además, la invención se refiere a un procedimiento para la producción de dicho heterodímero de proteínas de fusión de la invención, y a un uso médico de dicho heterodímero de proteínas de fusión

Descripción detallada

[0007] La descripción que sigue, en algunos aspectos, puede ir más allá del alcance de las reivindicaciones. Los elementos de la divulgación que no están dentro del alcance de las reivindicaciones se proporcionan con fines informativos. Cualquier referencia en esta descripción a métodos para tratar una enfermedad debe interpretarse como referencias a compuestos, agentes o composiciones (como se divulga en el presente documento) para su uso en esos métodos.

[0008] A lo largo de esta divulgación, se hace referencia a diversas publicaciones, patentes y memorias descriptivas de patentes publicadas mediante una cita identificativa.

[0009] Debe observarse que, tal como se usa en el presente documento, las formas singulares "un", "una" y "el/la", incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, la referencia a "un reactivo" incluye uno o más de tales reactivos diferentes y la referencia a "el método" incluye la referencia a pasos y métodos equivalentes conocidos por los expertos en la técnica que podrían modificarse o sustituirse por los métodos descritos en el presente documento.

[0010] A menos que se indique lo contrario, debe entenderse que el término "al menos" que precede a una serie de elementos se refiere a cada elemento de la serie. Los expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de determinar simplemente mediante experimentos rutinarios, muchos equivalentes de las formas de realización específicas de la invención descritas en el presente documento. Se pretende que dichos equivalentes dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas estén abarcados por la presente invención. El término "y/o" siempre que se use en el presente documento incluye el significado de "y", "o" y "todos o cualquier otra combinación de los elementos conectados por dicho término".

[0011] El término "alrededor de" o "aproximadamente", como se usa en el presente documento, significa que no se aleja más de un 20 %, preferiblemente que no se aleja más de un 10 % y más preferiblemente que no se aleja más de un 5 % de un valor o intervalo dado.

[0012] A lo largo de esta memoria descriptiva y las reivindicaciones que siguen, se entenderá que, a menos que el contexto requiera lo contrario, la palabra "comprender", y variaciones como "comprende" y "que comprende"

implican la inclusión de un número entero o paso o grupo de números enteros o pasos indicados, pero no la exclusión de cualquier otro número entero o paso o grupo de números enteros o pasos. Cuando se usa en el presente documento, el término "que comprende" puede sustituirse con el término "que contiene" o "que incluye" o, a veces, cuando se usa en el presente documento, con el término "que tiene".

[0013] Cuando se usa en el presente documento, "que consiste en" excluye cualquier elemento, paso o ingrediente no especificado en el elemento de la reivindicación. Cuando se usa en el presente documento, "que consiste esencialmente en" no excluye materiales o pasos que no afecten materialmente a las características básicas y novedosas de la reivindicación.

[0014] En cada caso en el presente documento, cualquiera de los términos "que comprende", "que consiste esencialmente en" y "que consiste en" puede reemplazarse con cualquiera de los otros dos términos.

[0015] El término "dominio de unión" caracteriza, en relación con la presente invención, un dominio de un polipéptido que se une/interactúa específicamente con un epítipo diana determinado (capaz de unirse a/interactuar con un epítipo diana determinado). Un "epítipo" es antigénico y, por lo tanto, el término epítipo a veces también se denomina en el presente documento "estructura antigénica" o "determinante antigénico". Por tanto, el dominio de unión es un "sitio de interacción con el antígeno". El término "sitio de interacción con el antígeno" define, según la presente invención, un motivo de un polipéptido, que es capaz de interactuar específicamente con un antígeno específico o un grupo específico de antígenos, por ejemplo, el antígeno idéntico en diferentes especies. También se entiende que dicha unión/interacción define un "reconocimiento específico". En un ejemplo, dicho polipéptido que se une/interactúa específicamente con un epítipo diana determinado es un anticuerpo y dicho dominio es una región o dominio VH y/o VL de un anticuerpo.

[0016] El término "epítipo" se refiere a un sitio en un antígeno al que se une específicamente un dominio de unión, tal como un anticuerpo o inmunoglobulina o derivado de un anticuerpo de inmunoglobulina. Los epítipos pueden formarse tanto a partir de aminoácidos contiguos como de aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por plegamiento terciario de una proteína. Un "epítipo lineal" es un epítipo en el que una secuencia primaria de aminoácidos comprende el epítipo reconocido. Un epítipo lineal incluye típicamente al menos 3, y más habitualmente, al menos 5, por ejemplo, de aproximadamente 8 a aproximadamente 10 aminoácidos en una secuencia única.

[0017] Un "epítipo conformacional", en contraste con un epítipo lineal, es un epítipo en el que la secuencia primaria de los aminoácidos que comprende el epítipo no es el único componente que define el epítipo reconocido (por ejemplo, un epítipo en el que la secuencia primaria de aminoácidos no es reconocida necesariamente por el anticuerpo que define el epítipo). Típicamente, un epítipo conformacional comprende un número aumentado de aminoácidos con respecto a un epítipo lineal. Con respecto al reconocimiento de epítipos conformacionales, el dominio de unión reconoce una estructura en 3 dimensiones del antígeno, preferiblemente un péptido o proteína o fragmento del mismo (en el contexto de la presente invención, el antígeno es, para uno de los dominios de unión, la proteína 5T4). Por ejemplo, cuando una molécula de proteína se pliega para formar una estructura tridimensional, ciertos aminoácidos y/o la estructura del polipéptido que forma el epítipo conformacional se yuxtaponen, permitiendo que el anticuerpo reconozca el epítipo. Los métodos para determinar la conformación de epítipos incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, cristalografía de rayos X y espectroscopía de resonancia magnética nuclear bidimensional y marcaje de espín dirigido al sitio y espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica.

[0018] Los términos "que se une/interacciona específicamente", "que reconoce específicamente", "dirigido a" y "que reacciona con" significan, de acuerdo con esta invención, que un dominio de unión es capaz de interactuar específicamente con y/o unirse a al menos dos, preferiblemente al menos tres, más preferiblemente al menos cuatro aminoácidos de un epítipo. Tal unión puede ejemplificarse por la especificidad de un "principio de llave-cerradura". Como se usa en el presente documento, los términos "que interactúa específicamente", "que se une específicamente" o "se une específicamente" significan que un dominio de unión posee afinidad apreciable por una proteína o antígeno particular y, generalmente, no muestra reactividad cruzada significativa con otras proteínas o antígenos. La unión "apreciable" o preferida incluye la unión con una afinidad de 10^{-6} M (KD) o superior. Preferiblemente, la unión se considera específica cuando la afinidad de unión es de aproximadamente 10^{-11} a 10^{-8} M, preferiblemente de aproximadamente 10^{-11} a 10^{-9} . Si es necesario, la unión no específica puede reducirse sin afectar sustancialmente a la unión específica variando las condiciones de unión. Puede analizarse de manera sencilla si los dominios de unión reaccionan específicamente o se unen con una diana, entre otros métodos, comparando la reacción de uno de dichos dominios de unión con una proteína o antígeno diana con la reacción de dichos dominios de unión con otras proteínas o antígenos.

[0019] Se cree que la unión específica se efectúa mediante motivos específicos en la secuencia de aminoácidos del dominio de unión y el antígeno. De este modo, la unión se consigue como resultado de su estructura primaria, secundaria o terciaria, así como como resultado de modificaciones secundarias de dichas estructuras. La interacción específica del sitio de interacción con el antígeno con su antígeno específico puede dar como resultado también una unión sencilla de dicho sitio al antígeno. Además, la interacción específica del

sitio de interacción con el antígeno con su antígeno específico puede dar como resultado alternativamente el inicio de una señal, por ejemplo, debido a la inducción de un cambio de la conformación del antígeno, una oligomerización del antígeno, etc. En un ejemplo, un dominio de unión es un anticuerpo.

5 [0020] El término "no se une esencialmente" significa que un dominio de unión de la proteína de fusión de la presente invención no se une a otra proteína, es decir, muestra una reactividad cruzada de menos del 30 %, preferiblemente del 20 %, más preferiblemente del 10 %, particularmente preferiblemente de menos del 9, 8, 7, 6 o 5 % con otra proteína.

10 [0021] Los términos "especificidad entre especies", "reconocimiento entre especies" y "especificidad interespecie", como se usan en el presente documento, indican la capacidad de un dominio de unión para unirse a la misma molécula diana en seres humanos y especies no humanas, preferiblemente en especies de primates. Por lo tanto, "especificidad entre especies" o "especificidad interespecie" describe la reactividad interespecie con la misma molécula X (por ejemplo, 5T4 o CD3) expresada en diferentes especies, pero no con una molécula distinta de X (por ejemplo, 5T4 o CD3).

15 [0022] Las proteínas (incluyendo fragmentos de estas, preferiblemente fragmentos biológicamente activos, y péptidos, que tienen habitualmente menos de 30 aminoácidos) comprenden uno o más aminoácidos acoplados entre sí a través de un enlace peptídico covalente (dando como resultado una cadena de aminoácidos). El término "polipéptido" como se usa en el presente documento describe un grupo de moléculas, que consisten en o comprenden más de 30 aminoácidos. Los polipéptidos pueden formar además multímeros tales como dímeros, trímeros y oligómeros superiores, es decir, que consisten en o comprenden más de una molécula polipeptídica. Las moléculas polipeptídicas que forman dichos dímeros, trímeros, etc. pueden ser idénticas o no idénticas. Las estructuras de orden superior correspondientes de tales multímeros se denominan, en consecuencia, homo- o heterodímeros, homo- o heterotrímeros, etc. Un ejemplo de un heteromultímero es una molécula de anticuerpo, que, en su forma natural, consiste en dos o comprende cadenas polipeptídicas ligeras idénticas y dos cadenas polipeptídicas pesadas idénticas. Los términos "polipéptido" y "proteína" también se refieren a polipéptidos/proteínas modificados de manera natural en los que la modificación se efectúa, por ejemplo, mediante modificaciones postraduccionales tales como glicosilación, acetilación, fosforilación y similares. Tales modificaciones son ampliamente conocidas en la técnica.

20 [0023] Como se ha indicado anteriormente en el presente documento, en un aspecto, el primer y/o segundo dominio de unión de la proteína de fusión es capaz de unirse a 5T4 humana, de *Callithrix jacchus*, de *Saguinus oedipus* o de *Saimiri sciureus* y/o el/los dominio(s) de unión restante(s) es/son capaz/capaces de unirse a CD3 épsilon humana, de *Callithrix jacchus*, de *Saguinus Oedipus* o de *Saimiri sciureus*. Según esta forma de realización, los tres dominios de unión de la proteína de fusión de la invención son específicos interespecie para miembros del orden de mamíferos primates. En una forma de realización, el primer o el segundo o el tercer dominio de unión se deriva de un anticuerpo. En otra forma de realización, todos los dominios de unión se derivan de un anticuerpo. La definición del término "anticuerpo" incluye formas de realización tales como anticuerpos monoclonales, quiméricos, monocatenarios, humanizados y humanos, así como fragmentos de anticuerpos, como, entre otros, fragmentos Fab. Los fragmentos de anticuerpos o derivados comprenden además fragmentos F(ab')₂, Fv, scFv o anticuerpos de dominio único tales como anticuerpos de dominio o nanocuerpos, anticuerpos de dominio variable único o dominio variable único de inmunoglobulina que comprende simplemente un dominio variable, que podría ser VHH, VH o VL, que se unen específicamente a un antígeno o epítipo independientemente de otras regiones o dominios V; véase, por ejemplo, Harlow y Lane (1988) y (1999), loc. cit; Kontermann y Dubel, *Antibody Engineering*, Springer, 2ª ed. 2010 y Little, *Recombinant Antibodies for Immunotherapy*, Cambridge University Press 2009. Dicho dominio variable único de inmunoglobulina abarca no solo un polipéptido de dominio variable único de anticuerpo aislado, sino también polipéptidos más grandes que comprenden uno o más monómeros de una secuencia polipeptídica de dominio variable único de anticuerpo. También se sabe en el campo que los fragmentos scFv también pueden ser fragmentos variables monocatenarios estabilizados con disulfuro (dsFv) (WO2013163427).

25 [0024] Se conocen en la técnica diversos procedimientos que pueden usarse para la producción de tales anticuerpos y/o fragmentos. De este modo, los derivados (de anticuerpos) pueden producirse por peptidomiméticos. Además, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos monocatenarios (véase, entre otros, la patente de EE. UU. n.º 4,946,778, Kontermann y Dubel (2010), loc. cit. y Little (2009), loc. cit.) pueden adaptarse para producir anticuerpos monocatenarios específicos para polipéptido(s) elegido(s). También, se pueden usar animales transgénicos para expresar anticuerpos humanizados específicos para polipéptidos y proteínas de fusión de esta invención. Para la preparación de anticuerpos monoclonales, puede usarse cualquier técnica que proporcione anticuerpos producidos por cultivos de líneas celulares continuas. Los ejemplos de dichas técnicas incluyen la técnica del hibridoma (*Hybridoma Techniques*, J. BiolKohler y Milstein *Nature* 256 (1975), 495-497), la técnica del trioma, la técnica del hibridoma de linfocitos B humanos (Kozbor, *Immunology Today* 4 (1983), 72) y la técnica del hibridoma del EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc. (1985), 77-96). La resonancia de plasmón de superficie como se emplea en el sistema BIAcore se puede usar para aumentar la eficiencia de los anticuerpos de fagos que se unen a un epítipo de un polipéptido diana, tal como CD3 épsilon (Schier, Human

Antibodies Hybridomas 7 (1996), 97-105; Malmborg, J. Immunol. Methods 183 (1995), 7-13). También se prevé en el contexto de esta invención que el término "anticuerpo" comprenda construcciones de anticuerpos, que pueden expresarse en un huésped como se describe en el presente documento más adelante, por ejemplo, construcciones de anticuerpos que pueden transfectarse y/o transducirse mediante, entre otros, virus o vectores plasmídicos.

[0025] Además, el término "anticuerpo" como se emplea en la invención también se refiere a derivados o variantes de los anticuerpos descritos en el presente documento que muestran la misma especificidad o una especificidad similar a la de los anticuerpos descritos. Una especificidad similar es una especificidad de la que deriva al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 105 %, al menos el 110 %, al menos el 120 %, al menos el 130 %, al menos el 140 %, al menos el 150 %, al menos el 160 % de la especificidad del anticuerpo inicial/de control del que derivan las variantes o derivados. Los ejemplos de "variantes de anticuerpo" incluyen variantes humanizadas de anticuerpos no humanos, anticuerpos "madurados por afinidad" (véase, por ejemplo, Hawkins et al. J. Mol. Biol. 254, 889-896 (1992) y Lowman et al., Biochemistry 30, 10832-10837 (1991) y mutantes de anticuerpos con porción(es) efectora(s) alterada(s) (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5, 648, 260, Kontermann y Dubel (2010), loc. cit. y Little (2009), loc. cit).

[0026] Los términos "dominio de unión a antígeno", "fragmento de unión a antígeno", "dominio de unión a anticuerpo" y "región de unión a anticuerpo", cuando se usan en el presente documento, se refieren a una parte de una molécula de anticuerpo que comprende aminoácidos responsables de la unión específica entre anticuerpo y antígeno. La parte del antígeno que es reconocida y unida específicamente por el anticuerpo se denomina "epítipo", como se ha descrito anteriormente en el presente documento. Como se ha mencionado antes, un dominio de unión a antígeno puede comprender típicamente una región variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo y una región variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo; sin embargo, no tiene que comprender ambas. Los fragmentos Fd, por ejemplo, tienen dos regiones VH y a menudo conservan alguna porción de unión a antígeno del dominio de unión a antígeno intacta. Los ejemplos de fragmentos de unión a antígeno de un anticuerpo incluyen (1) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que tiene los dominios VL, VH, CL y CH1; (2) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que tiene dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (3) un fragmento Fd que tiene los dos dominios VH y CH1; (4) un fragmento Fv que tiene los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo, (5) un fragmento dAb (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), que tiene un dominio VH; (6) una región determinante de complementariedad (CDR) aislada, y (7) un Fv monocatenario (scFv). Aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH están codificados por genes separados, pueden unirse, usando métodos recombinantes, por una porción conectora sintética que les permita prepararse como una cadena de proteína única en la que las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena única (scFv); véase, por ejemplo, Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. USA 85:5879-5883). Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y los fragmentos se evalúan para determinar su función de la misma manera que los anticuerpos intactos. El término "anticuerpo monoclonal" como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural y/o modificaciones posteriores a la traducción (por ejemplo, isomerizaciones, amidaciones) que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, al estar dirigidos contra un único sitio antigénico. Además, en contraste con las preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales) que incluyen típicamente diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque se sintetizan mediante el cultivo de hibridoma, sin contaminar por otras inmunoglobulinas. El adjetivo "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como obtenido a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo mediante ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se van a usar según la presente invención se pueden preparar mediante el método del hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., Nature, 256: 495 (1975), o se puede preparar mediante métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 4,816, 567). Los "anticuerpos monoclonales" también pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos en fagos usando las técnicas descritas en Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991) y Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991), por ejemplo.

[0027] Los anticuerpos monoclonales del presente documento incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" (inmunoglobulinas) en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es/son idéntica(s) u homóloga(s) a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de tales anticuerpos, siempre que tengan la actividad biológica deseada (patente de EE. UU. n.º 4,816, 567; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos de interés en el presente documento incluyen anticuerpos "primitizados" que comprenden secuencias de unión a antígeno de dominio variable derivadas de un primate no humano (por

ejemplo, cercopitécidos, hominoideos, etc.) y secuencias de región constante humanas. Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de estas (tales como Fv, Fab, Fab', F (ab')₂ u otras subsecuencias de unión a antígeno de anticuerpos) de secuencias principalmente humanas, que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región hipervariable (también CDR) del receptor se sustituyen por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata o conejo que tengan la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región estructural de Fv (FR) de la inmunoglobulina humana se reemplazan por residuos no humanos correspondientes. Además, los "anticuerpos humanizados" como se usan en el presente documento también pueden comprender restos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se hacen para refinar y optimizar adicionalmente el funcionamiento del anticuerpo. El anticuerpo humanizado también comprenderá de manera óptima al menos una parte de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones et al., Nature, 321: 522-525 (1986); Reichmann et al., Nature, 332: 323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593-596 (1992).

[0028] El término "anticuerpo humano" incluye anticuerpos que tienen regiones variables y constantes que corresponden sustancialmente a secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana conocidas en la técnica, incluyendo, por ejemplo, las descritas por Kabat et al. (véase Kabat, et al. (1991) loc. cit.). Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica para un sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*), por ejemplo, en las CDR y, en particular, CDR3. El anticuerpo humano puede tener al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o más posiciones sustituidas por un residuo de aminoácido que no está codificado por la secuencia de inmunoglobulina de la línea germinal humana.

[0029] Como se usa en el presente documento, "anticuerpo generado *in vitro*" se refiere a un anticuerpo en el que toda o parte de la región variable (por ejemplo, al menos una CDR) se genera en una selección de células no inmunitarias (por ejemplo, una presentación en fagos *in vitro*, chip proteico o cualquier otro método en el que las secuencias candidatas se puedan analizar para determinar su capacidad para unirse a un antígeno). Por lo tanto, este término excluye preferiblemente secuencias generadas por reordenamiento genómico en una célula inmunitaria. Un "anticuerpo biespecífico" o un "anticuerpo funcional" es un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos pares de cadenas pesada/ligera diferentes y dos sitios de unión diferentes. Los anticuerpos biespecíficos pueden producirse mediante una variedad de métodos que incluyen fusión de hibridomas o unión de fragmentos Fab'. Véase, por ejemplo, Songsivilai & Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321 (1990). Están disponibles numerosos métodos conocidos por los expertos en la técnica para obtener anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos. Por ejemplo, los anticuerpos pueden producirse usando métodos de ADN recombinante (patente de EE. UU. n.º 4,816,567). Los anticuerpos monoclonales también pueden producirse mediante la generación de hibridomas (véase, por ejemplo, Kohler y Milstein (1975) Nature, 256: 495-499) de acuerdo con métodos conocidos. Los hibridomas formados de esta manera se criban después usando métodos convencionales, tales como análisis de inmuoadsorción enzimática (ELISA) y resonancia de plasmón de superficie (BIACORE™), para identificar uno o más hibridomas que producen un anticuerpo que se une específicamente con un antígeno específico. Cualquier forma del antígeno especificado puede usarse como inmunógeno, por ejemplo, antígeno recombinante, formas de origen natural, cualquier variante o fragmento del mismo, así como péptido antigénico del mismo.

[0030] Un método ejemplar para preparar anticuerpos incluye cribar bibliotecas de expresión de proteínas, por ejemplo, bibliotecas de presentación en fagos o ribosomas. La expresión en fagos se describe, por ejemplo, en Ladner et al., patente de EE. UU. n.º 5,223,409; Smith (1985) Science 228:1315-1317; Clackson et al. (1991) Nature, 352: 624-628.

[0031] Los anticuerpos humanizados o fragmentos de los mismos pueden generarse reemplazando secuencias del dominio variable Fv que no están directamente implicadas en la unión al antígeno con secuencias equivalentes de dominios variables Fv humanos. Los métodos ejemplares para generar anticuerpos humanizados o fragmentos de los mismos se proporcionan por Morrison (1985) Science 229:1202-1207; por Oi et al. (1986) BioTechniques 4:214; y por US 5,585,089; US 5,693,761; US 5,693,762; US 5,859,205; y US 6,407,213. Esos métodos incluyen aislar, manipular y expresar las secuencias de ácido nucleico que codifican todos o parte de dominios variables Fv de inmunoglobulina de al menos una de una cadena pesada o ligera. Tales ácidos nucleicos pueden obtenerse a partir de un hibridoma que produce un anticuerpo contra una diana predeterminada, tal como se ha descrito anteriormente, así como a partir de otras fuentes. El ADN recombinante que codifica la molécula de anticuerpo humanizado puede clonarse después en un vector de expresión apropiado.

[0032] Un anticuerpo humanizado puede optimizarse mediante la introducción de sustituciones conservadoras, sustituciones de secuencias de consenso, sustituciones de líneas germinales y/o retromutaciones. Tales moléculas de inmunoglobulina alteradas pueden prepararse mediante cualquiera de varias técnicas conocidas en

la técnica (por ejemplo, Teng et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80: 7308-7312, 1983; Kozbor et al., Immunology Today, 4: 7279, 1983; Olsson et al., Meth. Enzymol., 92: 3-16, 1982 y puede hacerse de acuerdo con las enseñanzas del documento EP 239 400). Un anticuerpo o fragmento del mismo también puede modificarse mediante delección específica de epítomos de linfocitos T humanos o "desinmunización" mediante los métodos dados a conocer en los documentos WO 98/52976 y WO 00/34317. En resumen, los dominios variables de las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo pueden analizarse para determinar péptidos que se unen al MHC de clase II; estos péptidos representan epítomos de linfocitos T potenciales (como se define en WO 98/52976 y WO 00/34317). Para la detección de epítomos de linfocitos T potenciales, puede aplicarse un enfoque de modelado informático denominado reconocimiento de plegamiento de péptidos o "peptide threading" y, además, pueden buscarse, en una base de datos de péptidos de unión al MHC de clase II humano, motivos presentes en las secuencias de VH y VL, tal como se describe en WO 98/52976 y WO 00/34317. Estos motivos se unen a cualquiera de los 18 alotipos principales de DR del MHC de clase II, y por tanto constituyen epítomos de linfocitos T potenciales. Los epítomos de linfocitos T potenciales detectados pueden eliminarse sustituyendo pequeños números de residuos de aminoácidos en los dominios variables, o preferiblemente, por sustituciones de aminoácidos individuales. En este contexto, pequeño significa uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis residuos de aminoácidos. Típicamente, se realizan sustituciones conservadoras. A menudo, pero no exclusivamente, se puede usar un aminoácido común a una posición en secuencias de anticuerpos de la línea germinal humana. Las secuencias de la línea germinal humana, por ejemplo, se describen en Tomlinson et al. (1992) J. Mol. Biol. 227:776-798; J. Mol. Biol. 227:776-798; Cook, G. P. et al. (1995) Immunol. Today Vol. 16 (5): 237-242; y Tomlinson et al. (1995) EMBO J. 14: 14: 4628-4638. El directorio V BASE proporciona un directorio exhaustivo de secuencias de región variable de inmunoglobulina humana (compiladas por Tomlinson, LA. et al. MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, UK). Estas secuencias pueden usarse como una fuente de secuencia humana, por ejemplo, para regiones estructurales y CDR. También se pueden usar regiones estructurales humanas de consenso, por ejemplo, como se describe en la patente de EE. UU. n.º 6,300,064. El emparejamiento de un VH y un VL juntos forma un único sitio de unión a antígeno, denominado en lo sucesivo "dominios de unión VH/VL combinados". El dominio CH más proximal a VH se designa como CH1. Cada cadena L está unida a una cadena H por un puente disulfuro covalente, mientras que las dos cadenas H están unidas entre sí por uno o más puentes disulfuro dependiendo del isotipo de la cadena H. Los dominios VH y VL consisten en cuatro regiones de secuencias relativamente conservadas denominadas regiones estructurales (FR1, FR2, FR3 y FR4), que forman una estructura base para tres regiones de secuencias hipervariables (regiones determinantes de complementariedad, CDR). Las CDR contienen la mayoría de los restos responsables de interacciones específicas del anticuerpo con el antígeno. Las CDR se denominan CDR 1, CDR2 y CDR3. Por consiguiente, los constituyentes de CDR en la cadena pesada se denominan H1, H2 y H3, mientras que los constituyentes de CDR en la cadena ligera se denominan L1, L2 y L3.

[0033] El término "variable" se refiere a las porciones de los dominios de inmunoglobulina que muestran variabilidad en su secuencia y que están implicadas en la determinación de la especificidad y afinidad de unión de un anticuerpo particular (es decir, el/los "dominio(s) variable(s)"). La variabilidad no se distribuye uniformemente por todos los dominios variables de los anticuerpos; se concentra en los subdominios de cada una de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera. Estos subdominios se denominan regiones "hipervariables" o "regiones determinantes de complementariedad" (CDR). Las porciones más conservadas (es decir, no hipervariables) de los dominios variables se denominan regiones "estructurales" (FRM). Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera de origen natural comprenden cada uno cuatro regiones FRM, adoptando en gran medida una configuración de lámina β , conectadas por tres regiones hipervariables, que forman bucles que conectan la estructura de lámina β y, en algunos casos, forman parte de ella. Las regiones hipervariables en cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad por la FRM y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno (véase Kabat et al., loc. cit.). Los dominios constantes no están directamente implicados en la unión al antígeno, pero poseen diversas funciones efectoras, tales como, por ejemplo, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos y activación del complemento.

[0034] El término "aminoácido" o "residuo de aminoácido" se refiere típicamente a un aminoácido que tiene su definición reconocida en la técnica tal como un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: alanina (Ala o A); arginina (Arg o R); asparagina (Asn o N); ácido aspártico (Asp o D); cisteína (Cys o C); glutamina (Gln o Q); ácido glutámico (Glu o E); glicina (Gly o G); histidina (His o H); isoleucina (Ile o I); leucina (Leu o L); lisina (Lys o K); metionina (Met o M); fenilalanina (Phe o F); prolina (Pro o P); serina (Ser o S); treonina (Thr o T); triptófano (Trp o W); tirosina (Tyr o Y); y valina (Val o V), aunque pueden usarse aminoácidos modificados, sintéticos o raros, según se desee. Generalmente, los aminoácidos pueden agruparse por tener una cadena lateral no polar (por ejemplo, Ala, Cys, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Val); una cadena lateral cargada negativamente (por ejemplo, Asp, Glu); una cadena lateral cargada positivamente (por ejemplo, Arg, His, Lys); o una cadena lateral polar no cargada (por ejemplo, Asn, Cys, Gln, Gly, His, Met, Phe, Ser, Thr, Trp y Tyr).

[0035] El término "región hipervariable" (también conocida como "regiones determinantes de complementariedad" o CDR) cuando se usa en el presente documento se refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que están (normalmente tres o cuatro regiones cortas de variabilidad de secuencia extrema) dentro del dominio de región V de una inmunoglobulina que forma el sitio de unión a antígeno y son los

principales determinantes de la especificidad de antígeno. Existen al menos dos métodos para identificar los residuos de CDR: (1) Un enfoque basado en la variabilidad de secuencia entre especies (es decir, Kabat et al., loc. cit.); y (2) Un enfoque basado en estudios cristalográficos de complejos antígeno-anticuerpo (Chothia, C. et al., J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987)). Sin embargo, en la medida en que dos técnicas de identificación de residuos definen regiones de solapamiento, pero no regiones idénticas, se pueden combinar para definir una CDR híbrida. Sin embargo, en general, los residuos de CDR se identifican preferiblemente de acuerdo con el denominado sistema (numeración) de Kabat.

[0036] La presente invención comprende el uso de Fab (VHCH1:VLCL). También son útiles para entender la invención Fab de sobrecruzamiento (VHCL:VLCH1) o Fab de dominio (V1CH1:V2CL). En la presente invención, sólo se hacen dos extensiones al heterodímero derivado de Fab y dirigido por CH1:CL. Cada cadena que comprende CH1 y CL tiene una extensión basada en enlaces peptídicos. Estas extensiones están en el extremo C-terminal de las cadenas que comprenden CH1 y que comprenden CL. En esta posición no influirán en la capacidad de unión de la molécula Fab y, por tanto, crearán una molécula trifuncional, trivalente, biespecífica bivalente o trispecífica completamente funcional. Sorprendentemente, las fusiones C-terminales de la presente invención también aumentan la estabilidad y la temperatura de fusión global de la proteína de fusión final como se demuestra en las figuras 6A, 6B.

[0037] Las proteínas de fusión de la presente invención se extienden adicionalmente con moléculas de unión o efectoras para comprender una función de unión doble hacia un antígeno tumoral y una función de activación inmunitaria única.

[0038] Las proteínas de fusión de la presente invención combinan una unión bivalente hacia el antígeno asociado a tumores (TAA) 5T4, con una función activadora de linfocitos T. En el ejemplo de la familia Tribody Tb-5T4, una unión bivalente a 5T4 se combinará con una unión monovalente a CD3. La unión bivalente a 5T4 aumenta la especificidad por las células tumorales que sobreexpresan el antígeno 5T4. Una unión bivalente también disminuye la velocidad de desactivación del complejo de direccionamiento, estabilizando así la unión en el tiempo. La unión monovalente a CD3 de linfocitos T evita la activación de linfocitos T por una molécula de unión a CD3 bivalente como se observa con OKT3 y (Fab')₂ derivado de OKT3 (fragmentos Fab de unión bivalente a CD3). Estas moléculas se conocen por la activación de linfocitos T seguida de muerte celular inducida por activación o por volver a los linfocitos T anérgicos, y son útiles para evitar el rechazo de órganos trasplantados. Un heterodímero de proteínas de fusión de la presente invención está compuesto por dos cadenas de fusión que forman un heterodímero dirigido por CHLCL. En un caso adicional útil para entender la invención, una proteína de fusión comprende dos cadenas diferentes, en la que (i) una cadena comprende dos dominios de unión a anticuerpo VH, un dominio de unión a anticuerpo VL y un dominio de anticuerpo CH1 o CL, y (ii) la otra cadena comprende dos dominios de unión a anticuerpo VL, un dominio de unión a anticuerpo VH y un dominio de anticuerpo CL o CH1, siempre que la proteína de fusión contenga una interacción heterodimérica entre el dominio de anticuerpo CH1 de una cadena y el dominio de anticuerpo CL de la otra cadena, caracterizada por el hecho de que (a) uno o dos dominios de unión VH/VL combinados formados dentro de una cadena son capaces de unirse al antígeno 5T4 extracelular; y (b) el dominio o los dos dominios de unión VH/VL combinados restantes formados dentro de una cadena son capaces de unirse al complejo receptor CD3 en linfocitos T.

[0039] Una proteína de fusión de la presente invención tiene la forma o también podría definirse como sigue

VH(5T4)-CH1-L1-VH(CD3)-L2-VL(CD3)
en combinación con
VL(5T4)CL-L1-VH(5T4)-L2-VL(5T4).

[0040] Una proteína de fusión de la descripción puede definirse como sigue:

VH(5T4)-CH1-L1-VH(5T4)-L2-VL(5T4) o
VH(5T4)-CH1-L1-VL(5T4)-L2-VH(5T4)

en combinación con

VL(5T4)CL-L1-VH(CD3)-L2-VL(CD3) o
VL(5T4)CL-L1-VL(CD3)-L2-VH(CD3).

[0041] O de la forma:

VH(CD3)-CH1-L1-VH(5T4)-L2-VL(5T4) o
VH(CD3)-CH1-L1-VL(5T4)-L2-VH(5T4)

en combinación con

VL(CD3)CL-L1-VH(5T4)-L2-VL(5T4) o

VL(CD3)CL-L1-VL(5T4)-L2-VH(5T4).

[0042] O de la forma:

VL(CD3)-CH1-L1-VH(5T4)-L2-VL(5T4) o
VL(CD3)-CH1-L1-VL(5T4)-L2-VH(5T4)

en combinación con

VH(CD3)CL-L1-VH(5T4)-L2-VL(5T4) o
VH(CD3)CL-L1-VL(5T4)-L2-VH(5T4)

[0043] O basado en un Fab de sobrecruzamiento (VHCL:VLCH1) de la forma:

VL(5T4)-CH1-L1-VH(CD3)-L2-VL(CD3) o
VL(5T4)-CH1-L1-VL(CD3)-L2-VH(CD3)

en combinación con

VH(5T4)CL-L1-VH(5T4)-L2-VL(5T4) o
VH(5T4)CL-L1-VL(5T4)-L2-VH(5T4).

[0044] O:

VL(5T4)-CH1-L1-VH(5T4)-L2-VL(5T4) o
VL(5T4)-CH1-L1-VL(5T4)-L2-VH(5T4)

en combinación con

VH(5T4)CL-L1-VH(CD3)-L2-VL(CD3) o
VH(5T4)CL-L1-VL(CD3)-L2-VH(CD3).

[0045] Todas estas proteínas de fusión se han ilustrado en las figuras 1B y 1C.

[0046] Otras proteínas de fusión Tb-5T4 de la divulgación son aquellas en las que las estructuras se basan en fusiones de unión de dominio único a heterodímeros CH1 y CL (dFab) (véase también la figura 1D):

V1(5T4)CL-L1-VH(5T4)-L2-VL(5T4) o
V1(5T4)CL-L1-VL(5T4)-L2-VH(5T4)

donde V1 es un ligador de dominio único con especificidad para 5T4
en combinación con

V2-CH1-L1-VH(CD3)-L2-VL(CD3) o
V2-CH1-L1-VL(CD3)-L2-VH(CD3)

donde V2 es un ligador de dominio único con una especificidad diferente que para 5T4 o CD3 como se ilustra para 2 combinaciones posibles en (xiii) y (xvi) de la figura 1D,

[0047] U organizaciones de diferentes formas de

V2-CH1-L1-VH(5T4)-L2-VL(5T4) o
V2-CH1-L1-VL(5T4)-L2-VH(5T4)

en combinación con

V1(5T4)CL-L1-VH(CD3)-L2-VL(CD3) o
V1(5T4)CL-L1-VL(CD3)-L2-VH(CD3)

donde V2 es un ligador de dominio único con una especificidad diferente que para 5T4 o CD3 como se ilustra para 2 combinaciones posibles en (xiv) y (xvii) de la figura 1D,

O diferentes formas de organización de

V1(CD3)-CH1-L1-VH(5T4)-L2-VL(5T4) o

V1(CD3)-CH1-L1-VL(5T4)-L2-VH(5T4)

en combinación con

5 V2-CL-L1-VH(5T4)-L2-VL(5T4) o
V2-CL-L1-VL(5T4)-L2-VH(5T4)

donde V2 es un ligador de dominio único con una especificidad diferente que para 5T4 o CD3 como se ilustra para 2 combinaciones posibles en el modelo (xv) y (xviii) de la figura 1D.

10 [0048] En todas las combinaciones representadas en la figura 1D, el scFv también puede ser un fragmento variable de cadena sencilla estabilizado con disulfuro (dsFv)

El heterodímero de las proteínas de fusión de la invención comprende dos cadenas diferentes:

15 Primera cadena: VH(5T4)-CH1-L1-VH(CD3)-L2-VL(CD3) en combinación con
Segunda cadena: VL(5T4)CL-L1-VH(5T4)-L2-VL(5T4)

donde VH, VL son dominios de unión variables de anticuerpo, CH1 y CL son dominios constantes de anticuerpo y L1 y L2 son porciones conectoras, y donde el heterodímero de proteínas de fusión contiene una interacción heterodimérica entre el CH1 de la primera cadena y el dominio constante de anticuerpo CL de la segunda cadena, y el heterodímero de proteínas de fusión es tal que (a) dos dominios de unión VH/VL combinados formados dentro de dicho heterodímero de proteínas de fusión son capaces de unirse al antígeno 5T4 extracelular; y (b) el dominio de unión VH/VL combinado restante formado dentro de dicho heterodímero de proteínas de fusión es capaz de unirse al complejo receptor CD3 en linfocitos T, donde la primera cadena comprende o tiene la SEQ ID N.º 51, y donde la segunda cadena comprende o tiene la SEQ ID N.º 52.

[0049] La divulgación abarca una proteína de fusión que es preferiblemente como se ha definido antes. Esta proteína de fusión comprende dos cadenas diferentes:

30 b)

Primera cadena: VH(5T4)-CH1-L1-VH(5T4)-L2-VL(5T4) o VH(5T4)-CH1-L1-VL(5T4)-L2-VH(5T4) en combinación con

35 Segunda cadena: VL(5T4)CL-L1-VH(CD3)-L2-VL(CD3) o VL(5T4)CL-L1-VL(CD3)-L2-VH(CD3),

c)

40 Primera cadena: VH(CD3)-CH1-L1-VH(5T4)-L2-VL(5T4) o VH(CD3)-CH1-L1-VL(5T4)-L2-VH(5T4) en combinación con

Segunda cadena: VL(CD3)CL-L1-VH(5T4)-L2-VL(5T4) o VL(CD3)CL-L1-VL(5T4)-L2-VH(5T4),

d)

45 Primera cadena: VL(CD3)-CH1-L1-VH(5T4)-L2-VL(5T4) o VL(CD3)-CH1-L1-VL(5T4)-L2-VH(5T4) en combinación con

Segunda cadena: VH(CD3)CL-L1-VH(5T4)-L2-VL(5T4) o VH(CD3)CL-L1-VL(5T4)-L2-VH(5T4),

50 e)

Primera cadena: VL(5T4)-CH1-L1-VH(CD3)-L2-VL(CD3) o VL(5T4)-CH1-L1-VL(CD3)-L2-VH(CD3) en combinación con

Segunda cadena: VH(5T4)CL-L1-VH(5T4)-L2-VL(5T4) o VH(5T4)CL-L1-VL(5T4)-L2-VH(5T4),

55 f)

Primera cadena: VL(5T4)-CH1-L1-VH(5T4)-L2-VL(5T4) o VL(5T4)-CH1-L1-VL(5T4)-L2-VH(5T4) en combinación con

60 Segunda cadena: VH(5T4)CL-L1-VH(CD3)-L2-VL(CD3) o VH(5T4)CL-L1-VL(CD3)-L2-VH(CD3).

g)

65 Primera cadena V1(5T4)CL-L1-VH(5T4)-L2-VL(5T4) o V1(5T4)CL-L1-VL(5T4)-L2-VH(5T4) en combinación con

Segunda cadena: V2-CH1-L1-VH(CD3)-L2-VL(CD3) o V2-CH1-L1-VL(CD3)-L2-VH(CD3)

h)

5 Primera cadena: V2-CH1-L1-VH(5T4)-L2-VL(5T4) o V2-CH1-L1-VL(5T4)-L2-VH(5T4) en combinación con
Segunda cadena: V1(5T4)CL-L1-VH(CD3)-L2-VL(CD3) o V1(5T4)CL-L1-VL(CD3)-L2-VH(CD3)

i)

10 Primera cadena: V1(CD3)-CH1-L1-VH(5T4)-L2-VL(5T4) o V1(CD3)-CH1-L1-VL(5T4)-L2-VH(5T4) en
combinación con
Segunda cadena: V2-CL-L1-VH(5T4)-L2-VL(5T4) o V2-CL-L1-VL(5T4)-L2-VH(5T4)

15 donde VH, VL son dominios de unión a anticuerpos, CH1 y CL son dominios de anticuerpos, y donde la proteína
de fusión es tal que (a) uno o dos dominios de unión a VH/VL combinados formados dentro de una cadena son
capaces de unirse al antígeno 5T4 extracelular; y (b) el dominio o los dos dominios de unión a VH/VL
combinados restantes formados dentro de una cadena son capaces de unirse al complejo receptor CD3 en
linfocitos T.

20 [0050] La proteína de fusión Tb-5T4, también denominada proteína de fusión, comprende proteínas de fusión en
las que la porción que comprende CH1:CL se une al antígeno 5T4 y cada cadena que comprende CH1 y que
comprende CL se extiende en el extremo C con otra molécula de unión. La porción que comprende CH1:CL
proporciona una función de unión a 5T4, los ligadores condensados adicionales comprenden al menos otra
molécula de unión a 5T4 y otra molécula de unión a CD3.

25 [0051] La proteína de fusión de la presente invención puede derivarse de una combinación de dominios V como
se observa en anticuerpos normales. Pueden formarse como fragmentos variables de cadena sencilla (scFv).
scFv puede estar en el formato VH-ligador-VL o en el formato VL-ligador-VH. Según la invención, el scFv está en
el formato VH-ligador-VL. Ambos formatos pueden tener diferencias en las propiedades de unión y estabilidad.
30 Ambos formatos pueden compararse sin una carga excesiva por un experto en la técnica. El uso de scFv se
enseña en el documento WO8801649 (single polypeptide binding molecules) y US5455030 (Immunotherapy
using single chain polypeptide binding molecules).

35 [0052] Las moléculas scFv comprenden una molécula conectora que se ha descrito en la técnica. La técnica
contiene ejemplos en los que las secuencias conectoras pueden optimizarse para ciertos pares de VH y VL. Una
porción conectora preferida abarca la distancia entre el extremo C terminal del primer dominio V y el extremo N
terminal del segundo dominio V. Una porción conectora preferida también es suficientemente flexible para no
perturbar el plegamiento de las regiones variables. Una porción conectora preferida no contiene epítopos
40 antigénicos de anticuerpos ni epítopos inmunogénicos de linfocitos T. Un ejemplo de una porción conectora
preferida que conecta los dos dominios V en un scFv es un péptido de 15 a 18 aminoácidos de largo que
contiene muchas glicinas (un aminoácido flexible no inmunogénico) y serinas (un aminoácido flexible poco
inmunogénico con mayor solubilidad). Un ejemplo de una porción conectora más preferida conocida en la técnica
es GGGGSGGGGSGGGGS, o escrita (GGGGS)3. Las porciones conectoras según la invención son como se
muestra en la secuencia de las SEQ ID N.º: 51 y 52.

45 [0053] Los dominios variables generalmente no tienen una interacción estable, y las constantes de disociación
VH:VL pueden ser tan altas como 10 mM. Por consiguiente, los dímeros del dominio V a menudo se disocian.
Una porción conectora que fusiona ambos dominios aumenta la posibilidad de reasociación.

50 [0054] Otra tecnología es conocida en la técnica: WO9429350 (Methods of making recombinant disulphide-
stabilized polypeptide fragments having binding specificity) enseña la modificación por ingeniería genética en
sitios específicos entre VH y VL para modificar un puente disulfuro artificial. De esta manera, se puede obtener
un dímero estable covalentemente. En la presente invención, se prefieren fragmentos de unión variables como
polipéptido de cadena sencilla. Puesto que se necesitan dos para una proteína de fusión tal como un Tribody Tb-
5T4, el formato de cadena sencilla evita el emparejamiento incorrecto de dominios V y, por tanto, la variación en
55 el producto y la producción de derivados no funcionales. Sin embargo, la disociación y reasociación frecuentes
de los pares VH-VL puede llevar en casos particulares a la formación de dímeros con otra proteína de fusión tal
como Tb-5T4. Estos productos tendrían una posible unión anti-CD3 bivalente y, por lo tanto, una activación
potencial de los linfocitos T incluso cuando no se acumulen en la célula diana tumoral.

60 [0055] El mismo número de acopladores biespecíficos de linfocitos T basados en moléculas de scFv inducen
toxicidad fuera de la diana en forma de producción de citocinas inflamatorias. Las citocinas típicas inducidas son
IL-2, IFN-gamma y TNF-alfa. Cuando la estimulación es alta y/o la tormenta de citocinas no está clínicamente
controlada, puede conducir a disfunción orgánica y volverse potencialmente mortal.

[0056] La presente invención usa una combinación de las tecnologías de dominio variable de cadena sencilla como se enseña en WO8801649 y la estabilización con disulfuro del fragmento V como se enseña en WO9429350 para crear un dominio variable de cadena sencilla estabilizado con disulfuro (dsFv).

[0057] Para ensamblar la proteína de fusión de la invención, deben seleccionarse dominios variables que forman una molécula de unión funcional. Un anticuerpo adecuado que se une al TAA 5T4 sin reactividad cruzada descrita en tejido normal se conoce como el monoclonal de ratón 5T4.H8. Los dominios variables de 5T4.H8 se dan en o están comprendidos en o consisten en la SEQ ID 01 y la SEQ ID 16. Un derivado estructuralmente más estable de estas secuencias se da en o está comprendido en o consiste en la SEQ ID 02 y la SEQ ID 17. La región estructural del dominio variable murino puede humanizarse usando diversos métodos conocidos en la técnica. Ejemplos de dominios variables humanizados se dan en o están comprendidos en o consisten en SEQ ID 3 a 15 (SEQ ID 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11; 12; 13; 14; 15) para el dominio VH y SEQ ID 18 a 25 (SEQ ID 18; 19; 20; 21; 22; 23; 24; 25) para el dominio VL. Se prefieren los restos de estructuras base humanizados porque generalmente se cree que son menos antigénicos y/o inmunogénicos. Por lo tanto, una proteína de fusión preferida tal como Tb-5T4 de la invención tiene una combinación de una secuencia de VH de la SEQ ID 6 con una secuencia de VL de la SEQ ID 19. La divulgación abarca una combinación de una secuencia de VH de la SEQ ID 3-15 con una secuencia de VL de la SEQ ID 18-25. La divulgación también se refiere a una proteína de fusión tal como Tb-5T4 con una combinación de una secuencia de VH que comprende una de o que consiste en una de una secuencia que tiene al menos un 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % de identidad con una de las SEQ ID 3-15 con una secuencia de VL que comprende una de o que consiste en una de una secuencia que tiene al menos un 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % de identidad con una de las SEQ ID 18-25. Una combinación funcional puede formarse después en un dominio variable de cadena sencilla estabilizado con disulfuro (dsFv) del formato VH-ligador-VL o VL-ligador-VH, o injertarse en los dominios CH1 y CL para crear un Fab de VHCH1:VLCL (según la invención) o un Fab de sobrecruzamiento de VHCL:VLCH1 (según la divulgación).

[0058] Un ligador adecuado para el complejo CD3 se puede ensamblar de manera similar. Se conocen en la técnica varios ligadores de CD-épsilon activadores de linfocitos T. OKT3 es un monoclonal de ratón usado para prevenir el rechazo de trasplantes. El uso de secuencias de OKT3 (SEQ ID 26 y SEQ ID 34 o secuencias que comprenden estas secuencias o que tienen al menos un 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % de identidad con estas secuencias) se enseña en US6750325 (CD3 specific recombinant antibody) y WO2008079713 (Methods for the treatment of LADA and other adult-onset autoimmune diabetes using immunosuppressive monoclonal antibodies with reduced toxicity). Las formas humanizadas de las secuencias variables de OKT3 se describen en US7635475 (Novel diabody-type bispecific antibody) y WO2005040220 (Multispecific deimmunized CD3-binders). Las secuencias del dominio VH derivadas de OKT3 humanizado se dan en las SEQ ID N.º: 27; 28; 29 (o secuencias que comprenden estas secuencias o que tienen al menos un 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % de identidad con estas secuencias). Las secuencias del dominio VL derivadas de OKT3 humanizado se dan en las SEQ ID N.º: 35; 36; 37 (o secuencias que comprenden estas secuencias o que tienen al menos un 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % de identidad con estas secuencias). Un resto de unión a CD3 basado en los dominios variables de OKT3 para crear una combinación de scFv, Fab de dsFv o Fab de sobrecruzamiento puede estar hecho de las SEQ ID N.º 27-29 (o secuencias que comprenden estas secuencias o que tienen al menos un 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % de identidad con una de estas secuencias) con las SEQ ID N.º 35-37 (o secuencias que comprenden estas secuencias o que tienen al menos un 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % de identidad con una de estas secuencias). Según la invención, el resto de unión a CD3 se basa en la SEQ ID N.º: 29 y la SEQ ID N.º: 37.

[0059] Otros ligadores para CD3 de la divulgación se conocen en la técnica a partir de US7728114 (Anti-CD3 antibodies and methods of use thereof) (SEQ ID N.º 30 y 38 o secuencias que comprenden estas secuencias o que tienen al menos un 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % de identidad con estas secuencias); WO9404679 (Humanized antibodies and methods for making them) (SEQ ID N.º 32 y 40 o secuencias que comprenden estas secuencias o que tienen al menos el 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % de identidad con estas secuencias), US7381803 (Humanized antibodies against CD3) (SEQ ID N.º 33 y 40 o secuencias que comprenden estas secuencias o que tienen al menos el 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % de identidad con estas secuencias), o tal como se describe en Li et al (2005). "Construction and characterization of a humanized anti-human CD3 monoclonal antibody 12F6 with effective immunoregulation functions". Immunology 116 (4): 487-498. (SEQ ID N.º 31 y 39 o secuencias que comprenden estas secuencias o que tienen al menos 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % de identidad con estas secuencias). Otros ejemplos de ligadores anti-CD3 adecuados de la divulgación que también se unen a otras especies de moléculas de CD3 se describen en WO2008119567 (Cross-species-specific binding domain) así como su uso en la creación de acopladores biespecíficos de linfocitos T como se enseña en WO2010037835.

[0060] La combinación elegida de VH y VL se formatea en un fragmento variable de cadena sencilla. Puede ser en la orientación VH-L2-VL (según la invención) o VL-L2-VH (según la divulgación), donde L2 es una secuencia conectora que conecta el aminoácido C-terminal del primer dominio variable con el extremo N-terminal del segundo dominio variable. Una porción conectora preferida tiene una longitud de 15-30 aminoácidos, tiene una

alta flexibilidad combinada con una mínima hidrofobicidad e inmunogenicidad o antigenicidad. Un ejemplo de una porción conectora preferida es la porción conectora (GGGGS)₃, posiblemente extendida con unos pocos aminoácidos más pequeños (2-4). Un ejemplo de dicha porción conectora extendida (GGGS)₃ es la secuencia ASGGGGSGGGSGGGGSAG. Se conocen en la técnica porciones conectoras alternativas y se han optimizado para minimizar el impedimento estructural al fragmento de anticuerpo, para aumentar la estabilidad o solubilidad. Las porciones conectoras conocidas en la técnica pueden evaluarse para obtener moléculas scFv más óptimas. La optimización adicional de la porción conectora L2 se puede obtener a través de aleatorización junto con un sistema de selección. Un ejemplo de tal optimización se da por Tang et al. 1996 Selection of Linkers for a Catalytic Single-chain Antibody Using Phage Display Technology, The Journal of Biological Chemistry, 271, 15682-15686. Las porciones conectoras según la invención son como se muestra en la secuencia de la SEQ ID N.º: 51 y 52.

[0061] El scFv de la invención se estabiliza adicionalmente introduciendo una forma estabilizada con disulfuro del scFv. En el documento WO9429350 se explica qué posiciones son elegibles para modificar por ingeniería genética un puente disulfuro no natural entre las mitades C-terminales de los dominios VH y VL. Otros ejemplos se ilustran en Schiedl et al, 2000 "Expression of a bispecific dsFv-dsFv' antibody fragment in Escherichia coli" Protein Eng. (2000) 13 (10): 725-734. A diferencia de las enseñanzas de estas publicaciones, sorprendentemente, las moléculas preferidas de la invención usan una única molécula peptídica, que es un fragmento variable de cadena sencilla estabilizado adicionalmente con el puente disulfuro modificado por ingeniería genética entre el VH y el VL apropiados. Esto evitó la formación de complejos altamente activantes debido a la multimerización de los ligadores de CD3. Sorprendentemente, no se formaron pares incorrectos incluso al diseñar un puente disulfuro entre dominios en dos scFv diferentes presentes en la proteína de fusión. Igualmente sorprendente fue la ausencia total de emparejamiento incorrecto de disulfuro en la proteína de fusión de la invención, teniendo en cuenta que la proteína de fusión ya contiene 8 puentes disulfuro intradominio y 1 intercatenario, y ahora se introducen dos puentes disulfuro interdominio más. También fue sorprendente que la proteína de fusión de la invención tuviera una mayor estabilidad de la molécula total. Un ejemplo es el sorprendente aumento en la potencia activadora de linfocitos T cuando se estabiliza por ds una nueva forma humanizada del scFv de unión a CD3 (OKT3) (dshuOKT3-31). Las secuencias para dominios de unión VH/VL combinados (es decir, también denominados VH/VL combinados) se dan en la SEQ ID N.º 42 (scFv5T4) (según la divulgación); la SEQ ID N.º 43 (scFvhu5T4) (según la divulgación); la SEQ ID N.º 44 (dsFvhu5T4) (según la invención) para las porciones conectoras 5T4. Las secuencias para dominios de unión VH/VL combinados a CD3 en los que la unión se basa en OKT3 son la SEQ ID N.º 45 (scFvOKT3) (según la divulgación); la SEQ ID N.º 46 (scFvhuOKT3v32) (según la divulgación) y la SEQ ID N.º 47 (dsFvhuOKT3v32) (según la invención). También se describe la proteína de fusión que contiene un ligador de CD3 humanizado estabilizado con disulfuro basado en UCHT1 en la SEQ ID N.º 48 (dsFvhuUCHT1-24). Obviamente, un experto en la materia puede hacer otras combinaciones funcionales de la divulgación basándose en el listado de secuencias de las SEQ ID 1-41 (es decir, también denominadas secuencias artificiales parte de la proteína de fusión). Las secuencias que comprenden estas secuencias (es decir, SEQ ID N.º: 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48) o que tienen al menos un 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % de identidad con estas secuencias también están englobadas por la divulgación. También se conoce en la técnica el injertar las regiones responsables de la unión al antígeno en una estructura base diferente. El sitio de unión al antígeno está compuesto por 6 regiones determinantes complementarias (CDR) distintas, soportadas por un núcleo hidrófobo estructural en la zona "Vernier". El injerto de las CDR y las secuencias de soporte esenciales se divulga en US8399625 y se suele usar para combinar sitios de unión a antígeno de diferentes especies con residuos de estructura base humanos como se describe, por ejemplo, en WO9109967; US5225539; US5693761 o US5821337. Dependiendo del anticuerpo, no son necesarias todas las secuencias en los bucles de CDR y las posiciones esenciales pueden determinarse mediante mutagénesis de barrido con alanina. Aquí, cada aminoácido en los bucles de CDR se cambia a Ala y se analiza la unión. Una variante más reciente y preferida de una técnica que determina los residuos mínimos para conservar el sitio de unión al antígeno se describe en WO2012038609 "Super-humanized antibodies", y en Pelat et al (2011) "Engineering the variable region of therapeutic IgG antibodies" MAb 3(3): 243-252. Un experto en la materia podría cambiar fácilmente los sitios de unión a antígeno contenidos en la proteína de fusión de la invención a diferentes regiones estructurales conservadas tal como se enumera en la SEQ ID 1-41.

[0062] Una vez identificados los dominios V deseados, es necesario seleccionar un par coincidente para injertarse en los dominios constantes Fab CH1 y CL. Esta técnica produce moléculas Fab "quiméricas" que contienen una combinación no nativa de dominios V (VH y VL) y dominios C (CH1 y CL). La sustitución puede guiarse por homología con la secuencia Fab nativa para no interrumpir el plegamiento de Fab que puede influir en la unión y estabilidad. La quimerización de Fab está ampliamente descrita en la técnica (véase, por ejemplo, US20030095964 Process for producing humanized chimera antibody. Incluso la creación de cadenas Fab de sobrecruzamiento en la configuración VHCL:VLCH1 está ampliamente descrita y permite el injerto con éxito de los dominios V (véase, por ejemplo, Fenn et al. (2013). "Crystal structure of an anti-Ang2 CrossFab demonstrates complete structural and functional integrity of the variable domain." PLoS One 8(4): e61953).

[0063] Los aminoácidos C-terminales de las cadenas derivadas de Fab (la cadena que contiene CH1 por un lado y la cadena que contiene CL por otro lado) se conectarán al dsFv seleccionado con una secuencia conectora elegida L1. L1 puede ser tan corta como un único aminoácido y tan larga como sea necesario funcionalmente.

Preferiblemente, L1 debe introducir algún espacio entre los dos bloques de construcción derivados de scFv y el resto derivado de Fab. También preferiblemente, L1 debería tener cierta flexibilidad de la porción conectora. La longitud de L1 puede optimizarse para ajustarse a la distancia óptima entre la posición del epítipo y el CD3. Tales ejemplos se pueden encontrar en Hombach et al. (2007). "T cell activation by antibody-like immunoreceptors: the position of the binding epitope within the target molecule determines the efficiency of activation of redirected T cells". J Immunol 178(7): 4650-4657; y Guest et al. (2005). "The role of extracellular spacer regions in the optimal design of chimeric immune receptors: evaluation of four different scFvs and antigens". J Immunother 28(3): 203-211. La composición de la secuencia conectora puede optimizarse en términos de su rigidez, resistencia a proteasas o contener funciones adicionales. Las porciones conectoras según la invención son como se muestran en la secuencia de las SEQ ID N.º: 51 y 52.

[0064] En una forma de realización de la divulgación, la proteína de fusión de la invención comprende las secuencias SEQ ID N.º 49 (cadena que contiene CH1) y SEQ ID N.º 50 (cadena que contiene CL) para una proteína de fusión basada en ligadores 5T4 murinos (Tb535C). La proteína de fusión de la invención comprende las secuencias SEQ ID N.º 51 (cadena que contiene CH1) y SEQ ID N.º 52 (cadena que contiene CL) para una proteína de fusión de la invención basada en ligadores 5T4 humanizados (Tb535H).

[0065] En una forma de realización de la divulgación, la proteína de fusión de la invención comprende secuencias que tienen al menos un 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID N.º 49 (cadena que contiene CH1) y que tienen al menos un 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID N.º 50 (cadena que contiene CL) para una proteína de fusión basada en ligadores 5T4 murinos (Tb535C).

[0066] En una forma de realización de la divulgación, la proteína de fusión comprende o consiste en las secuencias SEQ ID N.º 49 (cadena que contiene CH1) y SEQ ID N.º 50 (cadena que contiene CL) para una proteína de fusión basada en ligadores 5T4 murinos (Tb535C). El heterodímero de proteínas de fusión de la invención comprende o consiste en las secuencias SEQ ID N.º 51 (cadena que contiene CH1) y SEQ ID N.º 52 (cadena que contiene CL) para una proteína de fusión de la invención basada en ligadores 5T4 humanizados (Tb535H).

[0067] Los mejores resultados se obtuvieron con Tb535H: sorprendentemente tiene una configuración compacta (figura 5A). Por lo tanto, se podría suponer que es bastante estable (figura 6AD) y que es más fácil de producir (se obtuvieron rendimientos óptimos en la figura 7D). Además, sorprendentemente, se ha descubierto que dicha proteína de fusión tiene un gran volumen de distribución y una depuración lenta (figura 10). Finalmente, la actividad de esta proteína de fusión es óptima en diferentes tipos de tumores (figuras 9, 11A, 11B).

[0068] En una forma de realización, la proteína de fusión de la presente divulgación comprende uno o dos dominios de unión a VH que consiste(n) o comprende(n) o tiene(n) al menos un 90 % de identidad con cualquiera de las SEQ ID N.º: 1 a 15. Un VH preferido está representado por una secuencia que consiste en o que comprende o que tiene al menos un 90 % de identidad con la SEQ ID N.º: 6. En otra forma de realización, la proteína de fusión de la presente descripción comprende uno o dos dominios de unión a VL que consisten en o que comprenden o tienen al menos un 90 % de identidad con cualquiera de las SEQ ID N.º: 16 a 25. Un VL preferido está representado por una secuencia que consiste en o que comprende o que tiene al menos un 90 % de identidad con la SEQ ID N.º: 19. Preferiblemente, la proteína de fusión de la divulgación comprende una combinación de cualquiera de las SEQ ID N.º: 1 a 15 con cualquiera de las SEQ ID N.º: 16 a 25. Una proteína de fusión más preferida comprende una combinación de un VH que está representado por una secuencia que consiste en, que comprende o que tiene al menos un 90 % de identidad con la SEQ ID N.º: 6 y un VL que está representado por una secuencia que consiste en, que comprende o que tiene al menos un 90 % de identidad con la SEQ ID N.º: 19. El heterodímero de proteínas de fusión de la invención comprende una combinación de la SEQ ID N.º: 6 con la SEQ ID N.º: 19, como en la SEQ ID N.º: 51 y la SEQ ID N.º: 52.

[0069] En otra forma de realización de la presente divulgación, la proteína de fusión i) comprende uno o dos dominios de unión a VH que consisten en o que comprenden o que tienen al menos un 90 % de identidad con cualquiera de las SEQ ID N.º: 26 a 33 o ii) comprende uno o dos dominios de unión a VL que consisten(n) en o comprenden(n) o tiene(n) al menos un 90 % de identidad con cualquiera de las SEQ ID N.º: 34 a 41.

[0070] En una forma de realización preferida, la proteína de fusión de la divulgación comprende una combinación de cualquiera de las SEQ ID N.º: 26 a 33 con cualquiera de las SEQ ID N.º: 34 a 41. Más preferiblemente, la proteína de fusión i) comprende uno o dos dominios de unión a VH que consisten en o que comprenden o que tienen al menos un 90 % de identidad con la SEQ ID N.º: 29 o ii) comprende uno o dos dominios de unión a VL que consiste(n) en o comprende(n) o tiene(n) al menos un 90 % de identidad con la SEQ ID N.º: 37.

[0071] En una forma de realización preferida, la proteína de fusión de la divulgación comprende uno o dos dominios de unión VH/VL combinados que consisten en o que comprenden o tienen al menos un 90 % de identidad con cualquiera de las SEQ ID N.º: 42 a 44 o cualquiera de las SEQ ID N.º: 45 a 48, más en particular, en donde uno o dos dominios de unión VH/VL combinados consisten(n) en o comprenden(n) o tienen al menos

un 90 % de identidad con cualquiera de las SEQ ID N.º: 42 a 44, y el dominio o los dos dominios de unión VH/VL combinado(s) restante(s) consisten(n) en o comprenden(n) o tiene(n) al menos un 90 % de identidad con cualquiera de las SEQ ID N.º: 45 a 48. En una forma de realización más preferida de la divulgación, una cadena de la proteína de fusión comprende la SEQ ID N.º: 49 mientras que la otra cadena comprende la SEQ ID N.º: 50 según la invención, una cadena comprende la SEQ ID N.º: 51 y la otra cadena comprende la SEQ ID N.º: 52.

[0072] La presente invención también comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el heterodímero de las proteínas de fusión de la invención tal como se describe en el presente documento, así como un vector, que comprende dichas secuencias de ácido nucleico, o una célula hospedadora transformada o transfectada con dicha secuencia de ácido nucleico o dicho vector.

[0073] La invención también consiste en o comprende un procedimiento para la producción del heterodímero de proteínas de fusión de la invención, donde dicho procedimiento comprende cultivar una célula hospedadora, tal como se ha definido anteriormente, en condiciones que permitan la expresión del heterodímero de proteínas de fusión de la invención y recuperar el heterodímero producido de proteínas de fusión del cultivo.

[0074] En una forma de realización preferida, la invención es una composición farmacéutica que comprende un heterodímero de proteínas de fusión de la invención, o producido según el procedimiento descrito anteriormente, para su uso como medicamento, más específicamente, para su uso en la prevención, el tratamiento o la mejora de una enfermedad seleccionada de una enfermedad proliferativa o una enfermedad tumoral. La descripción también proporciona un kit que comprende un heterodímero de proteínas de fusión de la invención, una molécula de ácido nucleico como se ha descrito anteriormente, un vector como se ha descrito anteriormente, o una célula hospedadora como se ha descrito anteriormente.

[0075] El heterodímero de las proteínas de fusión de la presente invención es preferiblemente una proteína de fusión "aislada".

[0076] "Aislada", cuando se usa para describir la proteína de fusión divulgada en el presente documento, significa una proteína de fusión que se ha identificado, separado y/o recuperado de un componente de su entorno de producción. Preferiblemente, la proteína de fusión aislada está libre de asociación con todos los demás componentes de su entorno de producción. Los componentes contaminantes de su entorno de producción, tales como el resultante de células transfectadas recombinantes, son materiales que interferirían típicamente con usos diagnósticos o terapéuticos para el polipéptido, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En formas de realización preferidas, la proteína de fusión se purificará (1) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de la secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de vaso giratorio, o (2) hasta la homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras usando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción con plata. Normalmente, sin embargo, se preparará un anticuerpo aislado mediante al menos un paso de purificación. Un experto entenderá que el heterodímero de las proteínas de fusión de la invención no se produce como tal en la naturaleza. Se ha producido mediante técnicas de biología molecular recombinante.

[0077] En el contexto de la invención, una proteína está representada por una secuencia de aminoácidos. En el contexto de esta invención, una proteína preferida es una proteína de fusión como se identifica en el presente documento o una cadena de la misma.

[0078] En el contexto de la invención, una molécula de ácido nucleico como una molécula de ácido nucleico que codifica tal proteína o proteína de fusión o una cadena de la misma está representada por una secuencia de ácido nucleico o nucleótidos. Una molécula de ácido nucleico puede comprender una región reguladora. Debe entenderse que cada proteína identificada en el presente documento por un número de identidad de secuencia (SEQ ID N.º) dado no se limita a esta secuencia específica como se divulga, sino que también abarca proteínas variantes o derivadas de estas que muestren una actividad similar a la definida anteriormente en el presente documento. Lo mismo ocurre para cada molécula de ácido nucleico identificada por una SEQ ID N.º: X dada (por ejemplo) y que codifica dicha proteína: la invención también abarca moléculas de ácido nucleico variantes o derivados de estas que codifiquen una proteína que tiene una actividad similar a la de la proteína inicialmente codificada por la SEQ ID N.º: X. En este contexto, una actividad puede ser la unión de la proteína de fusión a 5T4 y/o la muerte inducida de células que expresan 5T4, preferiblemente células tumorales. Más preferiblemente, la evaluación de la unión y/o la muerte inducida es como se lleva a cabo en los experimentos representados en la figura 8.

[0079] A lo largo de esta solicitud, cada vez que se hace referencia a una secuencia de nucleótidos específica SEQ ID N.º (tomando como ejemplo la SEQ ID N.º: X) que codifica una proteína o proteína de fusión dada o una cadena de la misma, se puede reemplazar por: una secuencia de nucleótidos cuya secuencia difiere de dicha secuencia debido a la degeneración del código genético.

[0080] Cada secuencia de nucleótidos o secuencia de aminoácidos descrita en el presente documento en virtud de su porcentaje de identidad o similitud (al menos el 60 %) con una secuencia de nucleótidos o secuencia de aminoácidos dada tiene respectivamente, en un aspecto adicional de la divulgación, una identidad o similitud de al menos el 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad o similitud con la secuencia de nucleótidos o aminoácidos dada respectivamente. En un aspecto preferido, la identidad o similitud de secuencia se determina comparando la longitud completa de las secuencias identificadas en el presente documento. A menos que se indique lo contrario en el presente documento, identidad o similitud con una SEQ ID N.º dada significa identidad o similitud basada en la longitud completa de dicha secuencia (es decir, en toda su longitud o en su totalidad).

[0081] La "identidad de secuencia" se define en el presente documento como una relación entre dos o más secuencias de aminoácidos (polipéptido o proteína) o dos o más secuencias de ácidos nucleicos (polinucleótidos), según se determina por comparación de las secuencias. En un aspecto preferido, la identidad de secuencia se calcula basándose en la longitud completa de dos SEQ ID N.º dadas o en parte de estas. Parte de estas significa preferiblemente al menos el 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % de ambas SEQ ID N.º En la técnica, "identidad" también significa el grado de relación de secuencia entre secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos, según sea el caso, según se determine por la coincidencia entre cadenas de tales secuencias.

[0082] La "similitud" entre dos secuencias de aminoácidos se determina comparando la secuencia de aminoácidos y sus sustitutos de aminoácidos conservados de un polipéptido con la secuencia de un segundo polipéptido. La "identidad" y la "similitud" se pueden calcular fácilmente mediante métodos conocidos, incluyendo, pero sin limitarse a, los descritos en (Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Parte I, Griffin, A. M., y Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heine, G., Academic Press, 1987; y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, Nueva York, 1991; y Carillo, H., y Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48:1073 (1988).

[0083] Los métodos preferidos para determinar la identidad están diseñados para dar la mayor coincidencia entre las secuencias analizadas. Los métodos para determinar la identidad y similitud se codifican en programas informáticos disponibles para el público. Los métodos de programas informáticos preferidos para determinar la identidad y similitud entre dos secuencias incluyen, por ejemplo, el paquete de programa GCG (Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research 12 (1): 387 (1984) BestFit, BLASTP, BLASTN y FASTA (Altschul, S. F. et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990) El programa BLAST X está disponible para el público en NCBI y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul, S., et al., NCBI NLM NIH Bethesda, MD 20894; Altschul, S., et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990). El conocido algoritmo de Smith Waterman también puede usarse para determinar la identidad.

[0084] Los parámetros preferidos para la comparación de secuencias polipeptídicas incluyen los siguientes: Algoritmo: Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443-453 (1970); Matriz de comparación: BLOSSUM62 de Hentikoff y Hentikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89: 10915-10919 (1992); Penalización por hueco: 12; y Penalización por longitud de hueco: 4. Un programa útil con estos parámetros está disponible para el público como el programa "Ogap" de Genetics Computer Group, localizado en Madison, WI. Los parámetros mencionados anteriormente son los parámetros por defecto para comparaciones de aminoácidos (junto con ninguna penalización para huecos finales).

[0085] Los parámetros preferidos para la comparación de ácidos nucleicos incluyen los siguientes: Algoritmo: Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443-453 (1970); Matriz de comparación: coincidencias = +10, no coincidencia = 0; penalización por hueco: 50; penalización por longitud de hueco: 3. Disponibles como el programa Gap de Genetics Computer Group, localizado en Madison, WI. Antes se han dado parámetros por defecto para comparaciones de ácidos nucleicos.

[0086] Opcionalmente, al determinar el grado de similitud de aminoácidos, el experto en la materia también puede tener en cuenta las denominadas sustituciones de aminoácidos "conservadoras", como resultará evidente para el experto en la materia. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos se refieren a la intercambiabilidad de residuos que tienen cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas es glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas-hidroxilo es serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen amida es asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas es fenilalanina, tirosina y triptófano; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas es lisina, arginina e histidina; y un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre es cisteína y metionina. Los grupos de sustituciones de aminoácidos conservadoras preferidos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina y asparagina-glutamina. Las variantes sustitucionales de la secuencia de aminoácidos divulgada en el presente documento son aquellas en las que se ha eliminado al menos un residuo en las secuencias divulgadas y se ha insertado un residuo diferente en su lugar. Preferiblemente, el cambio de aminoácido es conservador. Las sustituciones conservadoras preferidas para cada

uno de los aminoácidos naturales son las siguientes: Ala a Ser; Arg a Lys; Asn a Gln o His; Asp a Glu; Cys a Ser o Ala; Gln a Asn; Glu a Asp; Gly a Pro; His a Asn o Gln; Ile a Leu o Val; Leu a Ile o Val; Lys a Arg; Gln o Glu; Met a Leu o Ile; Phe a Met, Leu o Tyr; Ser a Thr; Thr a Ser; Trp a Tyr; Tyr a Trp o Phe; y, Val a Ile o Leu.

[0087] A continuación, se describen varios tipos de variantes de proteínas de fusión abarcadas. Se contemplan modificaciones de la secuencia de aminoácidos de las proteínas de fusión descritas en el presente documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de secuencia de aminoácidos de las proteínas de fusión se preparan introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ácido nucleico de las proteínas de fusión, o mediante síntesis de péptidos.

[0088] Tales modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones de, y/o inserciones en, y/o sustituciones de, residuos dentro de las secuencias de aminoácidos de las proteínas de fusión. Se hace cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas. Los cambios de aminoácidos también pueden alterar los procesos post-traduccionales de las proteínas de fusión, tales como cambiar el número o posición de los sitios de glicosilación. Preferiblemente, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos pueden estar sustituidos en una CDR, mientras que 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o 25 aminoácidos pueden estar sustituidos en las FR. Las sustituciones son preferiblemente sustituciones conservadoras como se describe en el presente documento. Adicional o alternativamente, 1, 2, 3, 4, 5 o 6 aminoácidos pueden insertarse o eliminarse en cada una de las CDR (por supuesto, dependiendo de su longitud), mientras que 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o 25 aminoácidos pueden insertarse o eliminarse en cada una de las FR.

[0089] Un método útil para la identificación de ciertos restos o regiones de las proteínas de fusión que son localizaciones preferidas para la mutagénesis se denomina "mutagénesis de barrido de alanina" como se describe por Cunningham y Wells in Science, 244: 1081-1085 (1989). En él, se identifica(n) un residuo o grupo de residuos diana dentro de la proteína de fusión (por ejemplo, residuos cargados tales como arg, asp, his, lys, y glu) y se reemplaza(n) por un aminoácido neutro o cargado negativamente (de la manera más preferible, alanina o polialanina) para modificar la interacción de los aminoácidos con el epítipo.

[0090] Las localizaciones de aminoácidos que muestran sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan entonces introduciendo variantes adicionales u otras en, o para, los sitios de sustitución. Por lo tanto, mientras que el sitio para introducir una variación de secuencia de aminoácidos está predeterminado, no es necesario que la naturaleza de la mutación per se esté predeterminada. Por ejemplo, para analizar el rendimiento de una mutación en un sitio dado, se realiza un barrido de alanina o mutagénesis aleatoria en un codón o región diana y las variantes de proteína de fusión expresadas se criban para detectar la actividad deseada.

[0091] Preferiblemente, las inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones amino y/o carboxilo terminales que varían en longitud desde uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez residuos hasta polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como inserciones intrasecuencia de uno o múltiples residuos de aminoácidos. Una variante insercional de la proteína de fusión incluye la fusión al extremo N o C del anticuerpo a una enzima o una fusión a un polipéptido que aumenta la semivida en suero del anticuerpo.

[0092] Otro tipo de variante es una variante de sustitución de aminoácidos. Estas variantes tienen preferiblemente al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez residuos de aminoácidos en la proteína de fusión reemplazados por un residuo diferente. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis por sustitución incluyen las CDR de la cadena pesada y/o ligera, en particular las regiones hipervariables, pero también se contemplan alteraciones de FR en la cadena pesada y/o ligera.

[0093] Por ejemplo, si una secuencia de CDR abarca 6 aminoácidos, se prevé que uno, dos o tres de estos aminoácidos estén sustituidos. De manera similar, si una secuencia de CDR abarca 15 aminoácidos, se prevé que uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis de estos aminoácidos estén sustituidos.

[0094] Por lo general, si los aminoácidos están sustituidos en una o más o todas las CDR de la cadena pesada y/o ligera, se prefiere que la secuencia "sustituida" obtenida después sea al menos el 60 %, más preferiblemente el 65 %, incluso más preferiblemente el 70 %, particularmente preferible el 75 %, más particularmente preferible el 80 % idéntica a la secuencia de CDR "original" como se ha definido anteriormente en el presente documento. Esto significa que depende de la longitud de la CDR en qué grado es idéntica a la secuencia "sustituida". Por ejemplo, una CDR que tiene 5 aminoácidos es preferiblemente idéntica en un 80 % a su secuencia sustituida con el fin de tener al menos un aminoácido sustituido. Por consiguiente, las CDR de la proteína de fusión pueden tener diferentes grados de identidad con sus secuencias sustituidas, por ejemplo, CDRL1 puede tener el 80 %, mientras que CDRL3 puede tener el 90 %. Las sustituciones (o reemplazos) preferidas son sustituciones conservadoras. Sin embargo, se prevé cualquier sustitución (incluyendo sustituciones no conservadoras) siempre que la proteína de fusión conserve su capacidad para unirse a 5T4 a través del primer dominio de unión y a CD3 a través del segundo dominio de unión y/o sus CDR tengan una identidad con la secuencia entonces sustituida (al menos el 60 %, más preferiblemente el 65 %, incluso más preferiblemente el 70 %, particularmente preferible el 75 %, más particularmente preferible el 80 % idéntica a la secuencia de CDR "original").

[0095] Otras modificaciones de la proteína de fusión se contemplan en el presente documento. Por ejemplo, la proteína de fusión puede estar unida a uno de una variedad de polímeros no proteináceos, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol, polioxialquilenos o copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol. La proteína de fusión también puede estar atrapada en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial (por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli(metilmetakrilato), respectivamente), en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas), o en macroemulsiones. Tales técnicas se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16a edición, Oslo, A., Ed., (1980). Las proteínas de fusión descritas en el presente documento también pueden formularse como inmunoliposomas. Un "liposoma" es una pequeña vesícula compuesta de diversos tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensioactivos que es útil para la administración de un fármaco a un mamífero. Los componentes del liposoma se disponen comúnmente en una formación bicapa, similar a la disposición lipídica de las membranas biológicas. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan mediante métodos conocidos en la técnica, tales como los descritos en Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); las patentes de EE. UU. n.º 4, 485, 045 y 4,544, 545; y WO97/38731, publicada el 23 de octubre de 1997. Los liposomas con un tiempo de circulación mejorado se describen en la patente de EE. UU. n.º 5,013, 556. Pueden generarse liposomas particularmente útiles mediante el método de evaporación en fase inversa con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado. Los fragmentos Fab' del anticuerpo de la presente invención pueden conjugarse con los liposomas como se describe en Martin et al. J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982) a través de una reacción de intercambio de disulfuro. Opcionalmente, un agente quimioterapéutico está contenido dentro del liposoma. Véase W. Chem Gabizon et al. J. National Cancer Inst. 81 (19) 1484 (1989).

[0096] Cuando se usan técnicas recombinantes, la proteína de fusión puede producirse intracelularmente, en el espacio periplásmico, o secretarse directamente en el medio. Si la proteína de fusión se produce intracelularmente, como un primer paso, los residuos particulados, ya sean células hospedadoras o fragmentos lisados, se eliminan, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Carter et al., Bio/Technology 10: 163-167 (1992) describen un procedimiento para aislar anticuerpos que se secretan al espacio periplásmico de *E. coli*.

[0097] La composición de proteínas de fusión preparada a partir de las células puede purificarse usando, por ejemplo, cromatografía de hidroxipatita, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad la técnica de purificación preferida.

[0098] En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una secuencia de ácido nucleico que codifica un heterodímero de proteínas de fusión de la invención. Dicha molécula de ácido nucleico está comprendida preferiblemente en un vector que está comprendido preferiblemente en una célula hospedadora. Dicha célula hospedadora es capaz, por ejemplo, después de la transformación o transfección con la secuencia de ácido nucleico de la invención, de expresar el heterodímero de proteínas de fusión.

[0099] Para ese fin, la molécula de ácido nucleico está unida operativamente con secuencias de control.

[0100] Tal como se usa en el presente documento, el término "célula hospedadora" pretende referirse a una célula en la que se introduce un ácido nucleico que codifica la proteína de fusión de la invención mediante transformación, transfección y similares. Debe entenderse que dichos términos se refieren no solo a la célula diana particular, sino a la progenie o posible progenie de dicha célula. Debido a que pueden producirse ciertas modificaciones en generaciones sucesivas debido a mutaciones o influencias ambientales, dicha progenie puede no ser, de hecho, idéntica a la célula parental, pero aun así se incluye dentro del alcance del término tal como se usa en el presente documento.

[0101] Como se usa en el presente documento, el término "expresión" incluye cualquier paso implicado en la producción de una proteína de fusión de la invención que incluye, pero no se limita a, transcripción, modificación post-transcripcional, traducción, modificación post-traducciona, y secreción.

[0102] El término "secuencias de control" se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante unida operativamente en un organismo hospedador particular. Las secuencias de control que son adecuadas para procariotas, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, y un sitio de unión al ribosoma. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.

[0103] El ácido nucleico está "unido operativamente" cuando se sitúa en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o líder secretora está unido operativamente al ADN para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está unido operativamente a una secuencia codificante si afecta a la

transcripción de la secuencia; o un sitio de unión al ribosoma está unido operativamente a una secuencia codificante si está colocado de manera que facilite la traducción. Por lo general, "unido operativamente" significa que las secuencias de ADN que se unen son contiguas y, en el caso de una líder secretora, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que ser contiguos. La unión se realiza mediante ligación en sitios de restricción convenientes. Si tales sitios no existen, los adaptadores o porciones conectoras de oligonucleótidos sintéticos se usan de acuerdo con la práctica convencional. Las células hospedadoras adecuadas incluyen células hospedadoras procariotas y eucariotas que incluyen levaduras, hongos, células de insecto y células de mamífero. La proteína de fusión de la descripción puede producirse en bacterias.

[0104] Después de la expresión, la proteína de fusión de la divulgación, preferiblemente la proteína de fusión, se aísla de la pasta celular de *E. coli* en una fracción soluble y se puede purificar, por ejemplo, mediante cromatografía de afinidad y/o exclusión por tamaño. La purificación final se puede llevar a cabo de manera similar al procedimiento para purificar el anticuerpo expresado, por ejemplo, en células CHO. Además de procariotas, los microbios eucariotas tales como hongos filamentosos o levaduras son hospedadores de clonación o expresión adecuados para la proteína de fusión de la invención. *Saccharomyces cerevisiae*, o levadura de panadería común, es la de mayor uso entre microorganismos hospedadores eucariotas inferiores. Sin embargo, un número de otros géneros, especies y cepas están disponibles y son útiles en el presente documento, tales como *Schizosaccharomyces pombe*; hospedadores de *Kluyveromyces* tales como, por ejemplo, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12424), *K. bulgaricus* (ATCC 16045), *K. wickerhamii* (ATCC 24178), *K. waltii* (ATCC 56500), *K. drosophilae* (ATCC 36906), *K. thermotolerans* y *K. marxianus*; *Yarrowia* (EP 402 226); *Pichia pastoris* (EP 183 070); *Candida*; *Trichoderma reesei* (EP 244 234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* como *Schwanniomyces occidentalis*; y hongos filamentosos tales como, por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* y hospedadores de *Aspergillus* tales como *A. nidulans* y *A. niger*.

[0105] Las células hospedadoras adecuadas para la expresión de heterodímero glicosilado de proteínas de fusión de la invención, preferiblemente proteínas de fusión derivadas de anticuerpos, derivan de organismos multicelulares. Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células vegetales y de insectos. Se han identificado numerosas cepas y variantes de baculovirus y las correspondientes células hospedadoras permisivas de insectos procedentes de hospedadores tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y *Bombyx mori*. Una variedad de cepas virales para la transfección están disponibles para el público, por ejemplo, la variante L-1 de *Autographa californica* NPV y la cepa Bm-5 de *Bombyx mori* NPV, y tales virus pueden usarse como el virus en el presente documento según la presente divulgación, particularmente para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

[0106] También pueden utilizarse como hospedadores cultivos de células vegetales de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate, *Arabidopsis* y tabaco. Los vectores de clonación y expresión útiles en la producción de proteínas en cultivo de células vegetales son conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Hiatt et al., *Nature* (1989) 342: 76-78, Owen et al. (1992) *Bio/Technology* 10: 790-794, Artesaenko et al. (1995) *The Plant J* 8: 745-750 y Fecker et al. (1996) *Plant Mol Biol* 32: 979-986.

[0107] Sin embargo, el interés ha sido mayor para las células de vertebrados, y la propagación de células de vertebrados en cultivo (cultivo de tejidos) se ha convertido en un procedimiento rutinario. Ejemplos de líneas celulares hospedadoras de mamíferos útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); la línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293 subclonadas para su crecimiento en cultivo en suspensión, Graham et al., *J. Gen Virol.* 36: 59 (1977); células renales de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células ováricas de hámster chino-DHFR (CHO, Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4216 (1980); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23: 243-251 (1980); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, 1413 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL5 1); células TRI (Mather et al., *Annals N. Y Acad. Sci.* 383: 44-68 (1982); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2). Cuando se usan técnicas recombinantes, el heterodímero de proteínas de fusión de la invención puede producirse intracelularmente, en el espacio periplasmático, o secretarse directamente en el medio. Si el heterodímero de las proteínas de fusión se produce intracelularmente, como un primer paso, los restos particulados, ya sean células hospedadoras o fragmentos lisados, se eliminan, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Carter et al., *Bio/Technology* 10: 163-167 (1992) describen un procedimiento para aislar anticuerpos que se secretan al espacio periplasmático de *E. coli*. En resumen, la pasta celular se descongela en presencia de acetato sódico (pH 3,5), EDTA y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) durante aproximadamente 30 minutos. Los restos celulares pueden eliminarse por centrifugación. Cuando el anticuerpo se secreta en el medio, los sobrenadantes de tales sistemas de expresión generalmente se concentran primero usando un filtro de concentración de proteínas disponible en el mercado, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Un inhibidor de proteasas tal como PMSF puede incluirse en cualquiera de los pasos anteriores para inhibir la proteólisis y pueden incluirse antibióticos para evitar el crecimiento de contaminantes adventicios.

[0108] El heterodímero de las proteínas de fusión de la invención preparado a partir de las células hospedadoras puede purificarse utilizando, por ejemplo, cromatografía de hidroxipatita, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad la técnica de purificación preferida. La matriz a la que se une el ligando de afinidad suele ser agarosa, pero están disponibles otras matrices. Las matrices mecánicamente estables, tales como vidrio de poro controlado o poli(estirenodivinil)benceno, permiten velocidades de flujo más rápidas y tiempos de procesamiento más cortos que los que se pueden lograr con agarosa. Cuando el heterodímero de las proteínas de fusión de la invención comprende un dominio CH3, la resina Bakerbond ABXM (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) es útil para la purificación. Otras técnicas para la purificación de proteínas, tales como fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía en sílice, cromatografía en Heparin Sepharose™, cromatografía en una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatografía en SDS-PAGE y precipitación con sulfato de amonio también están disponibles dependiendo del anticuerpo que vaya a recuperarse. En otro aspecto, se proporcionan procedimientos para producir un heterodímero de proteínas de fusión de la invención, comprendiendo dichos procedimientos cultivar una célula hospedadora definida en el presente documento en condiciones que permitan la expresión de las proteínas de fusión y recuperar el heterodímero producido de proteínas de fusión del cultivo. En una forma de realización alternativa, se proporcionan composiciones que comprenden un heterodímero de proteínas de fusión de la invención, o producidas de acuerdo con el procedimiento de la invención. Preferiblemente, dicha composición es una composición farmacéutica.

[0109] Como se usa en el presente documento, el término "composición farmacéutica" se refiere a una composición para la administración a un paciente, preferiblemente a un paciente humano. La composición farmacéutica de esta invención comprende el heterodímero de proteínas de fusión de la invención. Preferiblemente, la composición farmacéutica comprende formulaciones adecuadas de vehículos, estabilizantes y/o excipientes. En una forma de realización preferida, la composición farmacéutica comprende una composición para la administración parenteral, transdérmica, intraluminal, intraarterial, intratecal y/o intranasal o mediante inyección directa en el tejido. Se prevé en particular que dicha composición se administre a un paciente mediante infusión o inyección. La administración de las composiciones adecuadas puede efectuarse por diferentes vías, por ejemplo, por administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, tópica o intradérmica. En particular, la presente invención proporciona una administración ininterrumpida de la composición adecuada. Como ejemplo no limitativo, la administración ininterrumpida, es decir, continua, puede realizarse mediante un pequeño sistema de bomba que lleva el paciente para medir el flujo de entrada de agente terapéutico en el cuerpo del paciente. La composición farmacéutica que comprende el heterodímero de proteínas de fusión de la invención puede administrarse usando dichos sistemas de bomba. Tales sistemas de bomba son generalmente conocidos en la técnica, y suelen depender del cambio periódico de cartuchos que contienen el agente terapéutico que se ha de infundir. Al cambiar el cartucho en un sistema de bomba de este tipo, puede producirse una interrupción temporal del flujo de agente terapéutico que, por lo demás, no se interrumpe, al cuerpo del paciente. En tal caso, la fase de administración antes del reemplazo del cartucho y la fase de administración después del reemplazo del cartucho aún se considerarían dentro del significado de los medios y métodos farmacéuticos de la invención y, juntas, constituyen una "administración ininterrumpida" de tal agente terapéutico.

[0110] La administración continua o ininterrumpida de estas proteínas de fusión de la invención puede ser intravenosa o subcutánea por medio de un dispositivo de suministro de fluido o un sistema de bomba pequeña que incluye un mecanismo de impulso de fluido para impulsar el fluido fuera de un depósito y un mecanismo de accionamiento para accionar el mecanismo de impulso. Los sistemas de bomba para administración subcutánea pueden incluir una aguja o una cánula para penetrar la piel de un paciente y administrar la composición adecuada al cuerpo del paciente. Dichos sistemas de bomba pueden estar directamente fijados o unidos a la piel del paciente independientemente de una vena, arteria o vaso sanguíneo, permitiendo de este modo un contacto directo entre el sistema de bomba y la piel del paciente. El sistema de bomba puede fijarse a la piel del paciente durante desde 24 horas hasta varios días. El sistema de bomba puede ser de tamaño pequeño con un depósito para pequeños volúmenes. Como ejemplo no limitativo, el volumen del depósito para la composición farmacéutica adecuada que se va a administrar puede estar entre 0,1 y 50 ml.

[0111] La administración continua puede ser transdérmica por medio de un parche que se lleva sobre la piel y se reemplaza a intervalos. Un experto en la técnica conoce los sistemas de parche para la administración de fármacos adecuados para este propósito. Cabe destacar que la administración transdérmica es especialmente adecuada para la administración ininterrumpida, ya que el cambio de un primer parche agotado puede hacerse ventajosamente de manera simultánea con la colocación de un nuevo segundo parche, por ejemplo, en la superficie de la piel inmediatamente adyacente al primer parche agotado e inmediatamente antes de la retirada del primer parche agotado. No surgen problemas de interrupción de flujo o fallo de la batería.

[0112] Las composiciones de la invención pueden comprender además un vehículo aceptable desde el punto de vista farmacéutico. Los ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados son ampliamente conocidos en la técnica e incluyen soluciones, por ejemplo, soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones de aceite/agua, diversos tipos de agentes humectantes, soluciones estériles, liposomas, etc.

Las composiciones que comprenden tales vehículos pueden formularse mediante métodos convencionales ampliamente conocidos. Las formulaciones pueden comprender carbohidratos, soluciones tampón, aminoácidos y/o tensioactivos. Los carbohidratos pueden ser azúcares no reductores, preferiblemente trehalosa, sacarosa, octasulfato, sorbitol o xilitol. En general, como se usa en el presente documento, "vehículo aceptable desde el punto de vista farmacéutico" significa cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción compatibles con la administración farmacéutica. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es ampliamente conocido en la técnica. Los vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas e incluyen: agentes tamponantes adicionales; conservantes; codisolventes; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico y metionina; agentes quelantes tales como EDTA; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); polímeros biodegradables, tales como poliésteres; contraiones formadores de sales, tales como sodio, alcoholes de azúcar polihidroxilados; aminoácidos, tales como alanina, glicina, asparagina, 2-fenilalanina y treonina; azúcares o alcoholes de azúcar, tales como trehalosa, sacarosa, octasulfato, sorbitol o xilitol, estaquiosa, manosa, sorbosa, xilosa, ribosa, mioinositosa, galactosa, lactitol, ribitol, mioinisol, galactitol, glicerol, ciclitos (por ejemplo, inositol), polietilenglicol; agentes reductores que contienen azufre, tales como glutatión, ácido tióctico, tioglicolato de sodio, tioglicerol, [alfa]-monotioglicerol y tiosulfato de sodio; proteínas de bajo peso molecular, tales como albúmina de suero humano, albúmina de suero bovino, gelatina u otras inmunoglobulinas; y polímeros hidrófilos, tales como polivinilpirrolidona. Tales formulaciones pueden usarse para administraciones continuas que pueden ser intravenosas o subcutáneas con y/o sin sistemas de bomba. Los aminoácidos pueden ser aminoácidos cargados, preferiblemente lisina, acetato de lisina, arginina, glutamato y/o histidina. Los tensioactivos pueden ser detergentes, preferiblemente con un peso molecular de >1,2 KD y/o un poliéter, preferiblemente con un peso molecular de >3 KD. Los ejemplos no limitantes de detergentes preferidos son Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80 o Tween 85. Los ejemplos no limitantes de poliéteres preferidos son PEG 3000, PEG 3350, PEG 4000 o PEG 5000. Los sistemas de tampón usados en la presente invención pueden tener un pH preferido de 5-9 y pueden comprender citrato, succinato, fosfato, histidina y acetato. Las composiciones de la presente invención pueden administrarse al sujeto a una dosis adecuada que puede determinarse, por ejemplo, mediante estudios de aumento de dosis mediante la administración de dosis crecientes del polipéptido de la invención que presenta especificidad entre especies descrito en el presente documento a primates que no sean chimpancés, por ejemplo, macacos. Como se ha expuesto anteriormente, el heterodímero de proteínas de fusión de la invención que presenta especificidad entre especies descrito en el presente documento puede usarse ventajosamente en forma idéntica en pruebas preclínicas en primates que no sean chimpancés y como fármaco en seres humanos. Estas composiciones también se pueden administrar en combinación con otros fármacos proteicos y no proteicos. Estos fármacos pueden administrarse simultáneamente con la composición que comprende el heterodímero de proteínas de fusión de la invención tal como se define en el presente documento o por separado antes o después de la administración de dicho polipéptido en intervalos y dosis definidos. La pauta posológica la determinará el médico responsable del tratamiento y los factores clínicos. Como es ampliamente conocido en las técnicas médicas, las dosis para cualquier paciente dependen de muchos factores, incluyendo el tamaño del paciente, el área de superficie corporal, la edad, el compuesto particular que se va a administrar, el sexo, el tiempo y la vía de administración, la salud general y otros fármacos que se administren simultáneamente.

[0113] Las preparaciones para la administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones estériles acuosas o no acuosas. Algunos ejemplos de disolventes no acuosos son el propilenglicol, el polietilenglicol, los aceites vegetales tales como el aceite de oliva y los ésteres orgánicos inyectables tales como el etiloleato. Los vehículos acuosos incluyen agua, soluciones alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, incluyendo solución salina y medios tamponados. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro sódico, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico, lactato de Ringer o aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen reponedores de fluidos y nutrientes, reponedores de electrolitos (tales como los basados en dextrosa de Ringer) y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, agentes antimicrobianos, antioxidantes, quelantes, gases inertes y similares. Además, la composición de la presente invención podría comprender vehículos proteicos, como, por ejemplo, albúmina de suero o inmunoglobulina, preferiblemente de origen humano. Se prevé que la composición de la invención podría comprender, además del heterodímero de proteínas de fusión de la invención definido en el presente documento, agentes biológicamente activos adicionales, dependiendo del uso previsto de la composición. Tales agentes podrían ser fármacos que actúan sobre el sistema gastrointestinal, fármacos que actúan como citostáticos, fármacos que previenen la hiperuricemia, fármacos que inhiben las reacciones inmunológicas (por ejemplo, corticosteroides), fármacos que modulan la respuesta inflamatoria, fármacos que actúan sobre el sistema circulatorio y/o agentes tales como citocinas conocidas en la técnica. También se prevé que el heterodímero de proteínas de fusión de la presente invención se aplique en una coterapia, es decir, en combinación con otro medicamento anticanceroso.

[0114] La actividad biológica de la composición farmacéutica definida en el presente documento puede determinarse, por ejemplo, mediante ensayos de citotoxicidad, como se describe en los siguientes ejemplos, en: WO 99/54440 o por Schlereth et al. (Cancer Immunol. Immunoter. 20 (2005), 1 - 12). La "eficacia" o "eficacia *in vivo*", como se usa en el presente documento, se refiere a la respuesta a la terapia mediante la composición farmacéutica de la invención, usando, por ejemplo, los criterios estandarizados de respuesta del NCI. El éxito o la

eficacia *in vivo* de la terapia usando una composición farmacéutica de la invención se refiere a la eficacia de la composición para su fin previsto, es decir, la capacidad de la composición para provocar su efecto deseado, es decir, el agotamiento de células patológicas, por ejemplo, células tumorales. La eficacia *in vivo* puede monitorizarse mediante métodos convencionales establecidos para las respectivas entidades patológicas, que incluyen, pero no se limitan a recuentos de glóbulos blancos, diferenciales, clasificación de células activadas por fluorescencia, aspiración de médula ósea. Además, pueden usarse diversos parámetros químicos clínicos específicos de la enfermedad y otros métodos convencionales establecidos. Además, se puede utilizar tomografía asistida por ordenador, rayos X, tomografía de resonancia magnética nuclear (por ejemplo, para la evaluación de la respuesta basada en criterios del National Cancer Institute (NCI) [Cheson BD, Horning SJ, Coiffier B, Shipp MA, Fisher RI, Connors JM, Lister TA, Vose J, Grillo-Lopez A, Hagenbeek A, Cabanillas F, Klippenstein D, Hiddemann W, Castellino R, Harris NL, Armitage JO, Carter W, Hoppe R, Canellos GP. Report of an international workshop to standardize response criteria for non-Hodgkin's lymphomas. NCI Sponsored International Working Group. J Clin Oncol. 1999 Apr; 17(4): 1244]), exploración por tomografía por emisión de positrones, recuentos de glóbulos blancos, diferenciales, clasificación de células activadas por fluorescencia, aspiración de médula ósea, biopsias/histologías de ganglios linfáticos y diversos parámetros químicos clínicos específicos del linfoma (por ejemplo, lactato deshidrogenasa) y otros métodos convencionales.

[0115] Otro reto importante en el desarrollo de fármacos tales como la composición farmacéutica de la invención es la modulación predecible de las propiedades farmacocinéticas. Con este fin, se puede establecer un perfil farmacocinético del fármaco candidato, es decir, un perfil de los parámetros farmacocinéticos que afectan a la capacidad de un fármaco particular para tratar una afección dada. Los parámetros farmacocinéticos del fármaco que influyen en la capacidad de un fármaco para tratar una cierta entidad patológica incluyen, pero no se limitan a: semivida, volumen de distribución, metabolismo hepático de primer paso y el grado de unión al suero sanguíneo. La eficacia de un agente farmacológico dado puede verse influenciada por cada uno de los parámetros mencionados anteriormente.

[0116] "Tmax" es el tiempo tras el cual se alcanza la concentración máxima en sangre del fármaco, y "Cmax" es la concentración máxima en sangre obtenida con un fármaco dado. El tiempo necesario para alcanzar una concentración en sangre o tejido del fármaco para su efecto biológico está influenciado por todos los parámetros. Los parámetros farmacocinéticos de anticuerpos monocatenarios biespecíficos que presentan especificidad entre especies, que pueden determinarse en pruebas preclínicas con animales en primates que no sean chimpancés, como se ha indicado anteriormente, también se exponen, por ejemplo, en la publicación de Schlereth et al. (Cancer Immunol. Immunoter. 20 (2005), 1 - 12).

[0117] El término "toxicidad", como se usa en el presente documento, se refiere a los efectos tóxicos de un fármaco manifestados en acontecimientos adversos o acontecimientos adversos graves. Estos acontecimientos secundarios podrían referirse a una falta de tolerabilidad del fármaco en general y/o una falta de tolerancia local después de la administración. La toxicidad también podría incluir efectos teratogénos o cancerígenos causados por el fármaco.

[0118] El término "seguridad", "seguridad *in vivo*" o "tolerabilidad", como se usa en el presente documento, define la administración de un fármaco sin inducir acontecimientos adversos graves directamente después de la administración (tolerancia local) y durante un periodo más largo de aplicación del fármaco. La "seguridad", la "seguridad *in vivo*" o la "tolerabilidad" se pueden evaluar, por ejemplo, a intervalos regulares durante el tratamiento y el periodo de seguimiento. Las mediciones incluyen la evaluación clínica, por ejemplo, manifestaciones en órganos, y el cribado de anomalías de laboratorio. La evaluación clínica puede llevarse a cabo y se pueden registrar/codificar las desviaciones de los hallazgos normales de acuerdo con los estándares NCI-CTC y/o MedDRA. Las manifestaciones en órganos pueden incluir criterios tales como alergia/inmunología, sangre/médula ósea, arritmia cardíaca, coagulación y similares, como se expone, por ejemplo, en los criterios de terminología común para eventos adversos v3.0 del NCI (Common Terminology Criteria for adverse events v3.0 o CTCAE). Los parámetros de laboratorio que pueden analizarse incluyen, por ejemplo, hematología, química clínica, perfil de coagulación y análisis de orina y examen de otros fluidos corporales tales como suero, plasma, fluido linfático o espinal, líquido cefalorraquídeo y similares. Por lo tanto, la seguridad puede evaluarse, por ejemplo, mediante examen físico, técnicas de obtención de imágenes (a saber, ultrasonidos, rayos X, exploraciones por TC, obtención de imágenes por resonancia magnética (IRM), otras mediciones con dispositivos técnicos (a saber, electrocardiograma), constantes vitales, medición de parámetros de laboratorio y registro de eventos adversos. Por ejemplo, los acontecimientos adversos en primates que no sean chimpancés en los usos y métodos según la invención pueden examinarse mediante métodos histopatológicos y/o histoquímicos.

[0119] El término "dosis eficaz" o "pauta posológica eficaz" se define como una cantidad suficiente para lograr, o al menos lograr parcialmente, el efecto deseado. El término "dosis terapéuticamente eficaz" se define como una cantidad suficiente para curar o al menos detener parcialmente la enfermedad y sus complicaciones en un paciente que ya padece la enfermedad. Las cantidades eficaces para este uso dependerán de la gravedad de la infección y del estado general del propio sistema inmunitario del sujeto. El término "paciente" incluye sujetos humanos y otros mamíferos que reciben tratamiento profiláctico o terapéutico.

[0120] El término "dosis eficaz y no tóxica", como se usa en el presente documento, se refiere a una dosis tolerable de una proteína de fusión de la invención que es lo suficientemente alta como para provocar el agotamiento de células patológicas, la eliminación de tumores, la contracción de tumores o la estabilización de enfermedades sin o esencialmente sin efectos tóxicos importantes. Tales dosis eficaces y no tóxicas pueden determinarse, por ejemplo, mediante estudios de aumento de la dosis descritos en la técnica y deben estar por debajo de la dosis que induce acontecimientos secundarios adversos graves (toxicidad limitante de la dosis, TLD).

[0121] A los términos anteriores también se hace referencia, por ejemplo, en la Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals S6; ICH Harmonised Tripartite Guideline; reunión del ICH Steering Committee del 16 de julio de 1997.

[0122] La dosis apropiada, o cantidad terapéuticamente eficaz, del heterodímero de proteínas de fusión de la invención dependerá de la afección que se vaya a tratar, de la gravedad de la afección, del tratamiento previo y del historial clínico del paciente y la respuesta al agente terapéutico. La dosis apropiada puede ajustarse de acuerdo con el criterio del médico que aplica el tratamiento, de manera que pueda administrarse al paciente una vez o durante una serie de administraciones. La composición farmacéutica puede administrarse como un único agente terapéutico o en combinación con terapias adicionales tales como terapias contra el cáncer según sea necesario.

[0123] Las composiciones farmacéuticas de esta invención son particularmente útiles para la administración parenteral, es decir, por vía subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraarticular y/o intrasínovial. La administración parenteral puede ser por inyección en bolo o infusión continua. Si la composición farmacéutica se ha liofilizado, el material liofilizado se reconstituye primero en un líquido apropiado antes de la administración. El material liofilizado puede reconstituirse en, por ejemplo, agua bacteriostática para inyección (BWHI), solución salina fisiológica, solución salina tamponada con fosfato (PBS) o la misma formulación en la que había estado la proteína antes de la liofilización.

[0124] Preferiblemente, el heterodímero de proteínas de fusión de la invención o producido mediante un procedimiento de la invención es para su uso en la prevención, el tratamiento o la mejora de una enfermedad seleccionada de una enfermedad proliferativa o una enfermedad tumoral. Una forma de realización alternativa de la divulgación proporciona un método para el tratamiento o la mejora de una enfermedad seleccionada de entre una enfermedad proliferativa o una enfermedad tumoral que comprende el paso de administrar a un paciente que lo necesite el heterodímero de proteínas de fusión de la invención o producido mediante un procedimiento de la invención. Una enfermedad tumoral podría reemplazarse por un cáncer. Un cáncer preferido es un cáncer en el que el antígeno extracelular 5T4 se expresa en células tumorales. La expresión de 5T4 se podría evaluar usando análisis FACS. Un cáncer más preferido es mesotelioma, cáncer de mama, cáncer de ovario, carcinoma colorrectal, cáncer de cuello uterino, cáncer gástrico, cáncer de pulmón o cáncer de colon. Un cáncer de mama preferido es el denominado cáncer de mama triple negativo. Un cáncer de colon preferido es un cáncer de colon con mutación en KRAS.

[0125] Las formulaciones descritas en el presente documento son útiles como composiciones farmacéuticas en el tratamiento y/o la prevención de la afección médica patológica como se describe en el presente documento en un paciente que lo necesita. El término "tratamiento" se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas. El tratamiento incluye la aplicación o administración de la formulación al cuerpo, a un tejido o célula aislado/a de un paciente que tiene una enfermedad/trastorno, un síntoma de una enfermedad/trastorno o una predisposición hacia una enfermedad/trastorno, con el propósito de curar, sanar, aliviar, aliviar, alterar, remediar, mejorar o tener un efecto sobre la enfermedad, el síntoma de la enfermedad o la predisposición hacia la enfermedad.

[0126] Entre los que necesitan tratamiento se incluyen aquellos que ya padecen el trastorno, así como aquellos en los que el trastorno debe prevenirse. El término "enfermedad" es cualquier afección que se beneficiaría del tratamiento con la formulación de proteína descrita en el presente documento. Esto incluye trastornos o enfermedades crónicas y agudas, incluyendo aquellas afecciones patológicas que predisponen al mamífero a la enfermedad en cuestión. Los ejemplos no limitativos de enfermedades/trastornos que se van a tratar en el presente documento incluyen enfermedades proliferativas o una enfermedad tumoral. En otro aspecto, se proporcionan kits que comprenden un heterodímero de proteínas de fusión de la invención, una molécula de ácido nucleico de la invención, un vector de la invención o una célula hospedadora de la invención. El kit puede comprender uno o más viales que contienen el heterodímero de proteínas de fusión e instrucciones de uso. El kit puede contener también medios para administrar el heterodímero de proteínas de fusión de la presente invención tales como una jeringa, bomba, dispositivo de infusión o similares.

[0127] Debe entenderse que las invenciones en el presente documento no se limitan a metodología, protocolos o reactivos particulares, ya que tales pueden variar. La exposición y los ejemplos proporcionados en el presente

documento se presentan con el propósito de describir formas de realización particulares solamente y no pretenden limitar el alcance de la presente invención, que se define únicamente por las reivindicaciones.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0128]

FIG 1A Representa el principio preferido de fabricación de la proteína de fusión de la invención (también denominada "proteína de fusión Tribody").

A: se aíslan regiones de unión mínimas para un 5T4 y un epítipo de CD3 activador de linfocitos T, por ejemplo, derivadas del dominio V de un anticuerpo, o de otras moléculas de unión. Estos dominios de unión mínimos se formatean para funcionar tanto como extensiones N-terminales en dominios heterodimerizantes CH1:CL, y/o se formatean como un dominio variable de cadena sencilla y se extienden al extremo N-terminal de la proteína de fusión de la invención.

B: dibujo esquemático de estructuras génicas de Fab L (que comprende dominios VL y CL) y Fab Fd (que comprende cadenas VH y CH1) que, cuando se coexpresan en la misma célula, forman un heterodímero Fab.

C: dibujo esquemático de estructuras génicas de una forma de una proteína de fusión de la invención en la que dominios de unión extra en forma de dominios variables de cadena sencilla (scFv) se fusionan al extremo C de los dominios CL y CH1 mediante fusión genética de los genes codificantes a nivel de ARNm. En el ejemplo, la estructura génica se basa en una secuencia codificante continua sin intrones.

D: Modelo molecular de una proteína de fusión de la invención en representación de cinta y de espacio lleno.

E: Modelo molecular de una proteína de fusión de la invención que contiene una secuencia de porciones conectoras de 10 aminoácidos entre tanto el CH1 como su porción conectora C-terminal extendida y el CL y su porción conectora C-terminal extendida. La simulación molecular usa la máxima flexibilidad basada en una secuencia conectora SGGGSGGGSS. La representación está en espacio lleno, los dominios más oscuros son la proteína de fusión y los dominios plateados son el antígeno unido (el mismo antígeno en el modelo para los 3 restos de unión).

FIG. 1B Ilustra algunas de las diferentes variaciones en la organización de las estructuras de unión en la proteína de fusión donde las estructuras se basan en heterodímeros de la cadena Fab (VH-CH1: VLCL):

VH(5T4)-CH1-L1-VH(CD3)-L2-VL(CD3) o
VH(5T4)-CH1-L1-VL(CD3)-L2-VH(CD3)

en combinación con

VL(5T4)CL-L1-VH(5T4)-L2-VL(5T4) o
VL(5T4)CL-L1-VL(5T4)-L2-VH(5T4),

como se ilustra para 2 combinaciones posibles en los modelos (i) y (iv).

O diferentes formas de organización de

VH(5T4)-CH1-L1-VH(5T4)-L2-VL(5T4) o
VH(5T4)-CH1-L1-VL(5T4)-L2-VH(5T4)

en combinación con

VL(5T4)CL-L1-VH(CD3)-L2-VL(CD3) o
VL(5T4)CL-L1-VL(CD3)-L2-VH(CD3)

como se ilustra para 2 combinaciones posibles en los modelos (ii) y (v).

O diferentes formas de organización de

VH(CD3)-CH1-L1-VH(5T4)-L2-VL(5T4) o
VH(CD3)-CH1-L1-VL(5T4)-L2-VH(5T4)

en combinación con

VL(CD3)CL-L1-VH(5T4)-L2-VL(5T4) o
VL(CD3)CL-L1-VL(5T4)-L2-VH(5T4)

como se ilustra para 2 combinaciones posibles en los modelos (iii) y (vi).

En todas las combinaciones, el scFv también puede ser un fragmento variable de cadena sencilla estabilizado con disulfuro (dsFv).

FIG. 1C Ilustra algunas de las diferentes variaciones en la organización de las estructuras de unión en la proteína de fusión Tb-5T4 donde las estructuras se basan en heterodímeros de cadena Fab de sobrecruzamientos (cFab) (VHCL:VLCH1):

VL(5T4)-CH1-L1-VH(CD3)-L2-VL(CD3) o
VL(5T4)-CH1-L1-VL(CD3)-L2-VH(CD3)

en combinación con

VH (5T4) CL-L1-VH (5T4) -L2-VL (5T4) o
VH (5T4) CL-L1-VL (5T4) -L2-VH (5T4)

como se ilustra para 2 combinaciones posibles en (vii) y (x).

O diferentes formas de organización de

VL(5T4)-CH1-L1-VH(5T4)-L2-VL(5T4) o
VL(5T4)-CH1-L1-VL(5T4)-L2-VH(5T4)

en combinación con

VH (5T4) CL-L1-VH (CD3) -L2-VL (CD3) o
VH(5T4)CL-L1-VL(CD3)-L2-VH(CD3)

como se ilustra para 2 combinaciones posibles en (viii) y (xi).

O diferentes formas de organización de

VL(CD3)-CH1-L1-VH(5T4)-L2-VL(5T4) o
VL(CD3)-CH1-L1-VL(5T4)-L2-VH(5T4)

en combinación con

VH(CD3)CL-L1-VH(5T4)-L2-VL(5T4) o
VH(CD3)CL-L1-VL(5T4)-L2-VH(5T4)

como se ilustra para 2 combinaciones posibles en los modelos (ix) y (xii).

En todas las combinaciones, el scFv también puede ser un fragmento variable de cadena sencilla estabilizado con disulfuro (dsFv).

FIG. 1D Ilustra algunas de las diferentes variaciones en la organización de las estructuras de unión en la proteína de fusión Tb-5T4 donde las estructuras se basan en fusiones de unión de dominio único a heterodímeros CH1 y CL (dFab):

V1(5T4)CL-L1-VH(5T4)-L2-VL(5T4) o
V1(5T4)CL-L1-VL(5T4)-L2-VH(5T4)

Donde V1 es un ligador de dominio único con especificidad para 5T4
en combinación con

V2-CH1-L1-VH(CD3)-L2-VL(CD3) o
V2-CH1-L1-VL(CD3)-L2-VH(CD3)

donde V2 es un ligador de dominio único con una especificidad diferente que para 5T4 o CD3
como se ilustra para 2 combinaciones posibles en (xiii) y (xvi)

O diferentes formas de organización de

V2-CH1-L1-VH(5T4)-L2-VL(5T4) o
V2-CH1-L1-VL(5T4)-L2-VH(5T4)

en combinación con

V1(5T4)CL-L1-VH(CD3)-L2-VL(CD3) o

V1(5T4)CL-L1-VL(CD3)-L2-VH(CD3)

donde V2 es un ligador de dominio único con una especificidad diferente que para 5T4 o CD3 como se ilustra para 2 combinaciones posibles en (xiv) y (xvii)
O diferentes formas de organización de

V1(CD3)-CH1-L1-VH(5T4)-L2-VL(5T4) o
V1(CD3)-CH1-L1-VL(5T4)-L2-VH(5T4)

en combinación con

V2-CL-L1-VH(5T4)-L2-VL(5T4) o
V2-CL-L1-VL(5T4)-L2-VH(5T4)

donde V2 es un ligador de dominio único con una especificidad diferente que para 5T4 o CD3 como se ilustra para 2 combinaciones posibles en los modelos (xv) y (xviii).
En todas las combinaciones, el scFv también puede ser un fragmento variable de cadena sencilla estabilizado con disulfuro (dsFv)

FIG 2

A: comparación de las secuencias VH y VL de 5T4.H8 murinas publicadas por Forsberg 1997 (J. Biol. 272: 12430-12436 (SEQ ID 2 y 16) y una secuencia humanizada (SEQ ID 6 y 19) que muestran diferencias en regiones CDR estructurales y predichas (en recuadro).
B: representación esquemática de Tb535C que comprende las secuencias V(5T4) murinas en SEQ ID 2 y 16 y Tb535H-1120 que comprende la V(5T4) humanizada como en SEQ ID 6 y 19.
C: muestra un aumento significativo en la puntuación de humanidad como se expresa en la desviación de la media (puntuación z) tanto para VH como VL murinas como humanizadas
D: Rendimientos de producción después de IMAC (cromatografía de afinidad por metales inmovilizados) o SEC (cromatografía de exclusión por tamaño) de dos fusiones de Tribody que comprenden diferentes formas humanizadas de VH(5T4) y VL(5T4) y extendidas con una etiqueta HIS en el extremo C de la cadena que contiene CH1 (HHHHHH).

FIG 3

A: representación esquemática de la proteína de fusión humanizada Tb535H (SEQ ID 51 y 52).
B: Comparación de las constantes de disociación en equilibrio de KD de Tb535H y Tb535C (SEQ ID 49 y 50) en comparación con VH(5T4) SEQ ID 6 y VL(5T4) SEQ ID 19 humanizadas en formato dsFv, formato Fab, formato IgG o fusión en formato BiTE (scFv(5T4)-scFv(CD3)).
C: Representación gráfica de curvas de unión a ELISA en el dominio extracelular recombinante de 5T4 de Tb535H en comparación con sus partes Fab(5T4) y dsFv(5T4).
D: decoración FACS en condiciones de saturación de Tb535H y sus partes Fab(5T4) y dsFv(5T4) en la línea celular de mesotelioma MSTO-211H positiva para 5T4.
E: Valoración de la unión de Tb535H en la línea celular de mesotelioma MSTO-211H positiva para 5T4 y comparación de la concentración de unión al 50 % (KD) con el método ELISA.
F: Valoración de la unión de Tb535H en monocitos de sangre periférica de 3 donantes diferentes. Los valores de KD son reproducibles alrededor de 25 nM.

FIG 4A

A: representación esquemática de Tb535H con una indicación de todos los puentes disulfuro presentes en la proteína.
B: listado de todos los puentes disulfuro naturales y modificados por ingeniería genética en Tb535H.
C: indicación de todos los puentes disulfuro en la secuencia de Tb535H.
D: comparación de la formación de los puentes disulfuro modificados por ingeniería genética, que es sorprendentemente mejor en el Tb535H que en el Tb535C (SDS-PAGE de BOL no reductor). El gel reductor muestra cadenas de peso molecular esperado. Entre medias se muestra una curva de calibración de peso molecular.

FIG 4B

A: Curvas de valoración de actividad que comparan la influencia de la humanización y estabilización del ligador de CD3 VH(CD3) SEQ ID 29 y VL(CD3) SEQ ID 37 incorporado en un Tb-5T4.
B: influencia del estrés inducido sobre Tb-5T4 no estabilizado con disulfuro sobre la formación de multímeros. La figura muestra perfiles superpuestos de una elución de filtración en gel analítica después de la incubación durante 3 días a 20 °C o 37 °C. Se indican los monómeros (1) y los multímeros (2-4).

C: influencia del estrés inducido sobre Tb-5T4 estabilizado con disulfuro en la formación de multímeros después de 3 días a 37 °C. No hubo cambios en la formación de multímeros en comparación con la situación de inicio.

FIG 5 Análisis de la proteína de fusión Tb535

A: perfil de elución de una filtración en gel analítica que compara Tb535C y Tb535H. Se muestra la calibración usando moléculas derivadas de IgG de 150 kDa, 100 kDa, 50 kDa y 25 kDa. La tabla muestra el tamaño predicho de Tb535H y Tb535C como se deriva de la línea de calibración. Sorprendentemente, Tb535H muestra una configuración más compacta.

B: El análisis de espectrometría de masas de Tb535H muestra el peso molecular correcto e identifica las isoformas de PM.

C: el análisis analítico de intercambio catiónico de Tb535H identifica un número limitado de isómeros de carga.

D: isoelectroenfoque que compara Tb535C, Tb535H con la forma de IgG.

FIG 6A Estabilidad de Tb535 basada en curvas de fusión de la proteína

A: Representación esquemática de Tb535H.

B: Comparación de la estabilidad por la temperatura de fusión mediante el ensayo ThermoFluor entre Tb535C y Tb535H.

C: Comparación de curvas de fusión mediante ensayo ThermoFluor de Tb535H con sus componentes individuales (Fab(5T4); dsFv(5T4); dsFv(CD3)). También se muestra la suma teórica de los componentes. Sorprendentemente, Tb535H no es la suma de los componentes y la proteína de fusión es más estable.

D: Comparación de curvas de fusión mediante el ensayo ThermoFluor de formatos Tb535H con BiTE (fusión dsFv(5T4)-dsFv(CD3)) e IgG1(5T4) basado en las mismas secuencias del dominio V. Sorprendentemente, Tb535H es más estable que tanto IgG como la fusión scFv (BiTE).

FIG 6B Estabilidad de Tb535 después de 72 h de incubación a 37 °C

A: Las formas Tb535H y Tb535C se incubaron durante 72 h a 37 °C en PBS y antes y después se analizaron por cromatografía analítica de exclusión por tamaño. No se observa formación de multímeros después de la incubación.

B: Las formas Tb535H y Tb535C se incubaron durante 72 h a 37 °C en suero humano y después se analizaron mediante valoración de la actividad en un ensayo de destrucción celular (línea celular de mesotelioma positivo para MSTO-211H 5T4 con PBMC humanas E:T 5:1, ensayo de 48 h). No se observó diferencia en la actividad después de la incubación.

FIG 7 Comparación de formatos de proteína de fusión de la invención (Fab-(scFv)₂ y BiTE (scFv-scFv).

A: Formación típica de monómeros y dímeros usando ambos formatos de proteína de fusión. Los formatos BiTE tienden a tener una proporción más alta de dímeros formados.

B: Rendimiento relativo en comparación molar donde la proteína de fusión de la invención se establece como 100 % y se compara con el formato BiTE con la misma secuencia. Los formatos de la proteína de fusión de la invención tienen típicamente mayores rendimientos de producción.

C: Comparación de los rendimientos de producción después de la purificación de una proteína de fusión (Tb535H-1120) con un formato BiTE basado en las mismas secuencias.

D: La comparación de la valoración de la actividad (destrucción inducida de células tumorales positivas para 5T4 por PBMC humanas en cultivo mixto) de un formato de proteína de fusión con un formato de BiTE muestra valores de CE50 en el mismo intervalo, pero se destruye un mayor porcentaje de células tumorales usando el formato de proteína de fusión de la invención del acoplador de linfocitos T.

FIG 8 Comparación de la unión y actividad de Tb535C y Tb535H

A: unión ELISA en el dominio extracelular recombinante del antígeno 5T4.

B: unión ELISA en una línea de linfocitos T humanos (Jurkat).

C: valoración de citotoxicidad en un cultivo mixto de células tumorales de mesotelioma positivas para MSTO-211H 5T4.

D: Tabla que compara la unión y actividad de Tb535C y Tb535H.

FIG 9 Tb535H es activa en una variedad de diferentes tipos de tumores

A: valoración de actividad (destrucción inducida de células tumorales positivas para 5T4 por PBMC humanas en cultivo mixto) de una Tb535 usando líneas celulares representativas de diferentes formas de mesotelioma, cáncer de mama triple negativo y cáncer de colon con mutación en KRAS. Se dan los valores de CE50 en concentraciones picomolares.

B: comparación del nivel de expresión de 5T4 en la membrana según se determina por decoración FACS con los valores de CE50 obtenidos en un ensayo de destrucción celular.

FIG10

A: estimación de la semivida de las fases de equilibrado y eliminación después de la inyección en C57BL/6 de ratón. Se recuperó sangre de los animales sacrificados y se midió la concentración de Tb535 funcional usando un ensayo de actividad de inducción de citotoxicidad. Las estimaciones sugieren un gran volumen de distribución y una eliminación lenta.

B: no se pudo observar degradación de Tb535 mediante sondeo de proteínas de sangre completa con análisis de transferencia Western con etiqueta anti-FLAG

FIG 11A Efectividad de Tb535 en ratones NOD/SCID xenoinjertados con mesotelioma reconstituidos con PBMC humanas

A: imagen del tumor de mesotelioma que crece de manera subcutánea.

B: modelo subcutáneo y evolución del crecimiento tumoral a relaciones efector:diana de 1:1 a diversas concentraciones de Tb535H.

C: modelo subcutáneo y evolución del crecimiento tumoral a relaciones efector:diana de 2:1 a diversas concentraciones de Tb535H.

D: imagen del tumor de mesotelioma que crece de manera ortotópica en el revestimiento del mesotelio.

E: mesotelioma ortotópico inducido en ratones NOD/SCID reconstituidos con PBMC humanas y el tratamiento con Tb535H previene completamente la formación de tumores y la muerte (sacrificio en el punto final humanitario).

FIG 11B Tratamiento de tumores subcutáneos establecidos después de la inyección IP de 10E7 PBMC humanas y Tb535 en los días indicados. El volumen tumoral se midió usando un calibre.

FIG 12A Inducción de citocinas TH1 por Tb535H en cultivos mixtos de células tumorales con PBMC. Especialmente, la IL-2, el interferón gamma y el TNF alfa están regulados positivamente. Los controles positivos son OKT3-IgG (muromomab-CD3) (+) y sin adiciones (-).

FIG 12B Ausencia de inducción de citocinas de incubación de Tb535H con PBMC de 3 donantes humanos, hasta concentraciones de Tb535H de 1 mM (milimolar).

Los controles positivos son OKT3-IgG (muromomab-CD3) (+) y sin adiciones (-).

FIG 12C Ausencia de inducción del marcador de activación de linfocitos T (CD69 y CD25) en PBMC en ausencia de células tumorales positivas para 5T4 hasta concentraciones de 1 mM (milimolar) (símbolos abiertos). Los símbolos cerrados son controles en un cocultivo mixto de células tumorales/PBMC donde se inducen los marcadores de activación comenzando a concentraciones 10 000 veces más bajas.

FIG 13 Análisis de las células efectoras principales en PBMC humanas. Se compararon PBMC completas con una fracción de linfocitos T CD46+ purificados, una fracción de linfocitos T CD8+, una combinación de ambas y una fracción de células NK CD56+.

FIG 14A Se produce TB535 a partir de clones de CHO estables a hasta 1 g/l en un procedimiento de biorreactor discontinuo alimentado usando medio y cantidades químicamente definidas.

FIG. 14B Aislamiento de Tb535 del medio gastado usando un paso de captura (A), purificación (B) y pulido (C). Análisis de filtración en gel (D) y SDS-PAGE teñido con azul brillante de Coomassie.

[0129] Los siguientes ejemplos se han incluido para ilustrar modos de la invención. Ciertos aspectos de los siguientes ejemplos se describen en términos de técnicas y procedimientos hallados o contemplados por los presentes coinventores para el buen funcionamiento en la práctica de la invención. Estos ejemplos ilustran prácticas de laboratorio estándar de los coinventores. A la luz de la presente divulgación y el nivel general de experiencia en la técnica, los expertos apreciarán que los siguientes ejemplos solo pretenden ser ejemplares.

Ejemplo 1 Expresión

Expresión transitoria en células HEK 293

[0130] Se usaron clones de los plásmidos de expresión con secuencias de nucleótidos de secuencia verificada para la transfección y la expresión de proteínas en el Sistema de Expresión FreeStyle-293 (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Alemania) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se obtuvieron sobrenadantes que contenían las proteínas expresadas, se eliminaron las células mediante centrifugación y se almacenaron los sobrenadantes a -20 °C. Se construyeron diferentes permutaciones de ligadores de 5T4 y CD3 según la posición (por ejemplo, Fig.

1B: i-iii)) y/o el uso de una combinación VH-VL o VL-VH para las moléculas scFv (por ejemplo, Fig. 1B iv-vi), o con dominios V cruzados en el Fab (por ejemplo, Fig. 1C vii-xii), o combinados con ligadores de dominio (por ejemplo, Fig. 1D xiii-xviii) a nivel génico y se clonaron en vector pES33 que combina promotor de CMV y un sitio de iniciación de traducción Kozak entre otras características. Todas las construcciones se fusionaron en el extremo C-terminal con una etiqueta HIS (HHHHHH) y en el extremo N-terminal con una etiqueta FLAG (DYKDDDDK). El medio gastado se analizó después de la precipitación con TCA de la captura por IMAC, seguido de SDS-PAGE y análisis de transferencia Western sondeado con anticuerpo anti HIS, anticuerpo anti FLAG, anti Fab humano o anti suero kappa humano. Las proteínas se purificaron usando una combinación de captura por IMAC, purificación por intercambio iónico y un paso de pulido en filtración en gel para asegurar el aislamiento de una fracción monomérica estricta. Se compararon diversas formas de anticuerpos biespecíficos 5T4xCD3 en formato tanto Tribody (es decir, Fab-(scFv)₂) como BiTE (es decir, scFv-scFv) y se puntuó su rendimiento relativo y la fracción relativa de proteína monomérica producida. Se observó que las formas Tribody generalmente producen más proteína biespecífica y una fracción más alta de proteína monomérica (véase la Fig. 7A, 7B y 7C).

Expresión estable en células CHO

[0131] Los clones de los plásmidos de expresión con secuencias de nucleótidos de secuencia verificada se transfectaron en células CHO deficientes en DHFR para la expresión eucariota de las construcciones. La expresión de la proteína eucariota en células CHO deficientes en DHFR se realizó tal como se describe mediante Kaufman R.J. (1990) Methods Enzymol. 185, 537-566. La amplificación génica de las construcciones se indujo aumentando las concentraciones de metotrexato (MTX) hasta una concentración final de MTX 20 nM. Después de dos pases de cultivo estacionario, las células se cultivaron en frascos rotativos con medio de soja líquido HyQ PF CHO sin nucleósidos (con L-glutamina 4,0 mM con Pluronic F-68 al 0,1 %; HyClone) durante 7 días antes de la recogida. Las células se retiraron por centrifugación y el sobrenadante que contenía la proteína expresada se almacenó a -20 °C.

[0132] Se crea una línea celular que expresa TB535 estable usando células CHO adaptadas a suspensión libre de componente de suero/animal. Los genes Fd y L del Tribody se clonan en vectores y se cotransfectan en las células CHO. Los plásmidos contienen marcadores seleccionables con elementos para generar altos niveles de expresión. A partir de la expresión de los conjuntos se lleva a cabo una clonación por dilución limitante para seleccionar los clones más estables de mayor rendimiento. Se produce TB535 a partir de clones estables a hasta 1 g/l en un proceso de biorreactor discontinuo alimentado usando medio y cantidades químicamente definidos. La Figura 14A ilustra el crecimiento celular y la cantidad de TB535 para un proceso de biorreactor de TB535 típico.

[0133] El contenido del biorreactor se recoge con eliminación de células por filtración profunda. Se recupera TB535 y se purifica de la fase de medio gastado clarificada usando una combinación de pasos de cromatografía, por ejemplo, afinidad, intercambio iónico y exclusión por tamaño, Figura 14B, seguido de una concentración/diafiltración final en tampón de formulación para almacenamiento. Este proceso de purificación produce aproximadamente 400 mg/l de Tribody TB535 formulado establemente purificado. Como se determina por varios métodos analíticos que incluyen, como se ilustra en la figura 14B-D/E, exclusión por tamaño analítica y SDS PAGE no reductora, el TB535 producido por este proceso es >98 % puro.

Expresión de la forma recombinante de 5T4 humana soluble

[0134] La secuencia codificante de 5T4 humana (GenBank, número de acceso NM_006670) se usó para la construcción de la secuencia de ADNc artificial que codifica la proteína soluble de 5T4 humana que comprende solo los dominios extracelulares de 5T4.

[0135] Para las fusiones con albúmina humana, los fragmentos de ADNc modificados se diseñaron para contener primero un sitio Kozak para la expresión eucariota de las construcciones seguido por la secuencia codificante de la proteína 5T4 humana que comprende los aminoácidos 1 a 355 correspondientes al péptido señal y al dominio extracelular, precedido en la estructura por la secuencia codificante de una etiqueta Flag, seguida en la estructura por la secuencia codificante de una etiqueta de histidina modificada (SGHHHHHH) y un codón de terminación.

[0136] Los procedimientos anteriormente mencionados se llevaron a cabo todos de acuerdo con protocolos estándar (Sambrook, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 3a edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (2001)).

Ejemplo 2 Humanización

[0137] Se prepararon anticuerpos anti-5T4 quiméricos y humanizados usando secuencias derivadas del anticuerpo H8 murino y secuencias de anticuerpo humano. Algunas secuencias de anticuerpos representativos de la invención se muestran en la Figura 2.

[0138] Se construyeron anticuerpos H8 quiméricos que tienen secuencias de regiones variables de cadena pesada y cadena ligera de H8 murinas (por ejemplo, SED ID 01 o SEQ ID 02 combinadas con la SEQ ID 16 o SEQ ID 17 y secuencias de regiones constantes humanas CH1 y CL-kappa. Las regiones constantes humanas representativas que se usaron para preparar anticuerpos H8 quiméricos y humanizados incluyen las de IgG1 humana, kappa humana e IgG4 humana. Para clonar secuencias que codifican regiones constantes de IgG, pueden eliminarse opcionalmente secuencias intrónicas. También se prepararon anticuerpos en los que una cadena de anticuerpo comprende la región variable H8 murina (como en un anticuerpo quimérico) y la otra cadena de anticuerpo comprende una región variable H8 humanizada, es decir, un anticuerpo semihumanizado.

[0139] Se construyeron regiones variables H8 humanizadas para incluir las CDR de H8 murina injertadas en regiones flanqueantes humanas o sustancialmente humanas. Las CDR del anticuerpo H8 murino se identificaron usando la definición de AbM, que se basa en la variabilidad de secuencia, así como en la ubicación de las regiones de bucle estructurales. Se seleccionaron regiones estructurales conservadas aceptoras humanas basándose en que eran sustancialmente similares a las regiones estructurales conservadas del anticuerpo H8 murino, o que eran más similares a la secuencia consenso de la subfamilia de regiones variables. Véase la Figura 2. También se tuvo en consideración la representación de los locus de la región estructural en humanos, de manera que se preferían secuencias ampliamente representadas antes que secuencias menos abundantes. Se realizaron mutaciones adicionales de las secuencias aceptoras de la región estructural humana, por ejemplo, para restaurar los residuos murinos que se cree que están implicados en los contactos con el antígeno y/o los residuos implicados en la integridad estructural del sitio de unión al antígeno. La secuencia de aminoácidos también se optimizó para una preferencia de codones de células CHO y para eliminar sitios de enzimas de restricción. Se usó un programa de predicción de la estructura peptídica para analizar las secuencias de las regiones pesada y ligera variables humanizadas para identificar y evitar los sitios de modificación de proteínas postraduccionales introducidos por el diseño de humanización. Usando esta estrategia, se construyeron tres versiones de regiones variables H8 humanizadas. La versión 1 retiene los residuos H8 murinos en posiciones dentro de la secuencia estructural que se cree son fundamentales para la integridad del anticuerpo y la unión al antígeno. La versión 2 retiene residuos murinos sólo en las CDR. La versión 3 es similar a la versión 2, con la excepción de que se usó una secuencia de región variable consenso como estructura aceptora de cadena pesada. La región variable de la cadena ligera del anticuerpo versión 3 es la misma que la del anticuerpo versión 2.

[0140] Para la construcción de regiones variables de cadena ligera H8 humanizadas, se usó la secuencia de línea germinal DPK24 VL-IV/locus B3 como estructura aceptora. La secuencia de DPK24 es un 68 % idéntica a la región variable de la cadena ligera de H8 murina y contiene 18 sustituciones de aminoácidos en comparación con las secuencias estructurales conservadas de la cadena ligera de H8 murina. Los anticuerpos humanizados también se construyeron usando regiones estructurales de la región variable de cadena ligera de los subgrupos de clones de línea germinal VklII y Vkl. En particular, los anticuerpos que incluyen regiones estructurales de subgrupos VklII de cadena ligera y la versión 1 del anticuerpo humanizado H8 descrito son tanto altamente expresados como estables.

[0141] Para la construcción de regiones variables de cadena pesada de H8 humanizadas, se usó la secuencia de línea germinal DP75 VH-I/locus 1-02 como secuencia aceptora. La secuencia DP75 es idéntica en un 65 % a la región variable de la cadena pesada de H8 murina y contiene 28 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia estructural de la cadena pesada de H8 murina. La versión 1 de la región variable de la cadena pesada de H8 humanizada mantuvo los restos K38 y S40 de H8 murina, que son importantes para el contacto con el antígeno con las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera, así como I48, que es importante para el contacto con el antígeno con las regiones variables y con CDR2. Alternativamente, la cadena pesada de H8 humanizada se preparó usando una secuencia consenso de subgrupo de región variable de cadena pesada. La secuencia consenso contiene 25 sustituciones de aminoácidos cuando se compara con la secuencia estructural de la cadena pesada de H8 murina.

[0142] Las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera de H8 humanizada se construyeron hibridando entre sí oligonucleótidos solapantes y ligándolos en el vector de clonación pUC57 que contiene una región constante de anticuerpo humana. Las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera humanizadas también pueden construirse usando mutagénesis por PCR o mutagénesis dirigida. El diseño de los oligonucleótidos incluía la optimización del uso de codones para la expresión en células CHO y la eliminación de sitios de enzimas de restricción.

[0143] Se realizó una optimización adicional sustituyendo CDR1 de VH, CDR2 de VH, CDR1 de VL o CRD2 de VL por una secuencia de la línea germinal homóloga más próxima. Las variantes se clasificaron de acuerdo con el rendimiento y la actividad de unión. La sustitución de CDR1 de VH es de particular interés, ya que tuvo una mejora inesperada del número de moléculas que formaban eficazmente un puente disulfuro estabilizante en el scFv como se describe en EP0703926 (véanse la Figura 4A y la Figura 4B-A, B y C).

[0144] La Figura 5 muestra el análisis basado en filtración en gel, MALDI-TOFF e intercambio iónico analítico que muestra el comportamiento esperado y la comparabilidad de la forma humanizada con el anticuerpo basado en ratón (Figura 5B, C, D). La filtración en gel analítica indica de nuevo una forma ligeramente más compacta de Tb535H (humanizado) en comparación con Tb535C (quimérico: que contiene dominios V de ratón).

[0145] La Figura 8 muestra una unión comparable a 5T4, así como a CD3 y una actividad comparable de Tb535H (basada en SEQ ID 06 y SEQ ID 19) en comparación con un Tribody basado en los dominios variables murinos (SEQ ID 02 y SEQ ID 17).

Ejemplo 3 Ensayos de unión

Análisis FACS: Decoración, valoración, unión a PBMC

[0146] Las líneas celulares que se iban a analizar (líneas celulares tumorales, PBMC) se recogieron (1x10⁶ células/muestra), se lavaron en PBS y se incubaron con 1 µg de las moléculas de unión (por ejemplo, anticuerpo/Tribody) en PBS/FBS al 10 % durante 1 hora en hielo. Para la caracterización de la expresión de 5T4 por líneas celulares tumorales se usó un anticuerpo anti-5T4 comercial (N.º de Cat: MAB49751, R&D Systems).

[0147] Para acceder a la unión de moléculas anti-5T4 (formato scFv, Fab y Tribody) al dominio de 5T4 humana, la línea celular bifásica de mesotelioma MSTO-211H (ATCC CRL-2081) se analizó mediante un ensayo de unión FACS con moléculas marcadas directamente con alofococianina (APC) mediante el kit Lightning-Link® APC de Innova Biosciences, siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la determinación de la constante de disociación en equilibrio (KD), las concentraciones de Tb535 variaron de 0,05 a 500 nM. Las células se lavaron después dos veces con PBS y se accedió a la unión a la superficie celular mediante citometría de flujo usando un aparato BD FACSalibur.

ELISA basado en células Jurkat

[0148] Para acceder a la unión de las estructuras al dominio CD3 humano, se usó una línea celular de linfoma de linfocitos T (CD3+) ELISA basada en células. Se recogen células Jurkat, se lavan y se dividen en alícuotas en cada pocillo de una placa de ELISA de fondo redondo. Se prepararon diluciones de Tribody y cadenas sencillas en PBS y se añadieron a las células. Después de un paso de lavado, se añade anticuerpo de detección a las muestras (anti-FLAG monoclonal conjugado con fosfatasa alcalina, N.º de Cat: A9469, Sigma). El anticuerpo secundario se detecta mediante el desarrollo de una reacción colorimétrica tras la adición de p-NPP (N.º de Cat: N7653, Sigma) y la absorbancia se cuantifica en un lector de placas de micropocillos y se procesa mediante regresión no lineal usando el software Graph Pad Prism.

[0149] Se realizó un ELISA basado en células o basado en proteínas de acuerdo con protocolos estándar (Sambrook, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 3ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (2001)).

[0150] Para la **Afinidad por el dominio CD3 humano**, se usó un ELISA basado en células con una línea celular de linfoma de linfocitos T (CD3+), Jurkat. Se recogen células Jurkat, se lavan y se dividen en alícuotas en cada pocillo de una microplaca de 96 pocillos de fondo redondo. Se prepararon diluciones de Tribody/muestra en PBS, se añadieron a las células y se incubaron. Después de los pasos de lavado, se añade anticuerpo de detección a las muestras (AP anti-cadena ligera kappa humana; por ejemplo, Sigma, N.º de Cat K4377). El anticuerpo de detección unido se mide mediante el desarrollo de una reacción colorimétrica tras la adición de p-NPP (N.º de Cat: N7653, Sigma) y la absorbancia se cuantifica en un lector de placas de micropocillos y se procesa mediante regresión no lineal usando el software Graph Pad Prism.

[0151] Para la **Afinidad por el antígeno diana 5T4** se utiliza un ELISA con el antígeno 5T4. El antígeno diana, el dominio extracelular de 5T4, de producción propia, se recubre en una microplaca de 96 pocillos de fondo plano de poliestireno y se bloquea. Se prepararon diluciones de Tribody/muestra en TBS con leche en polvo al 0,2 % p/v, se añadieron a la placa y se incubaron. Después de los pasos de lavado, se añade anticuerpo de detección a las muestras (AP anti-cadena ligera kappa humana; por ejemplo, Sigma, N.º de Cat K4377). El anticuerpo de detección unido se mide mediante el desarrollo de una reacción colorimétrica tras la adición de p-NPP (N.º de Cat: N7653, Sigma) y la absorbancia se cuantifica en un lector de placas de micropocillos y se procesa mediante regresión no lineal usando el software Graph Pad Prism.

Tabla 1: afinidad de diversos formatos que se unen a la proteína recombinante 5T4.
KD (ELISA en 5T4-ECD)

dsFv	2,3	nM
BiTE	2	nM
Fab	2,9	nM
Tb535H	0,9	nM
Tb535C	1	nM

IgG	0,7	nM
-----	-----	----

[0152] Como se muestra en la tabla 1, el Tb535 de unión bivalente tiene una afinidad 2-3 veces mayor en comparación con formatos monovalentes tales como los BiTE comparables (formato scFv-scFv). Usando el formato Tribody se obtienen afinidades para 5T4 próximas al formato IgG (véase la figura 3A, B y C). La Figura 3 C y D muestra una clara ventaja en la unión del Tribody frente a formas monovalentes tales como scFv y Fab.

[0153] La unión anti-CD3 en la configuración Tb535 sigue siendo eficaz como se demuestra por la unión a células Jurkat así como a PBMC de diferentes donantes (Figura 3F)

Ejemplo 4 Ensayos de actividad

Marcaje de células diana

[0154] Para el análisis de lisis celular en ensayos de citometría de flujo, se usó el colorante de membrana fluorescente DiOCi8 (DiO) (Molecular Probes, N.º de Cat: V22886) para marcar células CHO transfectadas con 5T4 humanas o de macaco o células humanas que expresan 5T4 como células diana y distinguirlas de células efectoras. En resumen, las células se recogieron, se lavaron una vez con PBS y se ajustaron a 10^6 célula/ml en PBS que contenía FBS al 2 % (v/v) y el colorante de membrana DiO ($5 \mu\text{l}/10^6$ células). Después de la incubación durante 3 min a 37°C , las células se lavaron dos veces en medio RPMI completo y el número de células se ajustó a $1,25 \times 10^5$ células/ml. La vitalidad de las células se determinó usando solución isotónica de EosinG al 0,5 % (v/v) (Roth N.º de Cat: 45380).

Ensayo de citotoxicidad basado en FACS con PBMC humanas

[0155] Se prepararon células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) mediante centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll a partir de preparaciones de linfocitos enriquecidos (capas leucocitarias), un producto secundario de bancos de sangre que recogen sangre para transfusiones. Las capas leucocitarias las suministró un banco de sangre local y las PBMC se prepararon el mismo día de la extracción de sangre. Después de la centrifugación por densidad de Ficoll y lavados extensivos con Dulbecco's PBS (Gibco), los eritrocitos restantes se eliminaron de las PBMC mediante incubación con tampón de lisis de eritrocitos (NH₄Cl 155 mM, KHC03 10 mM, EDTA 100 mM). Las plaquetas se retiraron mediante el sobrenadante después de la centrifugación de PBMC a $100 \times g$. Los linfocitos restantes abarcan principalmente linfocitos B y T, células NK y monocitos. Las PBMC se mantuvieron en cultivo a 37°C / CO₂ al 5 % en medio RPMI (Gibco) con FCS al 10 % (Gibco).

[0156] La bioactividad de los Tribodies se analizó mediante ensayo FACS de citotoxicidad *in vitro* usando diferentes líneas celulares tumorales: MDA-MB468 (ATCC HTB-132), MSTO-211H (ATCC CRL-2081), NCI-H2052 (ATCC CRL-5915), NCI-H2452 (ATCC CRL-5946), NCI-H28 (ATCC CRL-5820), MDA-MB231 (ATCC HTB-26), HS-578T (ATCC HTB-126), BT-549 (ATCC HTB-122), SW-620 ATCC CCL-227, HCT-116 (ATCC CCL-247), HCT-15 (ATCC CCL-225) como células diana. Se usaron PBMC humanas como células efectoras después de la estimulación con CD3/CD28/IL-2. Para la estimulación, se revistió un recipiente tipo T-flask (75 cm^3) con $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ de αCD3 (ImmunoTools N.º de Cat: 21620030) en $7,5 \text{ ml}$ de PBS 1x durante 2 h a 37°C . El T-flask se enjuagó con PBS antes de añadir PBMC completas en RPMI-1640 (Sigma N.º de Cat: R8758) suplementado con FBS al 10 % (PAA N.º de Cat: A15-151), $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ de αCD28 (ImmunoTools N.º de Cat: 21330280) y $30 \text{ U}/\text{ml}$ de IL-2 recombinante humana (ImmunoTools N.º de Cat: 11340023). Después de 3 días de estimulación a 37°C y CO₂ al 5 %, las PBMC se transfirieron a un T-flask sin recubrir y se incubaron durante otras 24 h en RPMI-1640 con FBS al 10 % y $30 \text{ U}/\text{ml}$ de IL-2 para permitir que el receptor de linfocitos T internalizado se reexpanda a la superficie celular. Las células diana se marcaron con colorante PKH67 (Sigma N.º de Cat: MINI67-1KT) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se incubaron durante la noche para la adhesión celular. Se añadieron PBMC humanas (Tebu N.º de Cat: 192PMBC) a una relación Efectora:Diana de 5:1 y se prepararon Tribodies con un intervalo de concentración de 1000 a $0,001 \text{ ng}/\text{ml}$, por duplicado. Las dianas, las células efectoras y el Tribody se incubaron durante 48 h a 37°C y CO₂ al 5 %. Después de la incubación, las células se recogieron y resuspendieron en PBS que contenía yoduro de propidio (Sigma N.º de Cat: P4864), excepto las células sin Tribody. La citotoxicidad específica se determinó en función de las células diana vivas intactas (células PKH67+) con respecto a las células muertas (PI+).

[0157] Se accedió a las células mediante citometría de flujo usando un aparato BD FACSalibur y usando el software de búsqueda celular. Para la determinación de la concentración estimada de Tribody a la que se produjo la lisis semimáxima de las células diana (CE50), se representaron gráficamente los valores de citotoxicidad específica frente a la concentración de Tribody y se procesaron por regresión no lineal usando el software Graph-Pad Prism.

[0158] La actividad del Tribody Tb535 5T4xCD3 estaba siempre en el intervalo bajo picomolar medido en una serie de líneas celulares que representan varias indicaciones cancerosas (por ejemplo, Fig. 9A y B). Sorprendentemente, un Tribody 5T4xCD3 mostró un mayor porcentaje de destrucción celular en comparación

con el formato scFv-scFv de BITE, incluso cuando se midió *in vitro* en condiciones de unión saturantes (véase la FIG 7D).

Detección de marcadores de activación de linfocitos T

[0159] Se incubaron PBMC de donantes sanos (Tebu-Bio) con TB535H en presencia y ausencia de células MSTO-211H diana por duplicado. Las PBMC se descongelaron y se incubaron en RPMI durante 24 h a 37 °C y CO₂ al 5 %. Se sembraron células MSTO-211H a razón de 8× 10⁴ células/pocillo en la placa de 24 pocillos y se incubaron durante la noche para la adhesión celular. Se añadieron PBMC a una relación efector:diana de 10:1 (no activado) con un intervalo de concentraciones de Tribody.

[0160] Después de 24 h de incubación de hPBMC y Tribody en presencia y ausencia de la línea celular MSTO-211H, se recogieron las PBMC (proveedor: Tebu-Bio) por centrifugación (300 x g, 5 minutos, temperatura ambiente) y se tiñeron con anti-CD69 marcado con APC (Immunotools N.º de Cat: 21270564) y anti-CD3 conjugado con FITC (Immunotools N.º de Cat: 21620033), a una concentración de 1 µg de anticuerpo/millón de células. Para la determinación de CD25, otro marcador de activación de linfocitos T, se recogieron las células después de 48 h de incubación y se tiñeron con APC-anti-CD25 (Immunotools N.º de Cat: 21270256) y FITC anti-CD3. Los anticuerpos se incubaron durante 1 hora a 4 °C en la oscuridad. Las células se lavaron 3 veces en PBS y los resultados se obtuvieron mediante citometría de flujo en un aparato FACSCalibur.

[0161] La Figura 12C muestra que el cocultivo *ex vivo* de células tumorales con PBMC induce la expresión del marcador de activación de linfocitos T dependiente de la concentración de Tb535, mientras que esto no sucede en ausencia de células diana incluso en concentraciones de hasta 1 µM.

Ensayo de citotoxicidad con subpoblaciones CD4+, CD8+ y NK

[0162] Se adquirieron células enriquecidas CD4+, CD8+ y CD56+ disponibles en el mercado (proveedor: Tebu-bio) para evaluar la actividad citotóxica de linfocitos T colaboradores CD4+, linfocitos T efectores CD8+ y células NK.

[0163] La bioactividad de Tb535H se evaluó mediante un ensayo de citotoxicidad *in vitro* basado en FACS con una alteración en la preparación de células efectoras. De manera idéntica a las PBMC, estas poblaciones celulares también se descongelaron y se cultivaron durante la noche antes de usarse en el ensayo de citotoxicidad. Sin embargo, en lugar de usar una relación E:T fija de 10:1, como para las PBMC, la cantidad de células efectoras se adaptó para cada subpoblación celular. Típicamente, los linfocitos T colaboradores CD4+, los linfocitos T efectores CD8+ y las células NK representan el 50 %, el 25 % y el 10 % de la población completa de PBMC. Con esta suposición, las relaciones E:T usadas en este ensayo de citotoxicidad fueron de 5:1 para linfocitos T colaboradores CD4+, de 2,5:1 para linfocitos T efectores CD8+ y de 1:1 para células NK. Como control, el ensayo también se realizó con la población completa de PBMC a una E:T de 10:1. Adicionalmente, también se probó una mezcla de células CD4+ y CD8+.

[0164] La actividad citotóxica de estas poblaciones celulares se determinó con la incubación de Tb535 a 100.000 pM. La citotoxicidad específica se determinó en función de las células diana vivas intactas (células PKH67+) con respecto a las células muertas (PI+).

[0165] Como se demuestra en la Fig. 13, los linfocitos T CD8+ son las principales células efectoras, y la efectividad se potencia mediante la inclusión de células CD4+. Las células NK no se estimulan para matar las células diana por Tb535.

Ejemplo 5 Estabilidad

Análisis Thermofluor

[0166] Las muestras de scFv-PO3 y scFv-SP34 se diluyeron en PBS a pH 7,4 hasta una concentración final de 0,1 mg/ml. Se añadieron 5 µl de tinción de gel Sypro Red diluida 200x (N.º de Cat: S-6653, Invitrogen) a 55 µl de muestra diluida. Se cargaron 20 µl de cada muestra preparada en un capilar y se centrifugaron, 700 g durante 5 s. Se extrajo el material con acetato de etilo. Para la detección, el termociclador (Roche Lightcycler 1.5) se ajustó a 640 nm y se programó con un primer paso a 37 °C durante 10 s seguido de un aumento hasta 95 °C a 0,5 °C por segundo con adquisición continua de datos.

Exclusión por tamaño analítica (filtración en gel)

[0167] El análisis para cuantificar el Tribody y determinar la pureza, la proporción de monómeros frente a formas agregadas solubles de mayor peso molecular, por ejemplo, dímeros, trímeros, etc., y formas fragmentadas de menor peso molecular, por ejemplo, cadenas ligeras libres, se llevó a cabo en una columna Bio SEC-5, 5 µm, 300A, 7,8 * 300 mm, (Agilent) a 1 ml min⁻¹ con tampón de fosfato sódico/NaCl pH 7,0 en una HPLC Ultimate

3000 (Dionex) con detección por UV a 280 nm. La cuantificación se lleva a cabo usando AUC frente a una curva de calibración generada usando una solución patrón purificada.

[0168] Se observa que los formatos de Tribody, y especialmente cuando contienen cadenas individuales estabilizadas con disulfuro, son más estables que los formatos comparables scFv-scFv (BiTE) y sorprendentemente incluso cuando se comparan con un formato de IgG que contiene secuencias de dominio V idénticas (Fig. 6A-D). La notable estabilidad de Tb535 se ilustra adicionalmente mediante incubación en PBS o suero humano durante 3 días a 37 °C. No hay cambios en la fracción soluble monomérica (Figura 6B-A) y no hay pérdida en la actividad (Figura 6B-B).

Ejemplo 6 Análisis

[0169] Un **análisis analítico de intercambio catiónico** para caracterizar y determinar la proporción de isoformas cargadas se llevó a cabo en una columna MabPac SCX-10 de 3 µm, 4 × 50 mm, (ThermoFisher) a 0, 5 ml min⁻¹ con tampón MES pH 5,6 usando elución de gradiente salino en una HPLC Ultimate 3000 (Dionex) con detección por UV a 280 nm.

[0170] El **isoelectroenfoque** se llevó a cabo usando electroforesis en gel de pH sin equilibrio usando geles premoldeados IEF 3-10 (Serva) realizados en una minicélula XCell Surelock (Invitrogen) con BIO-RAD Power Pac HV y teñidos con SimplyBlue SafeStain (Invitrogen)

[0171] El **SDS PAGE** se llevó a cabo en geles NuPAGE Novex Bis-Tris 4-12 % (Invitrogen) realizados en un XCell Surelock™ Mini-Cell (Invitrogen) con BIO-RAD Power Pac HV, tampón MOPs, y se tiñó con SimplyBlue™ SafeStain (Invitrogen). Para el análisis, las muestras se diluyeron con tampón de carga, NuPAGE LDS (Invitrogen) y para la SDS PAGE con reducción adicionalmente se redujeron con DTT.

[0172] Para las **Transferencias Western**, la muestra se separa primero por SDS PAGE en condiciones no reductoras, con geles NuPAGE Novex Bis-Tris 4-12 % (Invitrogen) pasados por una minicelda XCell Surelock (Invitrogen) con tampón BIO-RAD Power Pac HV, MOPs, se transfieren a una membrana de PVDF y se detectan usando AP anti kappa humana de cadena ligera; por ejemplo, Sigma, N.º de Cat K4377. El anticuerpo de detección unido se desarrolla usando un kit de conjugado AP, Cat. No 170-6432, Biorad.

Ejemplo 7 farmacocinética y farmacodinamia en modelos de ratón

Determinación de la semivida mediante el ensayo de citotoxicidad

[0173] Se inyectó a 30 ratones (FOXP3-GFP; género mixto; 2 machos y 1 hembra por punto temporal) 10 mg/kg de Tb535 y se sacrificaron en grupos de 3 ratones en diferentes puntos temporales: 5 y 30 min, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12 y 16 h después de la inyección. La bioactividad de Tb535H en muestras de suero se evaluó mediante un ensayo de citotoxicidad *in vitro* basado en FACS como se ha descrito anteriormente. En resumen, las células diana (MSTO-211H) se marcaron con colorante PKH67 (Sigma-Aldrich) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se incubaron durante la noche para la adhesión celular. Se activaron células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) comerciales con CD3/CD28/IL2 y se usaron como células efectoras con una relación de efector a diana de 5:1. Para cada muestra de suero se prepararon de 2 a 3 diluciones, se añadieron a las células diana y se incubaron durante 72 h a 37 °C y CO₂ al 5 %. Como control, también se incluyeron muestras de Tb535H con concentración conocida para establecer una curva de calibración que correlaciona la concentración de Tribody con un valor de citotoxicidad para este donante de PBMC específico. Después de la incubación, las células se recogieron y se determinó la citotoxicidad específica en función de las células diana vivas intactas (células PKH67+) frente a las células muertas (PI+) según se evaluó mediante citometría de flujo usando un aparato BD FACSCalibur y usando el software de búsqueda celular. Para la determinación de la concentración y semivida de Tb535H estimadas mediante este método, se representaron gráficamente valores de citotoxicidad específicos frente al tiempo y se procesaron mediante regresión lineal considerando una fase α y β.

[0174] La figura 10 muestra un ejemplo de una determinación de semivida que muestra un gran volumen de distribución y un aclaramiento relativamente lento.

Determinación de la efectividad: tratamiento temprano

[0175] Para analizar la eficacia del Tribody (10; 1; 0,1; 0,01 mg/kg) en un modelo tumoral temprano, se inyectó subcutáneamente a ratones NOD/SCID 2,5×10⁶ células tumorales de mesotelioma mezcladas con 2,5×10⁶ o 5×10⁶ PBMC humanas. Se administró el Tribody i.v. los días 0, 2, 4, 7, 9 y 11 después de la inyección del tumor. El crecimiento tumoral se midió con un calibre.

[0176] Para imitar un mesotelioma ortotópico modelo, se inyectaron $2.5 \cdot 10^6$ células tumorales de mesotelioma intrapleuralmente. Se vigiló a los animales regularmente para detectar dificultad respiratoria y >20 % de pérdida de peso para determinar los puntos finales humanitarios aprobados por el comité ético local.

- 5 [0177] La FIG11A-ABC muestra la efectividad de Tb535 en el tratamiento de ratones NOD/SCID xenoinjertados subcutáneos reconstituidos con PBMC humanas, y las FIG11A-D y E ilustran la actividad en un modelo tumoral de mesotelioma ortotópico (inyectado intrapleural).

Determinación de la efectividad: tratamiento tardío

- 10 [0178] El tratamiento de tumores establecidos se demostró usando estudios de xenoinjerto en ratones NSG (NOD-scid IL2Rgamma<null> The Jackson Laboratory), siete días después de la implantación subcutánea de $5 \cdot 10^6$ células cancerosas, se inyectó tres veces a los ratones $10 \cdot 10^6$ PBMC activadas cada seis días por vía IP. Para todos los estudios, dos días después de la infusión inicial de PBMC, los ratones se trataron por vía intravenosa con siete dosis de Tb535 o solución salina cada dos días. Los tumores se midieron dos veces por semana con calibres, y el volumen tumoral se calculó mediante $W \times L \times H$.

[0179] La FIG 11B muestra que Tb535 también es activo contra tumores establecidos.

20 **Ejemplo 8 citotoxicidad ex vivo**

Ensayo de liberación de citocinas

- 25 [0180] Se incubaron PBMC de 4 donantes sanos con TB535H en presencia y ausencia de células MSTO-211H diana. Las PBMC se descongelaron y se incubaron en RPMI durante 24 h a 37 °C y CO₂ al 5 %. Se sembraron células MSTO-211H a razón de 8×10^4 células/pocillo en la placa de 24 pocillos y se incubaron durante la noche para la adhesión celular. Se añadieron PBMC a una relación efector:diana de 10:1 (no activado) con un intervalo de concentraciones de Tribody. Tras 24 o 48 h de incubación a 37 °C y CO₂ al 5 %, las células se recogieron y se centrifugaron (300x g, 5 minutos, a temperatura ambiente) y el sobrenadante se recogió en un nuevo tubo y se analizó para detectar la liberación de citocinas.

- 35 [0181] Se accedió a la liberación de citocinas en el medio de cultivo mediante ELISA usando los siguientes kits, según las instrucciones del fabricante: IL-2, Mabtech 3445-1H-6; IFN-gamma Mabtech 3420-1H-6; TNF-alfa Mabtech 3510-1H-6; TGF-beta 1 R&D DY240-05; IL-4 R&D DY204-05 e IL-6 R&D DY206. Algunas muestras tuvieron que diluirse de modo que el resultado encajara en la curva de calibración, concretamente para TGF1-beta (dilución 1:7), IL-6 (dilución 1:10) e IFN-gamma (dilución 1:40 en muestras diana de NOEL para concentraciones de Tb535H de 10 ng/ml y superiores). Las muestras se midieron después de 24 h de incubación para la cuantificación de IL-2, IFN-gamma, TNF-alfa e IL-6. La IL-4 y el TGF-beta 1 se cuantificaron a partir del medio de cultivo después de 48 h de incubación.

- 40 [0182] La Figura 12A muestra la inducción de citocinas en cocultivo ex vivo de células tumorales con PBMC de la respuesta de tipo I, y la Figura 12B muestra la falta de inducción significativa de citocinas en ausencia de células diana (solo PBMC + Tb535).

45 Tabla 1: Secuencias de aminoácidos

SEQ ID	Secuencia
01	EVQLQQSGPDLVKPGASVKISCKASGYSFTGYMHVWKQSHGKSLEWIGRI NPNNGVTLYNQKFKDKAILTVDKSSTTAYMELRSLTSEDSAVYYCARSTMIT NYVMDYWGVTTSTVTSS
02	

SEQ ID	Secuencia
	EVQLQQSGPDLVKPGASVKISCKASGYSTGYMHWVKQSPGKGLEWIGRI NPNNGVTLYNQKFKDKATLTVDKSSTTAYMELRSLTSEDSAVYYCARSTMI TNYVMDYWGQGTSVTVSS
03	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSTGYMHWVKQSPGQGLEWIGR INPNNGVTLYNQKFKDRVTMTRDTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCARSTMI TNYVMDYWGQGTLVTVSS
04	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSTGYMHWVRQAPGQGLEWMG RINPNNGVTLYNQKFKDRVTMTRDTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCARST MITNYVMDYWGQGTLVTVSS
05	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSTGYMHWVRQAPGQGLEWMG RINPNNGVTLYNQKFKDRVTITRDTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSTM ITNYVMDYWGQGTLVTVSS
06	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSTSYMHWVKQSPGQGLEWIGR INPNNGVTLYNQKFKDRVTMTRDTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCARSTMI TNYVMDYWGQGTLVTVSS
07	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSTGYMHWVKQSPGQGLEWIG WINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCARST MITNYVMDYWGQGTLVTVSS
08	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYSTGYMHWVRQAPGQGLEWMG RINPNNGVTLYNQKFKDKFVFLDTSVSTAYLQICSLKAEDTAVYYCARSTM ITNYVMDYWGQGTLVTVSS

SEQ ID	Secuencia
09	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYSFTGYMHWRQAPGKGLEWMG RINPNNGVTLYNQKFKDKVTMTEDTSTD TAYMELSSLRSED TAVYYCATST MITNYVMDYWGQGTLVTVSS
10	QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSCKASGYSFTGYMHWRQARGQRLEWIG RINPNNGVTLYNQKFKDKVTITRDMSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAAST MITNYVMDYWGQGTLVTVSS
11	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYMHWRQAPGQRLEWMG RINPNNGVTLYNQKFKDKVTITRDTASTAYMELSSLRSED TAVYYCARSTM ITNYVMDYWGQGTLVTVSS
12	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYSFTGYMHWRQAPGQGLEWMG RINPNNGVTLYNQKFKDKVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARST MITNYVMDYWGQGTLVTVSS
13	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYSFTGYMHWRQAPGQGLEWMG RINPNNGVTLYNQKFKDKVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARST MITNYVMDYWGQGTLVTVSS
14	QVKLQQSGPGLVTPSQSL SITCTVSGYSFTGYMHWRQSPGQGLEWLGR I NPNNGVTLYNQKFKDKKSISKDNSKSQVFLKMNSLQADD TAVYYCARSTMI TNYVMDYWGQGTTVTVSS
15	QVQLQESGPGLVKPSQTL SLTCTVSGYSFTGYMHWRQPPGKGLEWIGRI NPNNGVTLYNQKFKDKVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAAD TAVYYCARSTMI TNYVMDYWGQGTLVTVSS
16	

SEQ ID	Secuencia
	DIVMTQTPTFLLVSACDRVTITCKASQSVSNDVAWYQQKPGQSPTLLISYTSS RYAGVPDRFIGSGYGTDFTFTISTLQAEDLAVYFCQQDYNSPPTFGGGTKLEI K
17	ASIVMTQTPTSLLVSAGDRVTITCKASQSVSNDVAWYQQKPGQSPKLLISYT SSRYAGVPDRFSGSGYGTDFTLTISSVQAEDAAVYFCQQDYNSPPTFGGGTK LEIK
18	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVSNDVAWYQQKPGQSPKLLISYTS SRYAGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYFCQQDYNSPPTFGGGTKL EIK
19	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVSNDVAWYQQKPGQPPKLLIYYTS SRYAGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQDYNSPPTFGGGTKL EIK
20	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASQGIRNDLGWYQQKPGQPPKLLIYYTS SRYAGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQDYNSPPTFGGGTKL EIK
21	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVSNDVAWYQQKPGQPPKLLIYAAS SLQSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQDYNSPPTFGGGTKL EIK
22	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVSNDVAWYQQKPGKAPKRLIYYTS SRYAGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQDYNSPPTFGGGTKLEI K
23	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVSNDVAWYQQKPGQPPKLLIYYTS SRYAGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQDYNSPPTFGGGTKL EIK

SEQ ID	Secuencia
24	EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCKASQSVSNDVAWYQQKPGKAPKLLIYYTSS RYAGVPSRFSGSGSGAEFTLTISSLQPDDFATYYCQQDYNSPPTFGQGTKLTV L
25	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCKASQSVSNDVAWYQQKPGQAPRLLIYDAS NRATGIPARFSGSGPGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWHFGQGTKVEIK
26	QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGKGLEWIGY INPSRGYTNYNQKVKDRFTISRDN SKNTAFLQMDSL RPEDTGVYFCARYYD DHYCLDYWGQGTPVTVSS
27	QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGKGLEWIGY INPSRGYTNYNQKVKDRFTISRDN SKNTAFLQMDSL RPEDTGVYFCARYYD DHYSLDYWGQGTPVTVSS
28	DVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGQGLEWIG YINPSRGYTN YADSVKGRFTITTDKSTSTAYMELSSLRSED TATYYCARYYD DHYCLDYWGQGTTVTVSS
29	QVQLVQSGAELKKPGASVKVSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGQCLEWMG YINPSRGYTNYNQKFKDKATLTADKSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARYY DDHYSLDYWGQGTLVTVSS
30	QVQLVESGGGVVPGRSLRLSCAASGFKFSGYGMHWVRQAPGKGLEWVA VIWYDGSKKYYVDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQ MGYWHFDLWGRGTLVTVSS
31	

SEQ ID	Secuencia
	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTSYTMHWVKQRPGQGLEWIGY INPSSGYTKYNQKFKDKATLTADKSSSTAYHQLSSLTSEDSAVYYCARWQD YDVYFDYWGQGT
32	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYTMNWVRQAPGKGLEWVAL INPYKGVTTYADSVKGRFTISVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGY YGDSDWYFDVWGQGT
33	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFISYTMHWVKQRPGQGLEWIGYI NPRSGYTHYNQKLKDKATLTADKSSSSAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSAYY DYDGFAYWGQGT
34	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSK LASGVPSRFSGSGSGTDYFTFTISLQPEDATYYCQQWSSNPFTFGQGTKLQIT
35	QIVLTQSPAISASPGKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSK LASGVPAHFRGSGSGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLE IN
36	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSYMNWYQQKPGKAPKRWIYDTS KVASGVPARFSGSGSGTDYSLTINSLEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGGGTKV EIK
37	DIQLTQSPSILSASVGDRVTITCRASSSVSYMNWYQQKPGKAPKRWIYDTSK VASGVPIRFSGSGSGTEYTLTISSMQPEDFATYYCQQWSSNPFTFGCGTKVEI KRT
38	

SEQ ID	Secuencia
	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPPLTFGGGTKVEI K
39	QIVLSQSPALLSASPGEKVTMTCRASSSYMHYQQKPGSSPKPWIYATSNLA SGVPARFSGSGSGTSSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSSNPPTFGGGGTKLET
40	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTS RLESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKV EIK
41	QIVLTQSPAIMASASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYKQKSGTSPKRWTYDTS KLASGVPARFSGSGSGTSSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPPTFGSGTKL EIK
42	EVQLQQSGPDLVKPGASVKISCKASGYSFTGYMHVVKQSPGKGLEWIGRI NPNNGVTLYNQKFKDKATLTVDKSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCARSTMI TNYVMDYWGQGTSTVTVSSASGGGGSGGGGSGGGGSAGASIVMTQTPTSL VSAGDRVTITCKASQSVSNDAWYQQKPGQSPKLLISYTSSRYAGVPDRFSG SGYGTDFTLTISSVQAEDAAVYFCQQDYNSPPTFGGGGTKLEIK
43	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYMHVVKQSPGQGLEWIGRI INPNNGVTLYNQKFKDRVTMTTRDTSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCARSTMI TNYVMDYWGQGTSLTVTVSSASGGGGSGGGGSGGGGSAGDIVMTQSPDSLAV SLGERATINCKASQSVSNDAWYQQKPGQPPKLLIYYTSSRYAGVPDRFSGS GSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQDYNSPPTFGGGGTKLEIK
44	

SEQ ID	Secuencia
	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSTSYMHVVKQSPGQCLEWIGR INPNNGVTLYNQKFKDRVTMTRDTSISTAYMELSLRSDDTAVYYCARSTMI TNYVMDYWGQGTLVTVSSASGGGGSGGGGSGGGGSAGDIVMTQSPDSLAV SLGERATINCKASQSVSNDAWYQQKPGQPPKLLIYYTSSRYAGVPDRFSGS GSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQDYNSPPTFGCGTKLEIK
45	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIG YINPSRGYTNYNQKFKDKATLTDDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYY DDHYCLDYWGQGTTTLTVSSASGGGGSGGGGSGGGGSAGQIVLTQSPAIMSA
	SPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPAHFRGS GSGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEIN
46	QVQLVQSGAELKKPGASVKVSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGQGLEWMG YINPSRGYTNYNQKFKDKATLTADKSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARYY DDHYSLDYWGQGTLVTVSSASGGGGSGGGGSGGGGSAGDIQLTQSPSILSA SVGDRVTITCRASSSVSYMNWYQQKPGKAPKRWIYDTSKVASGVVPYRFSGS GSGTEYTLTISSMQPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGGTKVEIK
47	QVQLVQSGAELKKPGASVKVSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGQCLEWMG YINPSRGYTNYNQKFKDKATLTADKSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARYY DDHYSLDYWGQGTLVTVSSASGGGGSGGGGSGGGGSAGDIQLTQSPSILSA SVGDRVTITCRASSSVSYMNWYQQKPGKAPKRWIYDTSKVASGVVPYRFSGS GSGTEYTLTISSMQPEDFATYYCQQWSSNPLTFGCGTKVEIK
48	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSTGYTMNWVRQAPGKCLEWVAL INPYKGVTTYADSVKGRFTISVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGY YGDSDWYFDVWGQGTLVTVSSASGGGGSGGGGSGGGGSAGDIQMTQSPSS LSASVGDRVTITCRASQDIRNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLESGVPSRFS GSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNLTPWTFGCGTKVEIK

SEQ ID	Secuencia
49	EVQLQQSGPDLVKPGASVKISCKASGYSFTGYMHVVKQSPGKGLEWIGRI NPNNGVTLYNQKFKDKATLTVDKSSTTAYMELRSLTSEDSAVYYCARSTMI TNYVMDYWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTGPGGGSPGQVQLVQSGAELKKPGASVKVS CKASGYTFTRYTMHWVRQAPGQCLEWMGYINPSRGYTNYNQKFKDKATL TADKSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARYYDDHYSLDYWGQGTSLTVSSA SGGGGSGGGGSGGGGSAGDIQLTQSPSILSASVGDRVITITCRASSSVSYMNW YQQKPGKAPKRWIYDTSKVASGVPIYRFSGSGSGTEYTLTISSMQPEDFATYY CQQWSSNPLTFGCGTKVEIK
50	SIVMTQTPTSLLVSAGDRVITITCKASQSVSNDVAWYQQKPGQSPKLLISYTSS RYAGVPDRFSGSGYGTDFTLTISSVQAEDAAYVFCQQDYNSPPTFGGGTKLE IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGECGPGGGSPGEVQLVQSGPDDVKPGGSVKISCKASGYSFTGYMHVVK KQSPGKCLEWIGRINPNNGVTLYNQKFKDKATLTVDKSSTTAYMELRSLTSE DSAVYYCARSTMITNYVMDYWGQGTSLTVSSASGGGGSGGGGSGGGGSA GDIVMTQTPTSLLVSAGDRVITITCKASQSVSNDVAWYQQKPGQSPKLLISYT SSRYAGVPDRFSGSGYGTDFTLTISSVQAEDAAYVFCQQDYNSPPTFGCGTK LEIKSG
51	

SEQ ID	Secuencia
	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSTSYMHVVKQSPGQGLEWIGR INPNNGVTLYNQKFKDRVTMTRDTSISTAYMELSLRSDDTAVYYCARSTMI TNYVMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTGPGGGSPGQVQLVQSGAELKKPGASVKVS CKASGYTFTRYTMHWVRQAPGQCLEWMGYINPSRGYTNYNQKFKDKATL TADKSTSTAYMELSLRSDDTAVYYCARYYDDHYSLDYWGQGTLVTVSSA SGGGGSGGGGSGGGGSAGDIQLTQSPSILSASVGDRVITITCRASSSVSYMNW YQQKPGKAPKRWIYDTSKVASGVPIYRFSGSGSGTEYTLTISSMQPEDFATYY CQQWSSNPLTFGCGTKVEIKSG
52	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVSNDAWYQQKPGQPPKLLIYYTS SRYAGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQDYNSPPTFGGGTKL EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGECGPGGGSPGQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSTSYMHV VKQSPGQCLEWIGRINPNNGVTLYNQKFKDRVTMTRDTSISTAYMELSLRSD DDTAVYYCARSTMITNYVMDYWGQGTLVTVSSASGGGGSGGGGSGGGGS AGDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVSNDAWYQQKPGQPPKLLIY YTSSRYAGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQDYNSPPTFGCG TKLEIKSG

REIVINDICACIONES

1. Heterodímero de proteínas de fusión que comprende dos cadenas diferentes:

5 primera cadena: VH(5T4)-CH1-L1-VH(CD3)-L2-VL(CD3) combinada con
segunda cadena: VL(5T4)-CL-L1-VH(5T4)-L2-VL(5T4),
donde VH, VL son dominios de unión variables de anticuerpo, CH1 y CL son dominios constantes de
anticuerpo y L1 y L2 son porciones conectoras, y donde el heterodímero de proteínas de fusión contiene una
10 interacción heterodimérica entre el CH1 de la primera cadena y el dominio constante de anticuerpo CL de la
segunda cadena, y el heterodímero de proteínas de fusión es tal que (a) dos dominios de unión VH/VL
combinados formados dentro de dicho heterodímero de proteínas de fusión son capaces de unirse al
antígeno 5T4 extracelular; y (b) el dominio de unión VH/VL combinado restante formado dentro de dicho
heterodímero de proteínas de fusión es capaz de unirse al complejo receptor CD3 en linfocitos T, donde la
15 primera cadena comprende o tiene la SEQ ID N.º 51, y donde la segunda cadena comprende o tiene la SEQ
ID N.º 52.

2. Secuencia de ácido nucleico que codifica un heterodímero de proteínas de fusión como se define en la
reivindicación 1.

20 3. Vector, que comprende una secuencia de ácido nucleico tal como se define en la reivindicación 2.

4. Célula hospedadora transformada o transfectada con la secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 2 o
un vector definido en la reivindicación 3.

25 5. Proceso para la producción de un heterodímero de proteínas de fusión según la reivindicación 1, donde dicho
procedimiento comprende cultivar una célula hospedadora definida en la reivindicación 4 en condiciones que
permitan la expresión de las proteínas de fusión como se define en la reivindicación 1 y recuperar el
heterodímero producido de proteínas de fusión del cultivo.

30 6. Composición farmacéutica que comprende un heterodímero de proteínas de fusión según la reivindicación 1.

7. Composición farmacéutica según la reivindicación 6 o un heterodímero de proteínas de fusión según la
reivindicación 1 para su uso como medicamento, preferiblemente para su uso en la prevención, el tratamiento o
la mejora de una enfermedad seleccionada de entre una enfermedad proliferativa o una enfermedad tumoral,
preferiblemente en donde la enfermedad tumoral es un cáncer en donde el antígeno extracelular 5T4 se expresa
35 en células tumorales.

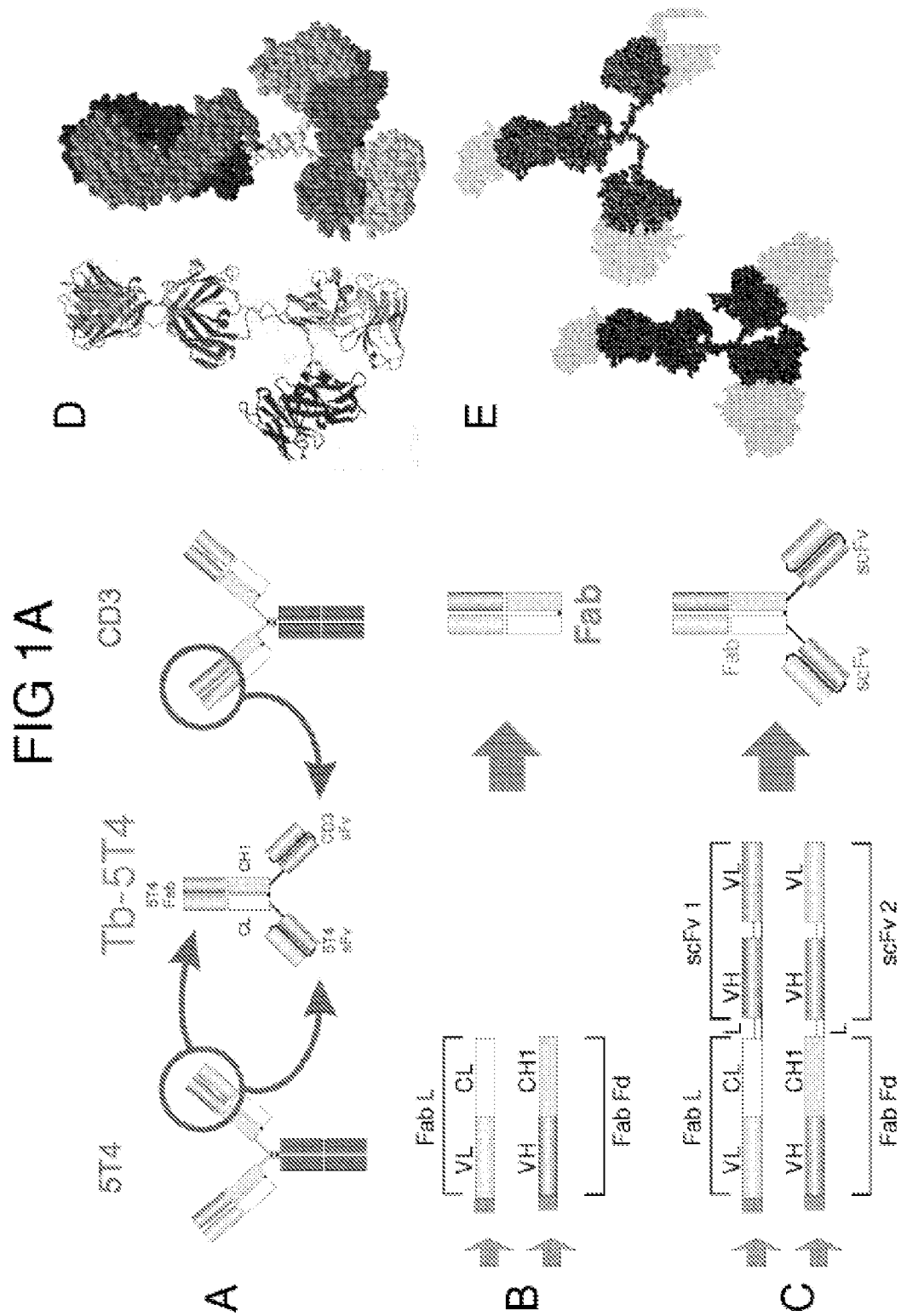


FIG 1C

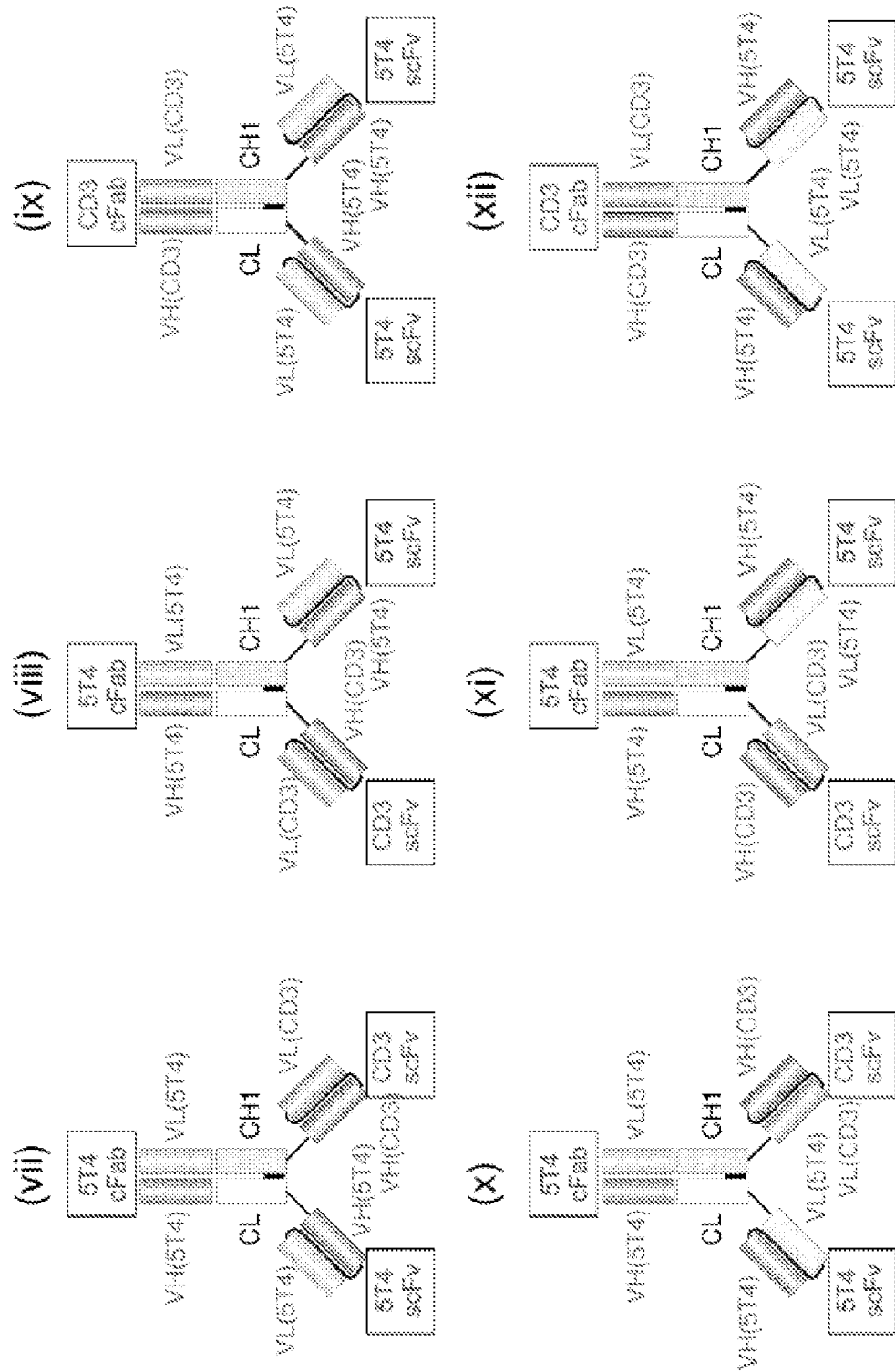


FIG 1D

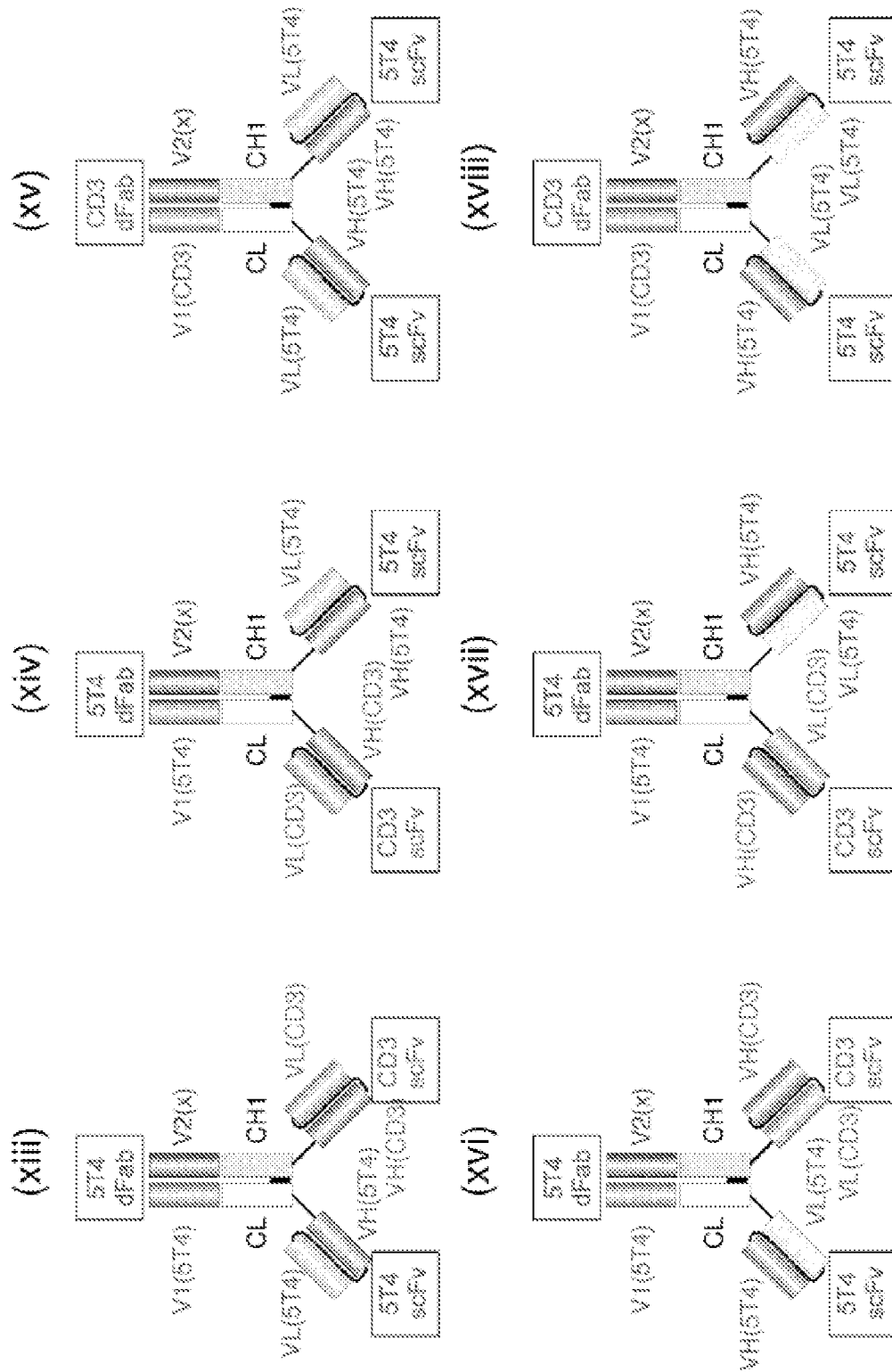


FIG 3

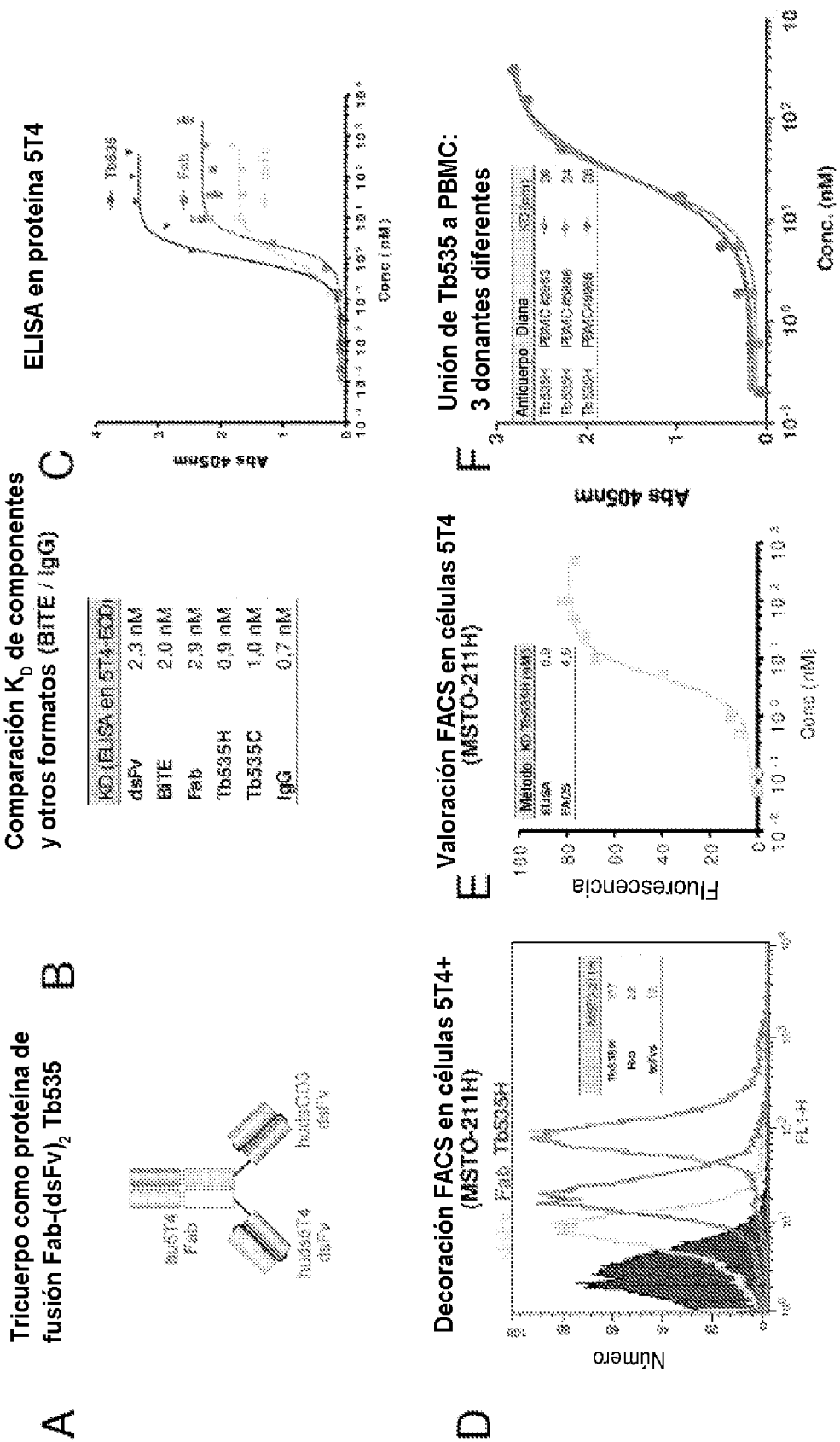


FIG 4A

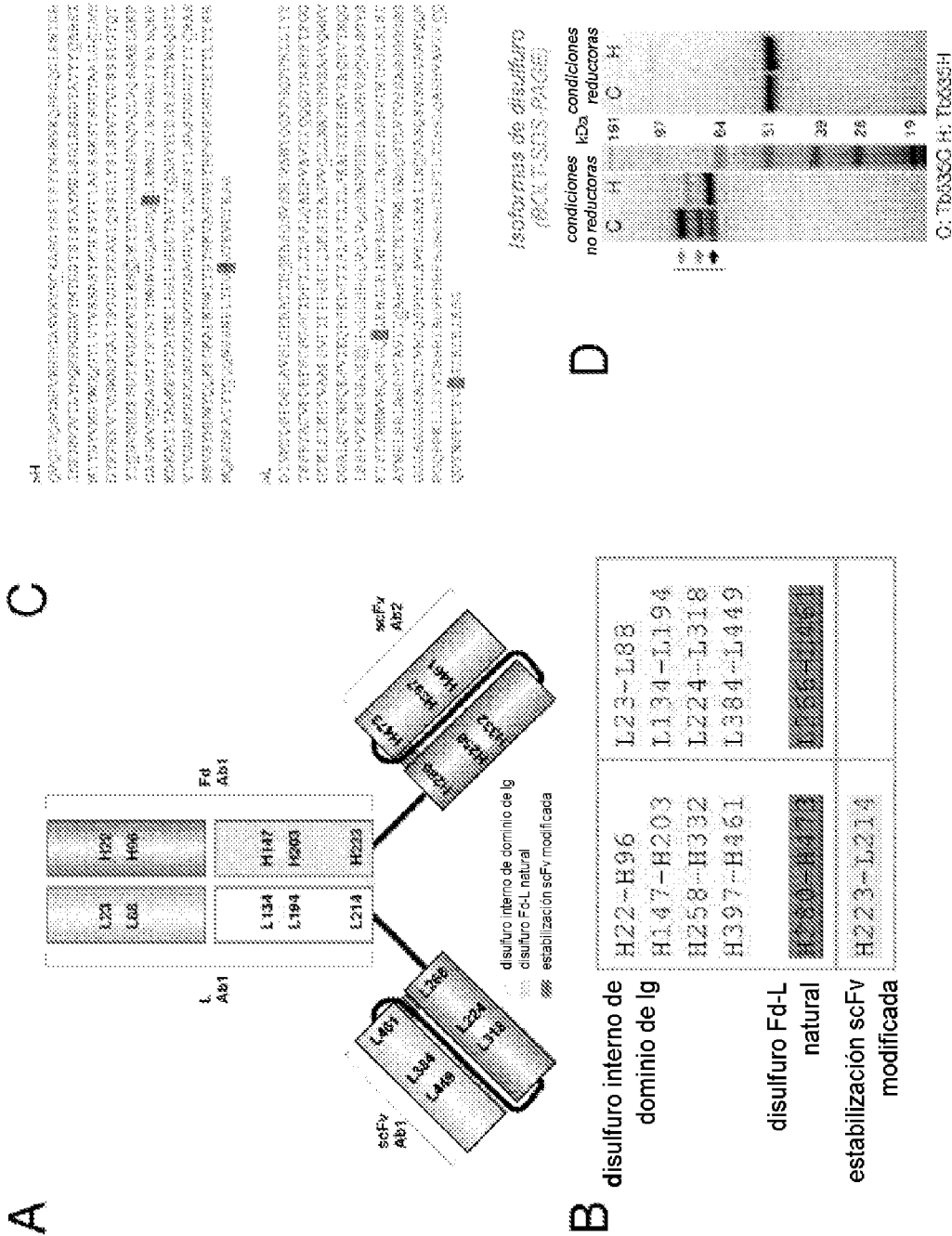


FIG 4B

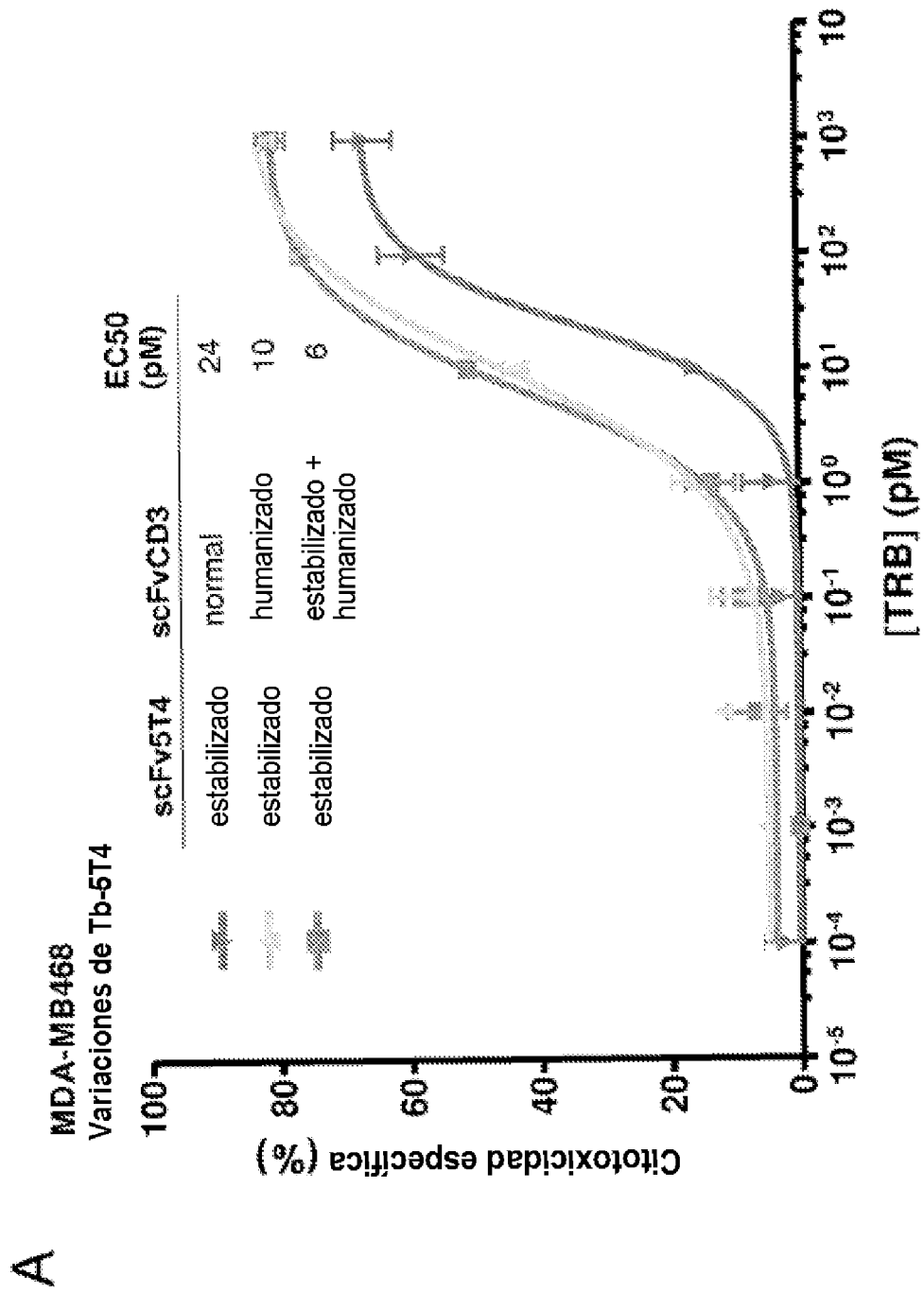


FIG 4B

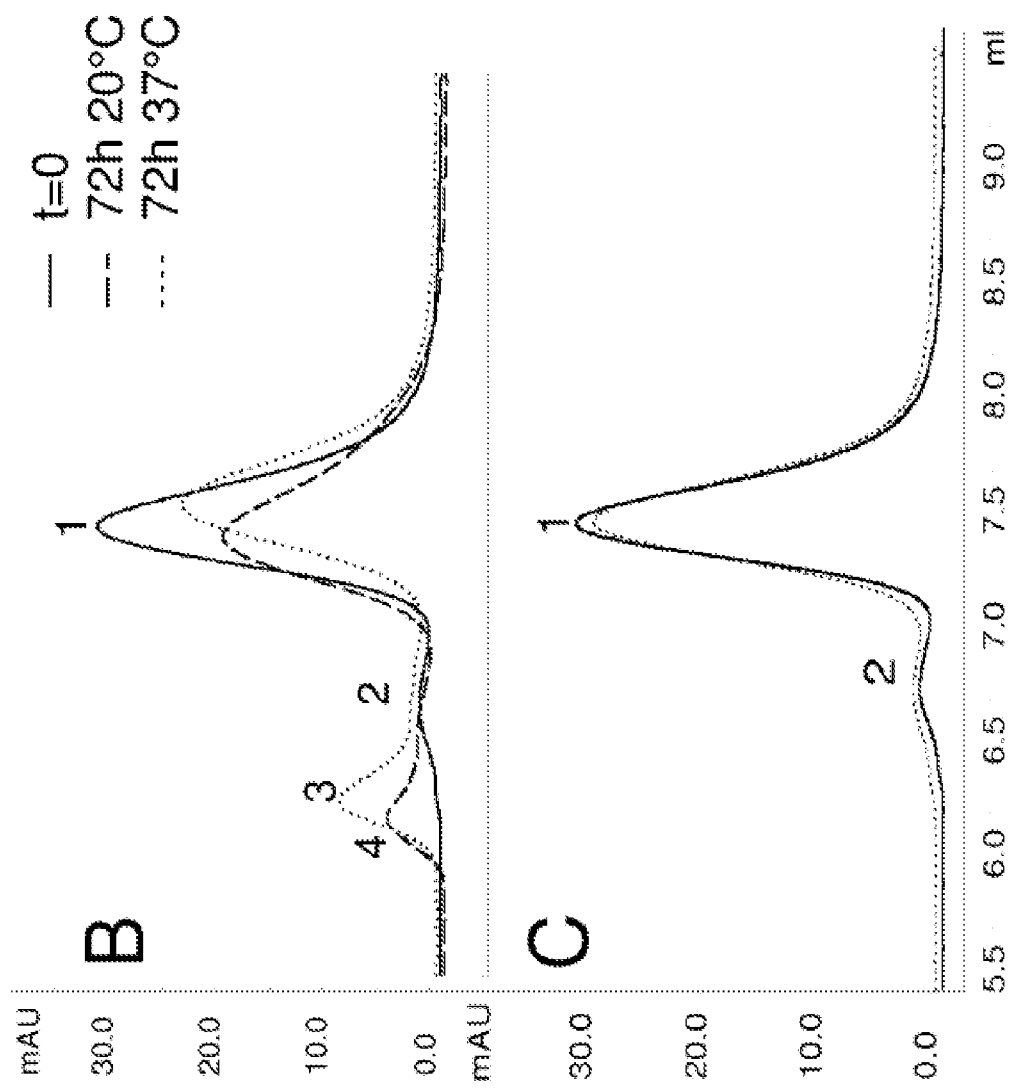


FIG 5

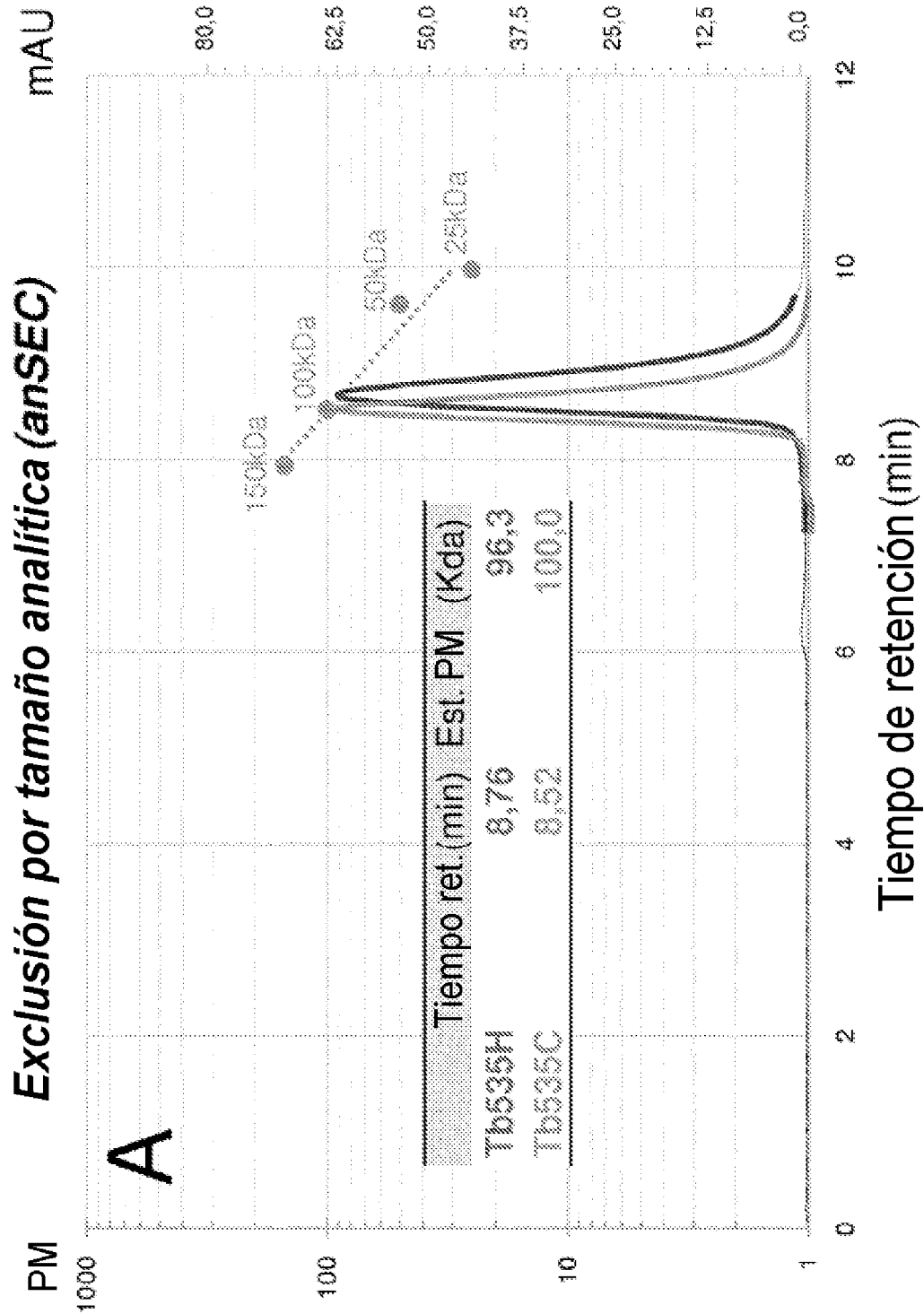


FIG 5

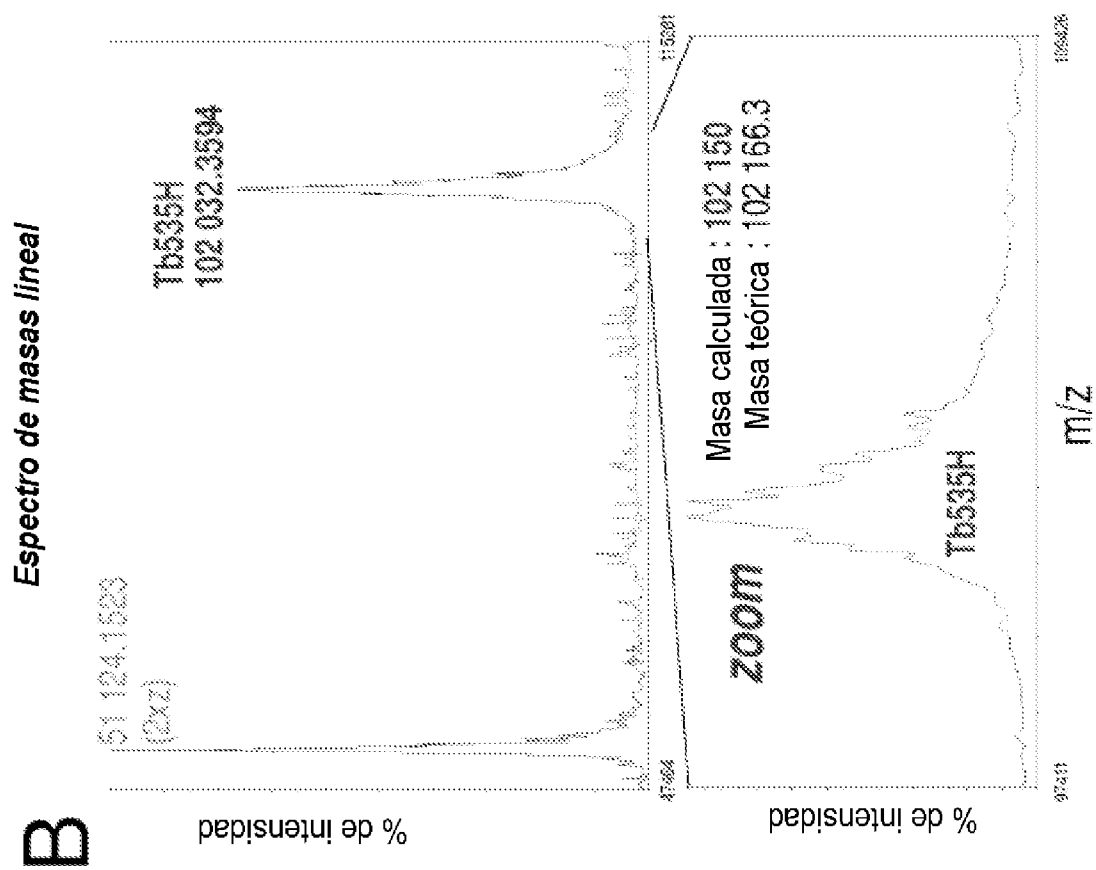


FIG 5

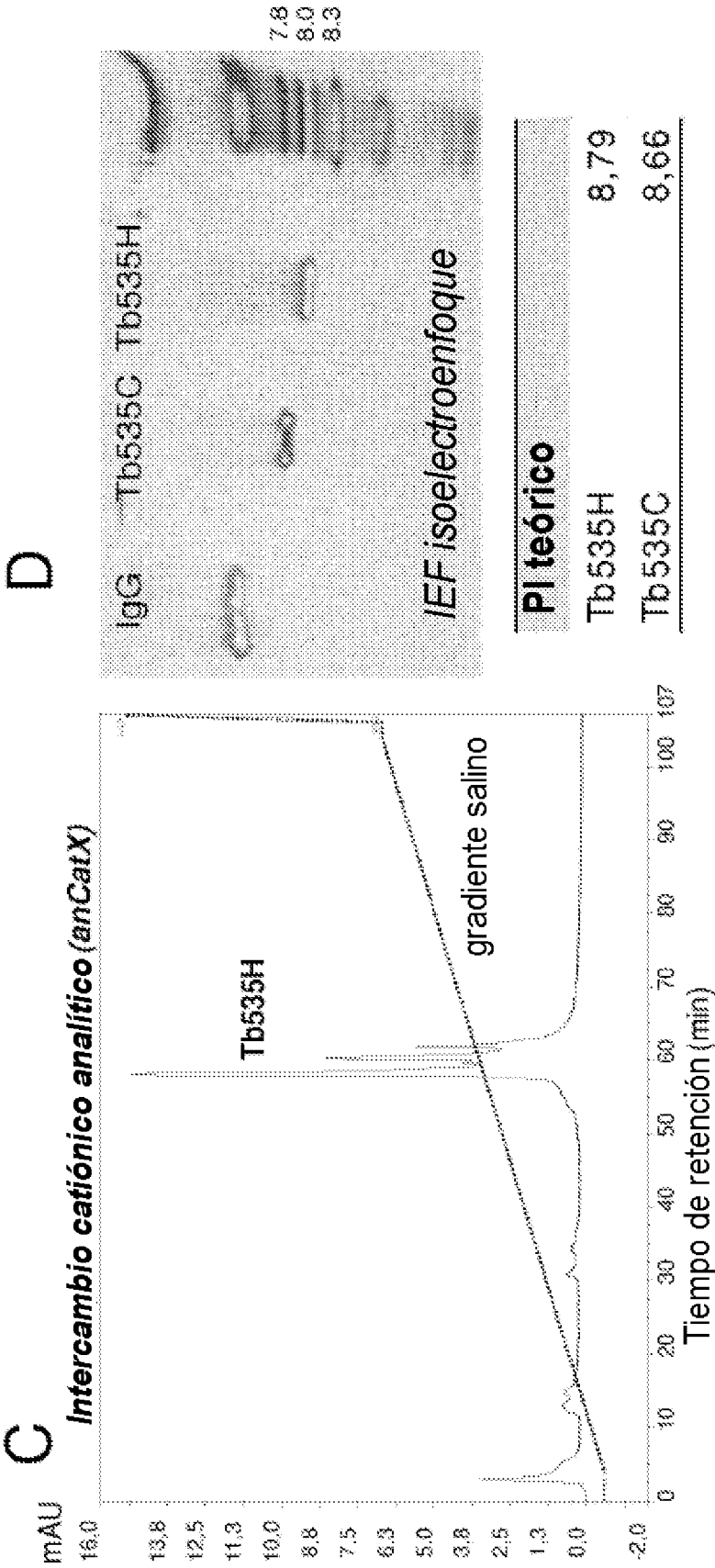


FIG 6A

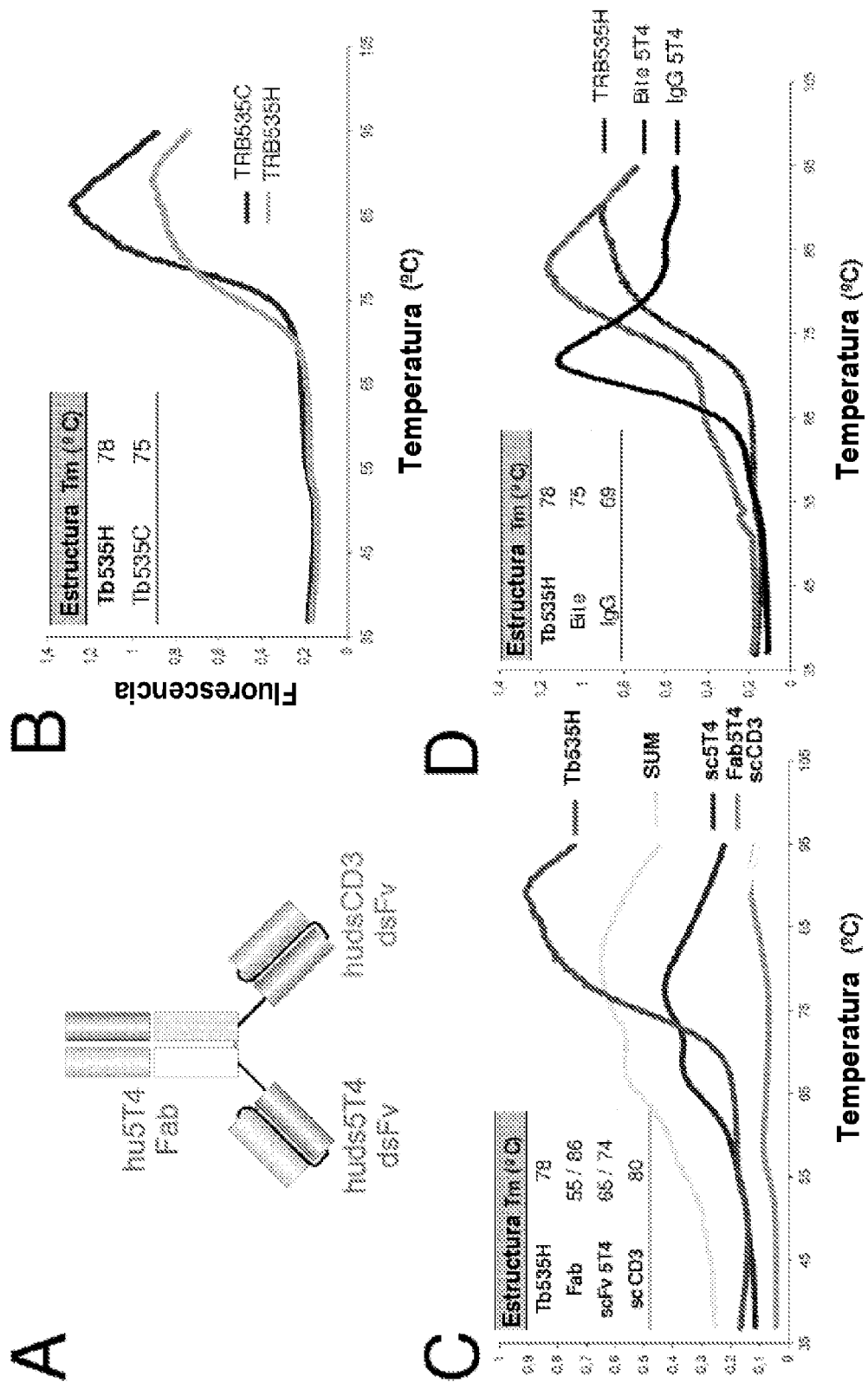


FIG 6B

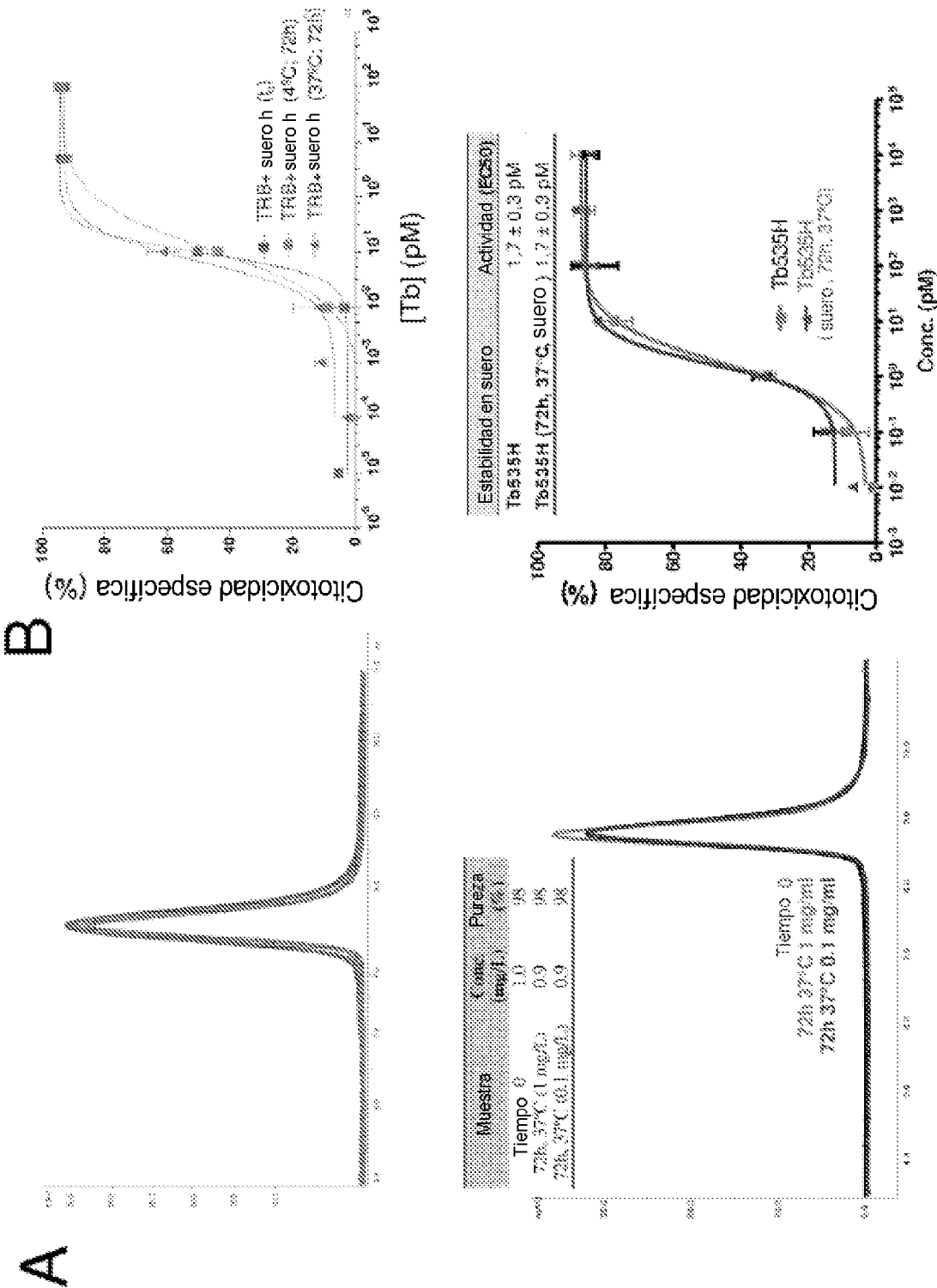


FIG 7

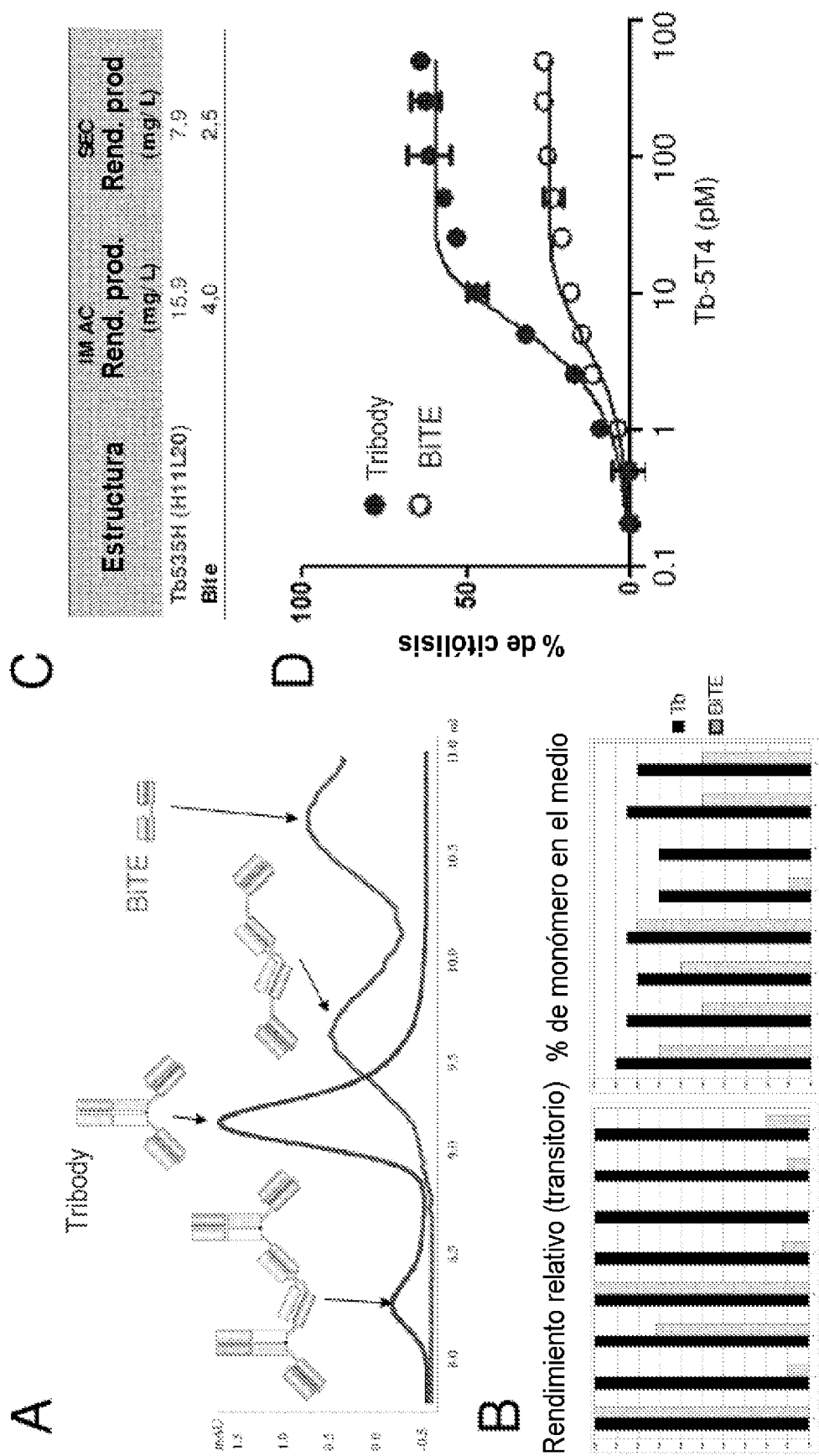


FIG 8

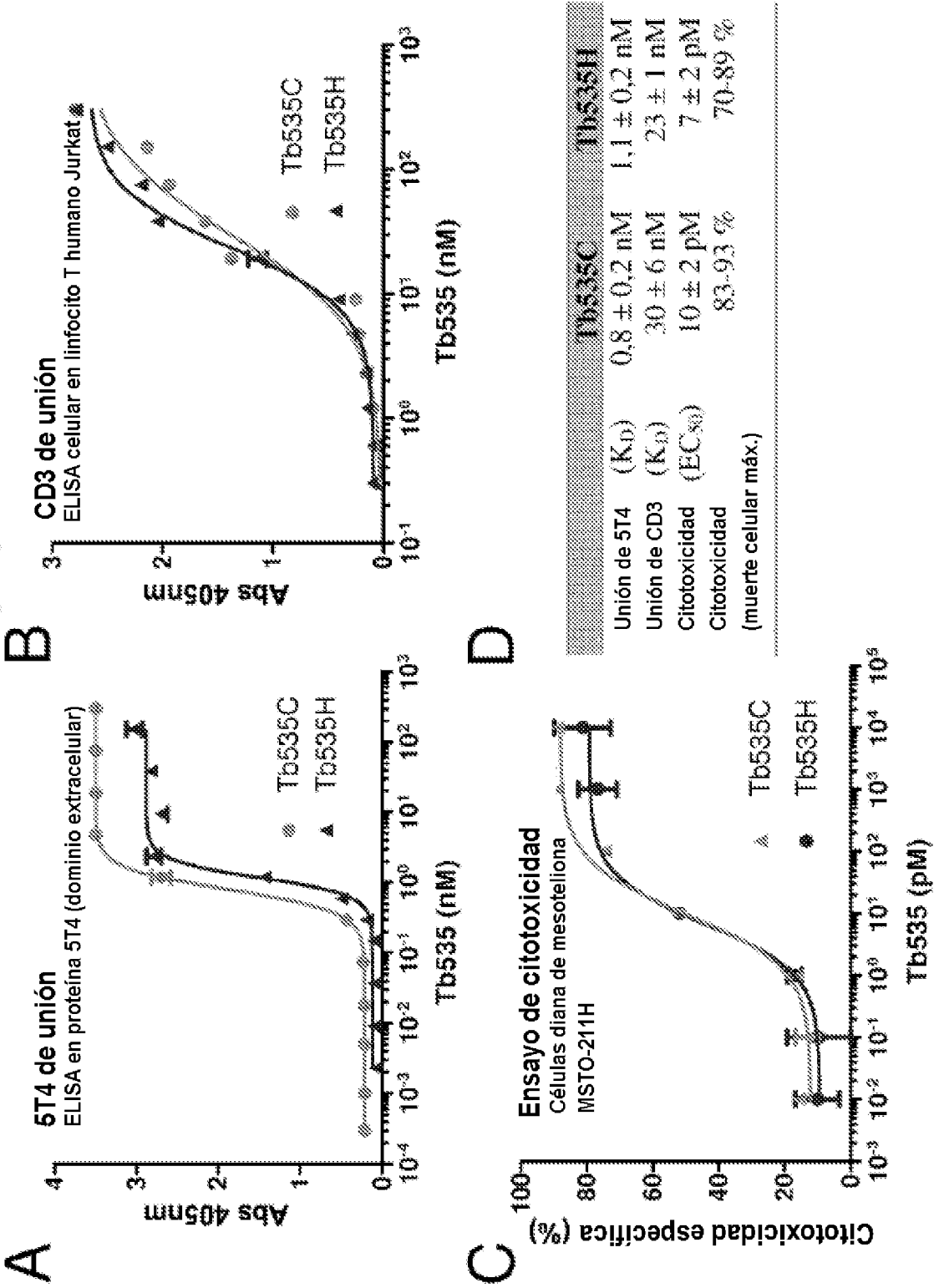


FIG 9

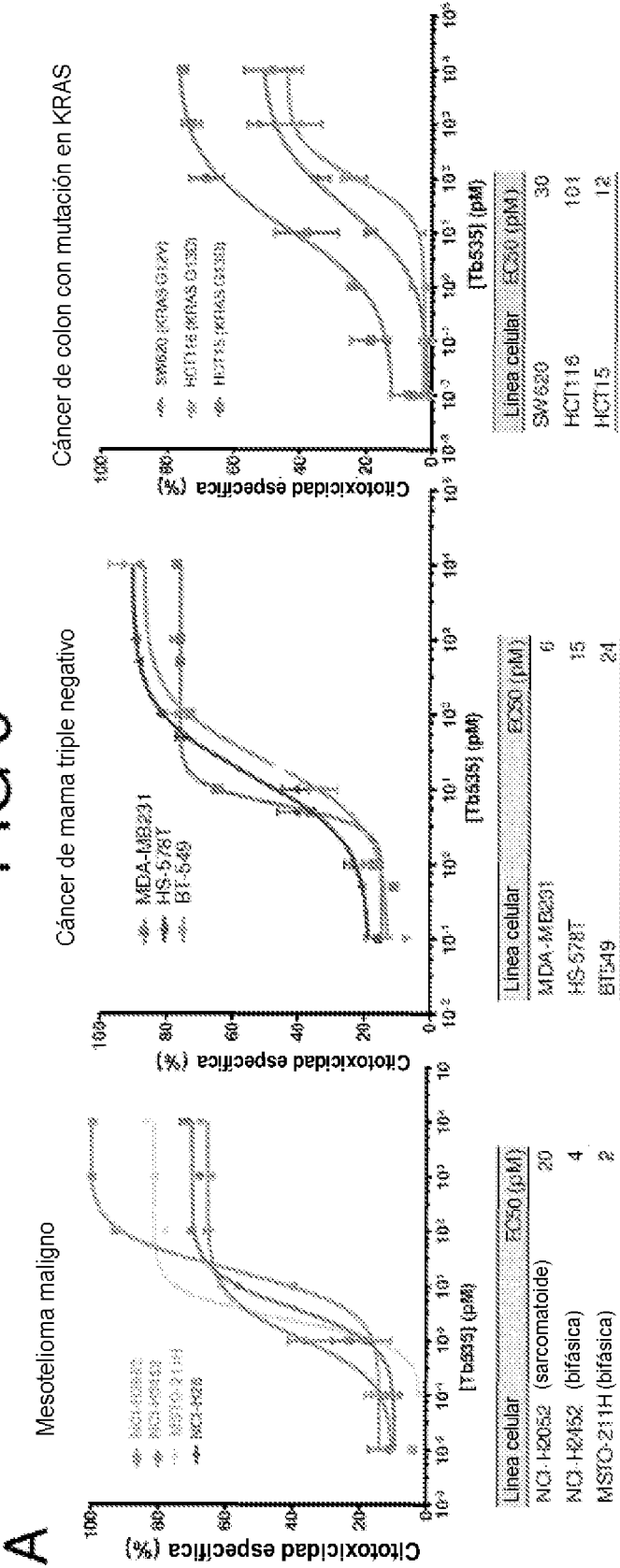


FIG 10

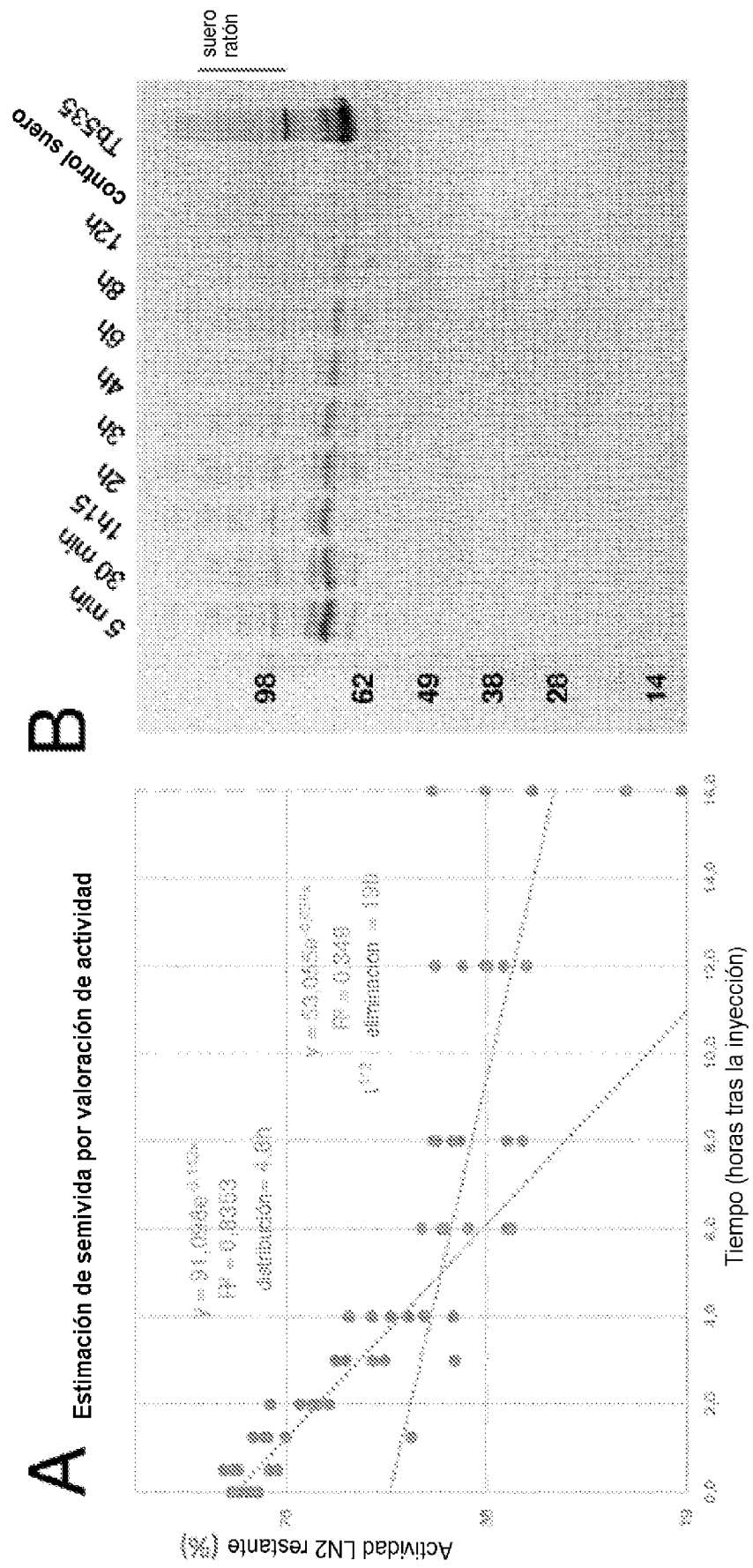


FIG 11A

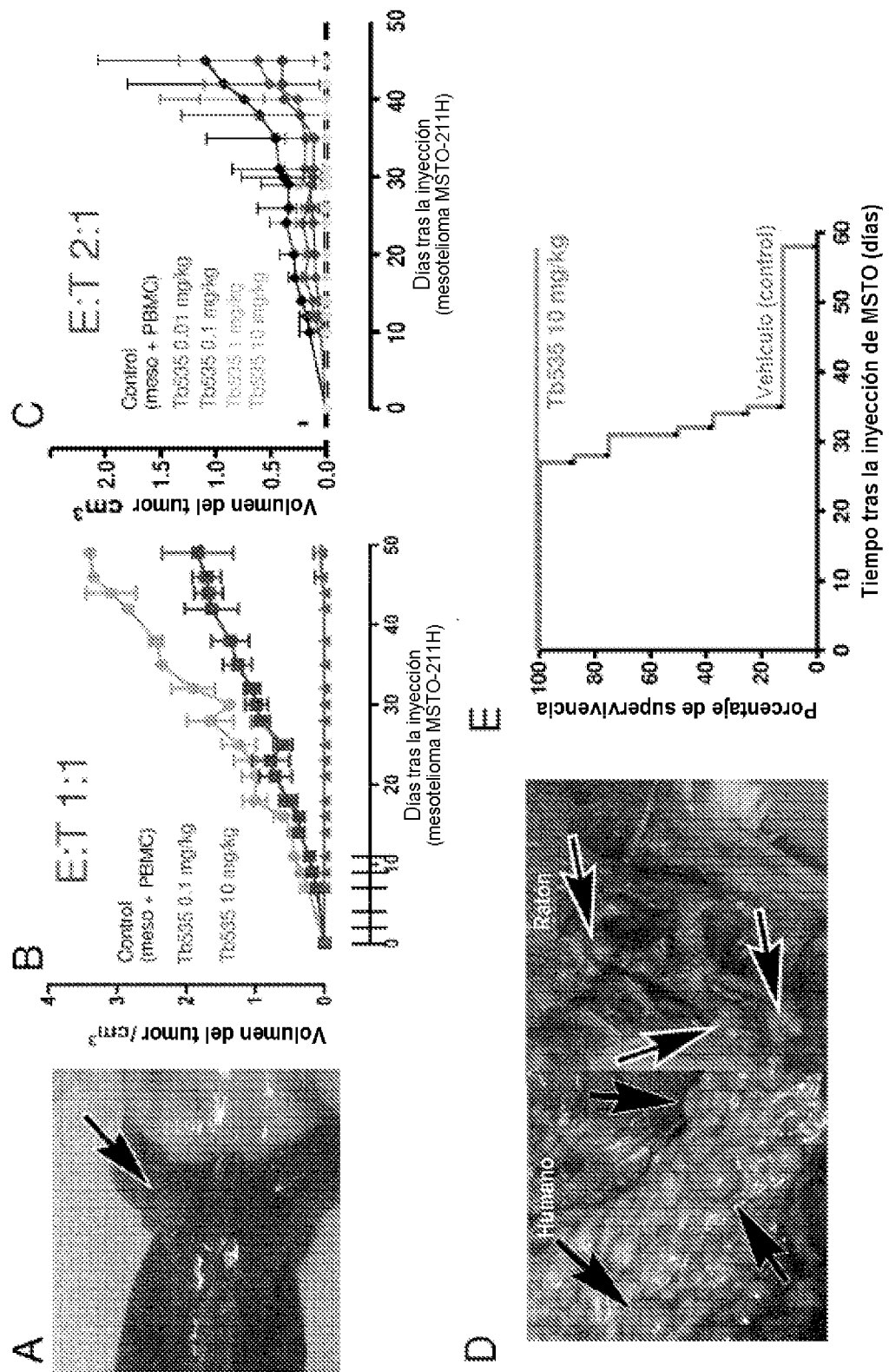


FIG 11B

Tratamiento de tumores establecidos

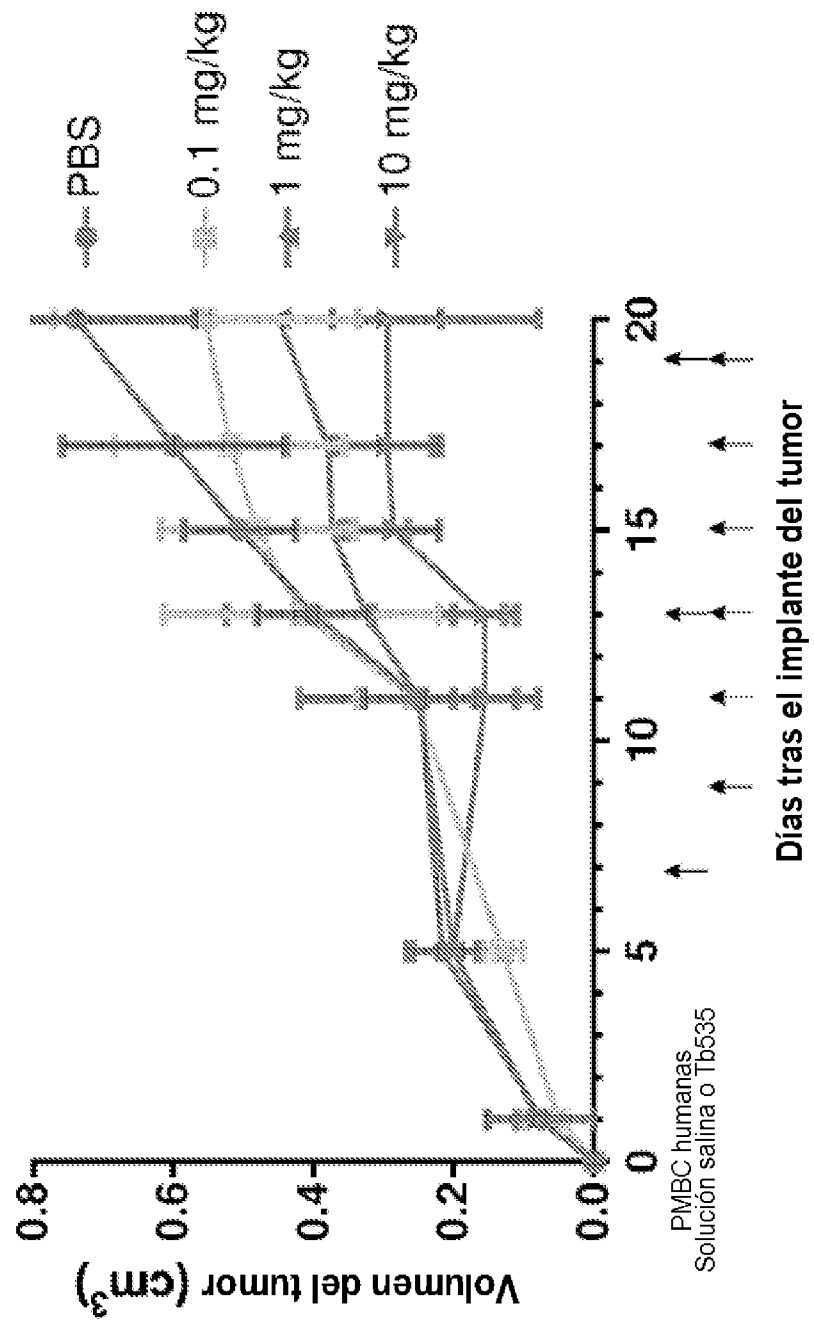


FIG 12A

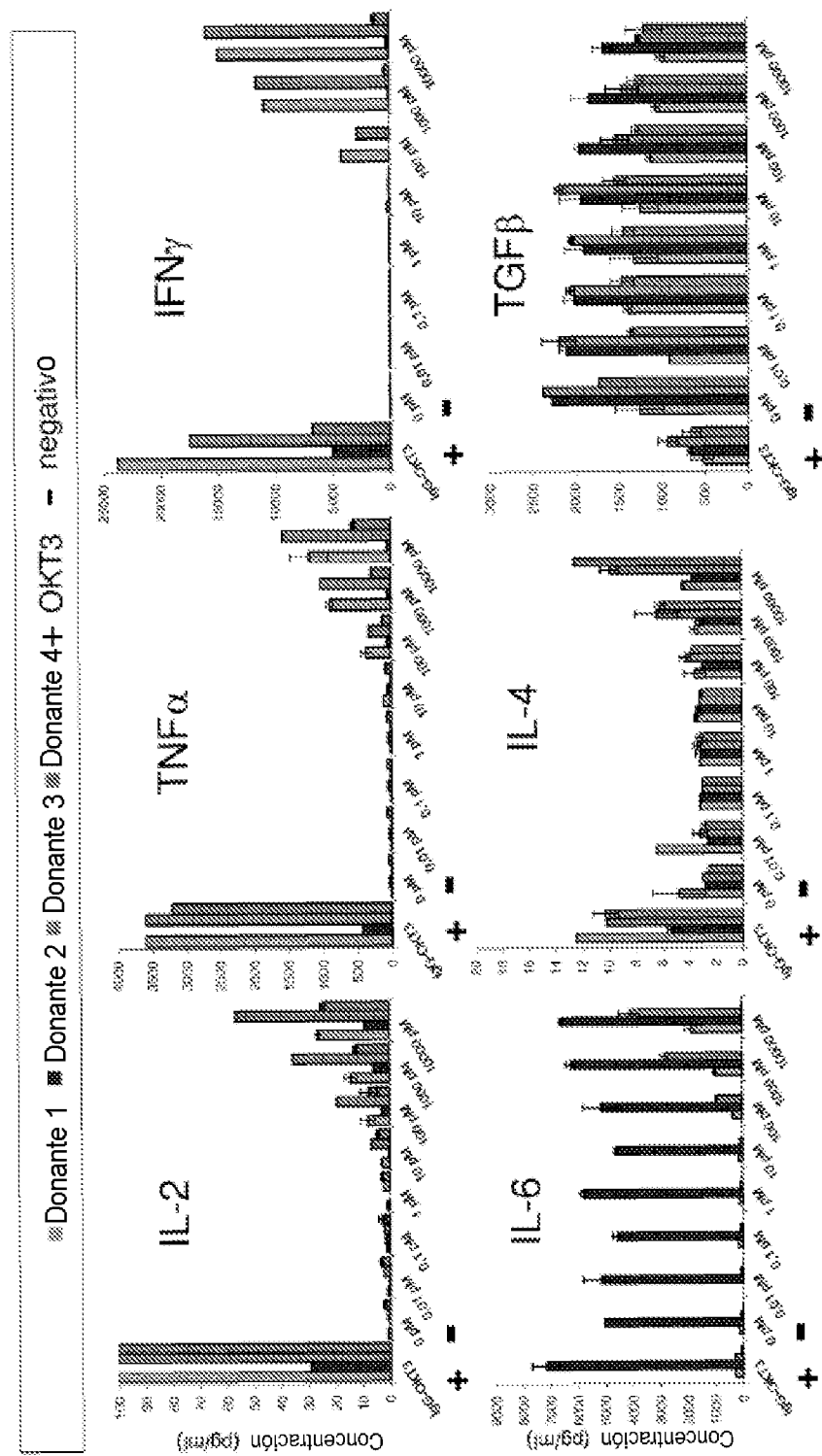


FIG 12B

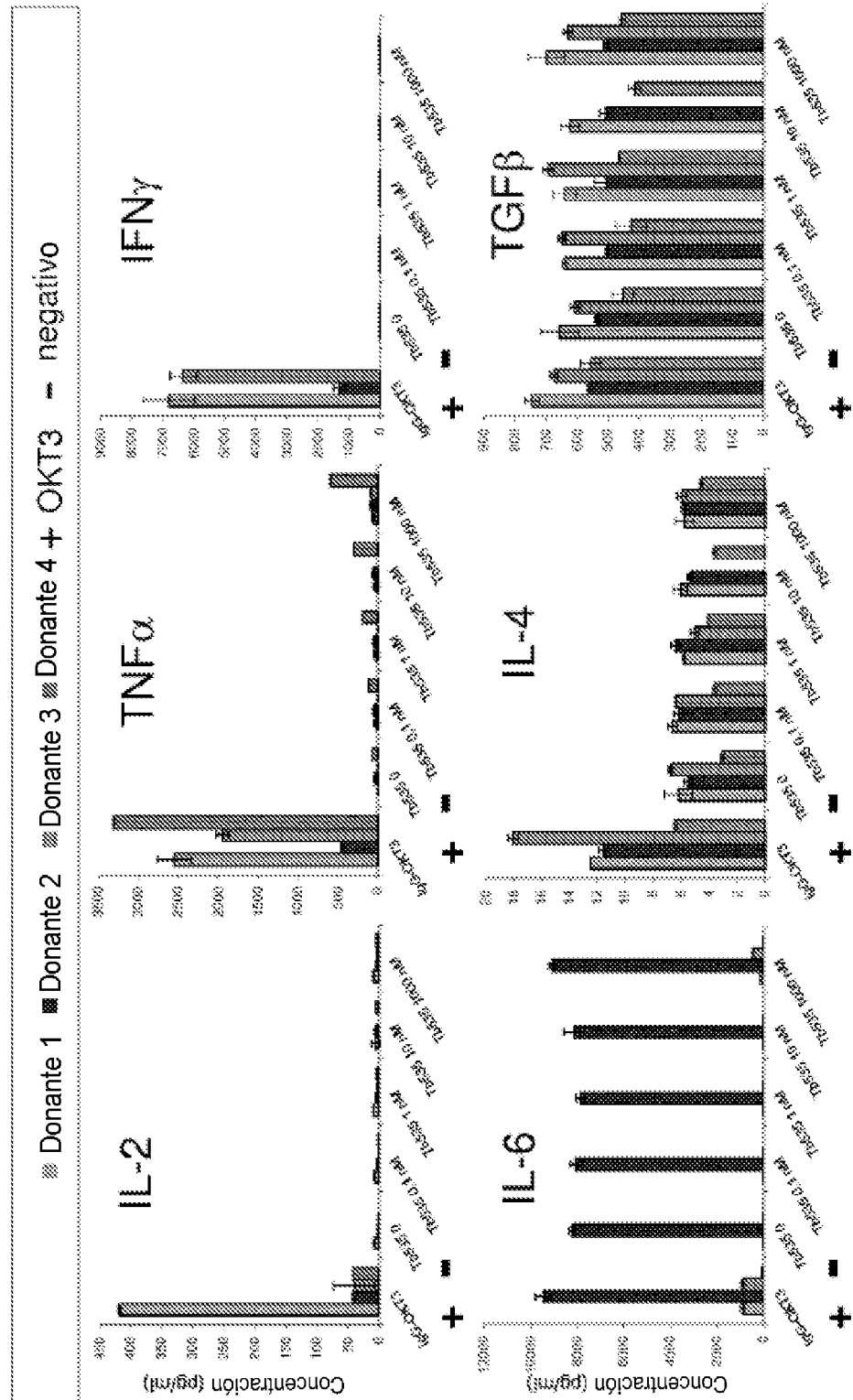


FIG 12C

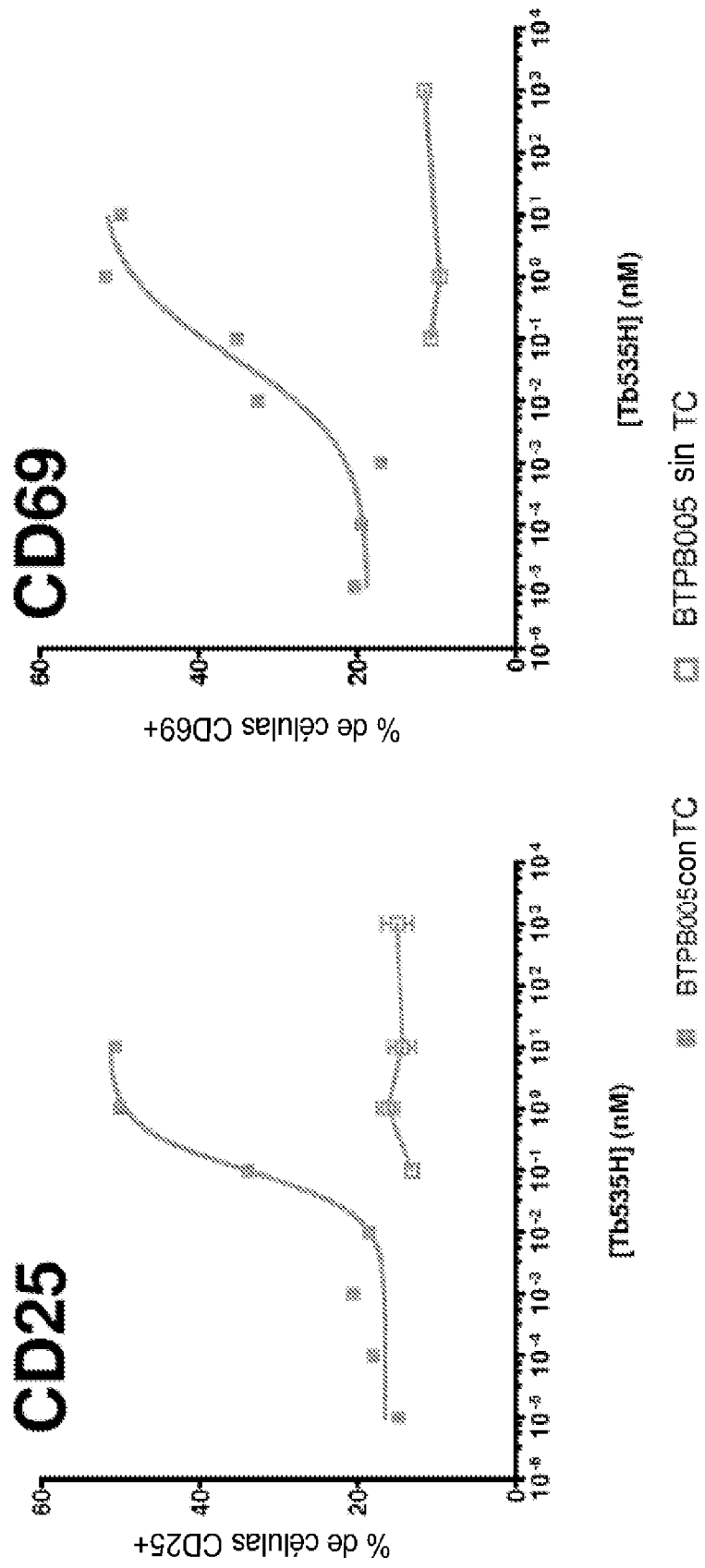


FIG 13

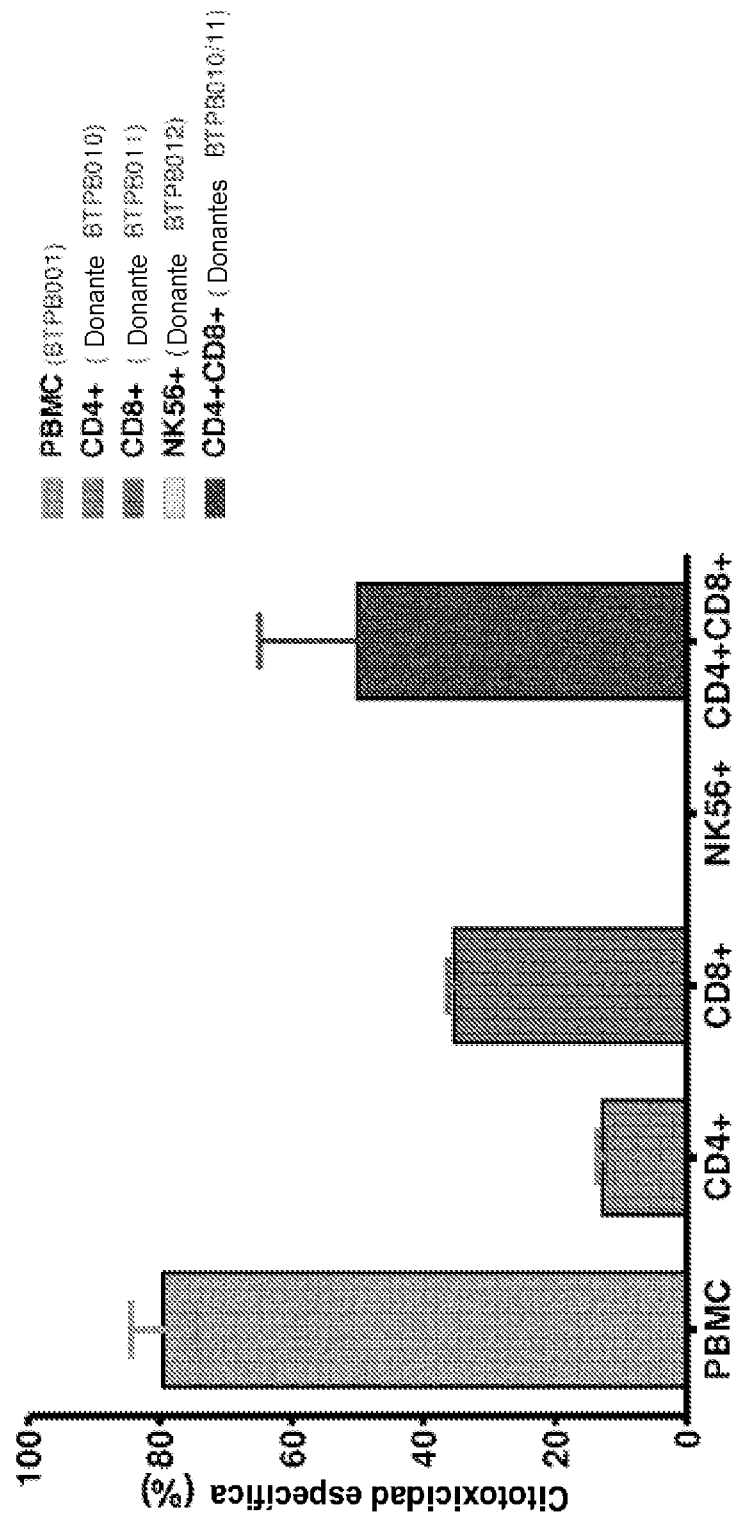


FIG 14A

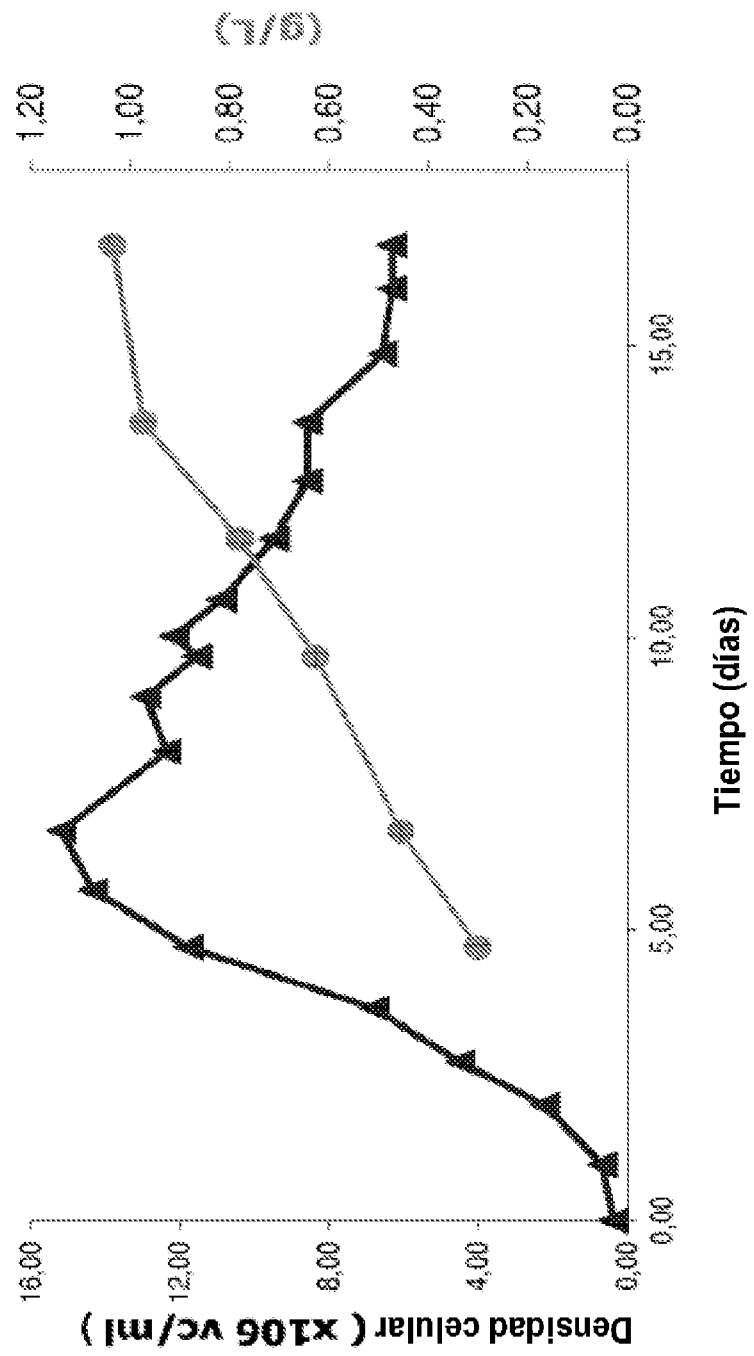


FIG 14B

