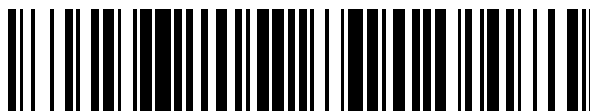


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 848 391**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.07.2016 PCT/EP2016/065577**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.01.2017 WO17001681**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.07.2016 E 16744669 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.11.2020 EP 3317300**

54 Título: **Anticuerpos biespecíficos para usar en la inmunoterapia del cáncer**

30 Prioridad:

01.07.2015 EP 15174741

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

09.08.2021

73 Titular/es:

**FONDAZIONE IRCCS ISTITUTO NAZIONALE DEI
TUMORI (100.0%)**

**Via Giacomo Venezian 1
20133 Milan, IT**

72 Inventor/es:

**FIGINI, MARIANGELA;
SATTÀ, ALESSANDRO;
GIANNI, ALESSANDRO MASSIMO y
DI NICOLA, MASSIMO**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 848 391 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos biespecíficos para usar en la inmunoterapia del cáncer

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al campo de la inmunoterapia contra el cáncer y, en particular, a fármacos que pueden superar la resistencia a los fármacos.

En particular, la presente invención se refiere a nuevos anticuerpos biespecíficos que tienen la capacidad de unirse tanto al TRAIL-R2 como al CD3 del linfocito T.

La invención se refiere además a composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos biespecíficos y al uso de los anticuerpos biespecíficos en el tratamiento de un tumor.

10 **Estado de la técnica**

Los tumores malignos son una de la mayores causas de muerte en los seres humanos y un gran problema de salud. En las últimas décadas, los científicos han desarrollado muchas terapias que, más allá de tener buenos resultados en estudios preclínicos, han tenido en muchas ocasiones una escasa o nula eficacia en ensayos clínicos posteriores, en muchos casos debido a la toxicidad o al desarrollo de resistencia a los fármacos. El descubrimiento del FasL, TNF α y el Ligando que induce apoptosis relacionada con TNF (TRAIL), citoquinas naturales miembros de la superfamilia del Factor de Necrosis Tumoral, abrieron nuevas posibilidades para el desarrollo de nuevas terapias contra el cáncer gracias a su capacidad de inducir apoptosis. Los dos primeros miembros de la superfamilia, FasL y TNF α , se consideraron para su uso como moléculas anticancerígenas.

20 Después de excelentes resultados iniciales en la erradicación de células tumorales *in vitro*, los tratamientos que usaron estas dos estrategias mostraron la aparición de efectos adversos graves *in vivo*, usando modelos pre-clínicos: el uso de TNF α provocó una fuerte respuesta inflamatoria, mientras que el uso de anticuerpos agonistas anti-Fas recombinantes causaron toxicidad hepática grave.

TRAIL es un ligando pro-apoptótico tumoral para el que, a diferencia del TNF α y el FasL, los estudios *in vivo* excluyen la toxicidad ya que son específicos de las células tumorales, manteniendo a las normales.

25 TRAIL-R1 y TRAIL-R2 se regulan ambos positivamente en muchas células tumorales, ya sea de forma natural o en respuesta a fármacos quimioterápicos particulares.

Se han iniciado ensayos clínicos con compuestos agonistas del receptor de TRAIL, como formas recombinantes de TRAIL y anticuerpos agonistas. El TRAIL recombinante tiene la capacidad de dirigirse a ambos receptores (TRAIL-R1 y TRAIL-R2) y, por lo tanto, tiene un mayor espectro de acción.

30 Por el contrario, los anticuerpos dirigidos contra TRAIL-R1 (mapatumumab) o TRAIL-R2 (drozitumab, conatumumab, lexatumumab y tigatuzumab) pueden reconocer solo un receptor y, por lo tanto, tienen un espectro de acción menor en comparación con TRAIL recombinante, pero tienen la ventaja de no ser secuestrados por los receptores señuelo TRAIL-R3 y TRAIL-R4 que tienen la función de secuestrar el ligando evitando la unión de TRAIL a los receptores funcionales.

35 Si bien los ensayos de fase I que probaron estos agentes fueron alentadores (la administración de la proteína recombinante en un subgrupo particular de pacientes fue segura y se han demostrado algunas actividades antitumorales con respuestas parciales o completas), los estudios clínicos aleatorizados de fase II no revelaron actividad anticancerígena. En la mayoría de los casos el fallo se debió a la presentación de resistencia por parte de las células tumorales.

40 Para evitar la resistencia, se han usado compuestos agonistas de TRAIL-R2 en asociación con fármacos denominados "sensibilizadores de TRAIL". Varios agentes quimioterápicos convencionales (como doxorubicina, carbo- o cis-platino, irinotecán, bortezomib) se consideran buenos "sensibilizadores de TRAIL" y mostraron buenos resultados preclínicos, pero fueron decepcionantes en los ensayos clínicos.

45 Después de la aparición de la tecnología recombinante, hubo un resurgimiento de los anticuerpos biespecíficos (BsAb) en la investigación médica. Estos anticuerpos son capaces de unirse simultáneamente a dos dianas diferentes y, por esta razón, podrían unir dos mecanismos de acción en una molécula o podrían potenciar una actividad. Se diseñaron más de 50 formatos diferentes de BsAb. Los BsAb se podrían usar con una estrategia de direccionamiento previo en imágenes radiológicas o en radio-inmunoterapia o mediante doble direccionamiento de dos antígenos diferentes sobre la misma célula o dos ligandos solubles, pero el uso más frecuente es para volver a dirigir las células inmunes hacia las células tumorales.

50 En particular, se obtuvieron buenos resultados con anticuerpos biespecíficos que son capaces de redirigir las células T para lisar células tumorales de una forma independiente del TCR (receptor de la célula T). Los ejemplos de estos

son Catumaxomab (EpCAM x CD3), hecho de una IgG producida con la tecnología del hibridoma híbrido, y Blinatumomab (CD19 x CD3), un Acoplador de Células T Biespecífico (BiTE). Ambas moléculas tienen la capacidad de unirse a un antígeno asociado a tumor y a CD3, la porción constante del receptor de células T. En particular, un BsAb de la clase BiTE, Blinatumomab, se aprobó por la FDA en Diciembre de 2014. Los BiTEs están hechos de dos fragmentos de anticuerpo de cadena única unidos (ScFv). La estructura resultante es compacta y permite la formación de la sinapsis inmunocitolítica entre las células tumorales e inmunes: esta estructura permite la activación de las células T con una concentración sub-nanomolar de BiTE y, es de destacar, solamente cuando ambos brazos están acoplados con sus antígenos diana.

Se han desarrollado dos moléculas biespecíficas con el fin de potenciar el armamento citotóxico de las células T con TRAIL. Cada constructo consistía en tres proteínas de fusión compuestas por sTRAIL y un scFv, anti-CD3 o anti-CD7, unidas para formar una forma trimérica de TRAIL. A pesar de que las células T armadas con estos compuestos resultaron ser más citotóxicas para las células tumorales que el sTRAIL, la forma trimérica de scFvs de anti-CD3 o anti-CD7 podría activar las células T fuera del objetivo causando efectos adversos graves como tormenta de citoquinas y toxicidad en las células normales. Por esta razón, los autores proponen el uso de estos compuestos solo para tratar tumores restringidos a regiones particulares anatómicamente confinadas. El uso de un anticuerpo biespecífico que contiene solo un sitio de unión anti-CD3 podría evitar este problema y se puede usar este BsAb para tratamientos sistémicos ya que la unión de un solo CD3 no es suficiente para lograr la activación de las células T. Usando anticuerpos biespecíficos en los formatos de scFv en tándem o de diacuerpo de cadena única (scDb), se activan las células T solamente si existe la formación de sinapsis inmunocitolítica y, por lo tanto, solo después de la unión del antígeno en las células tumorales (de Bruyn M. y cols., Clinical cancer Res 2011, Sep 1; 17(17): 5626-37).

La inmunoterapia mediada por un diacuerpo biespecífico en el campo del cáncer de próstata se ha investigado con un diacuerpo biespecífico que se dirige contra el antígeno de membrana específico de próstata y contra CD3 (Buhler P. y cols., Cancer Immunol Immunother 2008, 57: 43-52).

El efecto de un diacuerpo en el crecimiento del linfoma de células B humano fue estudiado por Cochlovius B., y cols., Journal of Immunology, 2000, 165: 888-895. Se usó un diacuerpo heterodimérico específico para CD19 humano en células B y la cadena de CD3ε del complejo del TCR para investigar la eficacia sobre la inhibición del crecimiento tumoral tanto in vitro como in vivo en ratones inmunodeficientes que portaban xenoinjertos de linfoma B.

El documento WO 2014161845 describe anticuerpos biespecíficos que se dirigen frente a la proteína de activación de fibroblastos (FAP) y al receptor de muerte TRAIL 5 (DR5), que se investigaron para su uso en la inducción de apoptosis.

Se percibe cada vez más la necesidad e importancia de la identificación de compuestos que reconozcan antígenos que están regulados positivamente en muchas células tumorales diferentes.

El TRAIL-R2 se puede considerar un antígeno asociado a tumor no convencional, de hecho, en tumores, el receptor podría estar regulado positivamente pero también podría estar presente al mismo nivel en células normales. Cabe destacar que TRAIL-R2 puede matar células tumorales conservando las normales: independientemente del nivel de expresión, las células normales desarrollaron más mecanismos para resistir la destrucción inducida por TRAIL-R2. A pesar de esta importante característica, las células tumorales también podrían desarrollar resistencia al tratamiento agonista de TRAIL. Es por tanto objeto de la presente invención el desarrollo de un BsAb con un brazo anti-TRAIL-R2 que mate específicamente las células tumorales actuando como un compuesto agonista de TRAIL, y el brazo anti-CD3 que redirige las células T a las células tumorales para lisarlas.

Resumen de la invención

El problema que subyace en la presente invención es el de hacer disponibles compuestos capaces de unirse específicamente y matar las células tumorales, con el fin de permitir la fabricación de medicamentos para la terapia de patologías neoplásicas relacionadas.

Este problema se resuelve mediante el presente hallazgo por el uso de anticuerpos biespecíficos capaces de tener estas especificidades de unión y las capacidades citotóxicas como se describe en la presente descripción, ejemplos y reivindicaciones adjuntas.

La presente invención se refiere a nuevos anticuerpos biespecíficos en el formato scDb que tienen la capacidad de unirse tanto al TRAIL-R2 como al CD3 expresado en las células T.

Además de tener la misma capacidad para reconocer TRAIL-R2 en una amplia gama de tumores (como melanoma, carcinoma de ovario, carcinoma de mama, carcinoma de próstata, adenocarcinomas colorrectales, carcinoma hepatocelular y carcinoma escamoso de pulmón), el anticuerpo biespecífico presentado aquí puede actuar tanto como un agonista de TRAIL como activando la citotoxicidad de los linfocitos a través de CD3.

Se ha demostrado que la activación de las células T es específica de la diana.

La presente invención se refiere a un diacuerpo biespecífico de cadena única que comprende:

a. un dominio variable de una cadena pesada de una inmunoglobulina (VH) con una primera especificidad (A), en donde dicho dominio variable de la cadena pesada (VH_A) tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID N°: 1, en donde la primera especificidad (A) se dirige frente al antígeno TRAIL-R2;

5 b. un dominio variable de una cadena ligera de una inmunoglobulina (VL) con una segunda especificidad (B), en donde dicho dominio variable de la cadena ligera (VL_B) tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID N°: 3, en donde la segunda especificidad (B) se dirige frente al CD3 del linfocito T;

c. un dominio variable de una cadena pesada de una inmunoglobulina (VH) con la especificidad (B), en donde dicho dominio variable de la cadena pesada (VH_B) tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID N°: 5; y

10 d. un dominio variable de una cadena ligera de una inmunoglobulina (VL) con la especificidad (A), en donde dicho dominio variable de la cadena ligera (VL_A) tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID N°: 7;

15 en donde los dominios VH y VL del anticuerpo biespecífico de cadena única están conectados en el orden VH_A-VL_B-VH_B-VL_A, en donde cada dominio VH y VL está conectado con un enlazador peptídico, en donde dicho enlazador peptídico entre los dominios VH_A y VL_B y entre los dominios VH_B y VL_A consiste en cuatro residuos de aminoácidos de Glicina y un residuo de aminoácido de Serina (GGGGS), y el enlazador peptídico entre los dominios VL_B y VH_B consiste en tres secuencias enlazadoras que consisten en cuatro residuos de aminoácidos de Glicina y un residuo de aminoácido de Serina cada uno (GGGGS)₃.

Como se describirá adicionalmente en la descripción detallada de la invención, el anticuerpo biespecífico tiene la ventaja de unir la capacidad antitumoral potencial de TRAIL a la capacidad de eludir la resistencia.

20 De hecho, el BsAb tiene dos brazos: un brazo une TRAIL-R2 e imita el potencial pro-apoptótico del TRAIL soluble, y el brazo anti CD3 que redirige a las células T sobre las tumorales y mata las células tumorales.

En un aspecto adicional de la presente invención se encuentra una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo biespecífico de cadena única de acuerdo con la presente invención y un transportador farmacéuticamente aceptable.

25 De acuerdo con otro aspecto, la invención descrita proporciona un método *in vitro* para redirigir la acción citotóxica de los linfocitos T sobre una célula tumoral, que comprende la etapa de poner en contacto dicha célula tumoral con el anticuerpo biespecífico de cadena única como se describe en esta memoria.

De acuerdo con otro aspecto, la invención descrita proporciona un anticuerpo biespecífico de cadena única de acuerdo con la presente invención, para usar en el tratamiento de un tumor.

Breve descripción de las figuras

30 Las características y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la descripción detallada que se presenta a continuación, a partir de los Ejemplos dados con fines ilustrativos y no limitantes, y a partir de las Figuras 1-7 adjuntas, en donde:

35 La Figura 1 muestra las representaciones de dibujos de los formatos del constructo biespecífico que se diseñaron para crear un anticuerpo biespecífico capaz de unirse a TRAIL-R2 y de redirigir de manera eficaz las células T sobre las células tumorales, como se describe en los Ejemplos 2 y 3.

Figura 1A: Formato de BsAb de scFv en tándem: scFv anti-TRAIL-R2 (gris pálido) unido por un enlazador corto a scFv anti-CD3 (gris oscuro) (derivado de TR66 o hUCTH1);

40 Figura 1B: Formato scDb biespecífico: los dominios variables del anti-TRAIL-R2 están en los extremos de la estructura y están unidos a scFv anti-CD3 por dos enlazadores cortos idénticos de 5 aminoácidos que evitan la formación de emparejamientos erróneos.

Figura 1C: Representación en dibujo del constructo scDb biespecífico.

45 Figura 2: muestra la comparación de los resultados de un perfil de cromatografía de exclusión por tamaño entre el BsAb 16e2/TR66 en la conformación tipo BITE y aquellos obtenidos con un scDb 16e2/hUCTH1, de acuerdo con la invención, como se describe en los Ejemplos 2 y 3. La capacidad de unión se evaluó mediante FACS sobre células que expresan y no expresan TRAIL-R2 y CD3. Pico vacío: control negativo; pico gris: scDb más anticuerpos anti-Tag y anti-ratón.

Figura 2A: perfil de cromatografía de exclusión por tamaño del tándem scFv de BsAb 16e2/TR66 que pierde su capacidad de unión después de unos días y tiene tendencia a agregarse.

50 Figura 2B: perfil de cromatografía de exclusión por tamaño del scDb 16e2/hUCTH1 que resultó ser estable y los agregados no excedieron del 0,5% también después de 2 años.

Figura 2C: perfil de cromatografía de exclusión por tamaño del formato en tándem de scFv, construido usando como anti-CD3 el hUCTH1. Este constructo reconoce el CD3 pero no es capaz de reconocer TRAIL-R2.

Figura 2D: perfil de cromatografía de exclusión por tamaño del scDb, que se construyó también usando como anti-TRAIL-R2 Drozitumab un derivado del 16e2 que varía del 16e2 solo en unos pocos aminoácidos y como anti-CD3 el hUCTH1. En este caso, el constructo solo funciona durante unos días y el rendimiento de la producción fue muy bajo.

Figura 3. Análisis funcional y bioquímico de scDb 16e2/hUCTH1, como se describe en el Ejemplo 3.

Figura 3A: Análisis de citometría de flujo realizado sobre un panel de células de melanoma TRAIL-R2⁺ con diferentes niveles de expresión del receptor, sobre Jurkat CD3⁺ y sobre MDA-MB-468 TRAIL-R2⁻/CD3⁻.

La prueba confirmó la especificidad de unión del BsAb: los perfiles de unión de scDb (primera fila) seguido de la expresión del receptor en las diversas líneas celulares. Se han usado como controles un anticuerpo anti-TRAIL-R2 o un anticuerpo TR66 anti-CD3 comerciales para Jurkat (segunda fila).

Pico vacío: control negativo; pico gris: scDb más anticuerpos anti-Tag y anti-ratón (primera fila) o anticuerpo comercial más anticuerpo anti-ratón (segunda fila).

Figura 3B: Análisis Biacore (un método basado en la resonancia de plasmón superficial que permite seguir la cinética de interacción entre dos proteínas en tiempo real)

panel izquierdo: demostró que scDb 16e2/ hUCTH1 tenía una unión rápida y una separación rápida de la proteína recombinante TRAIL-R2 inmovilizada sobre un chip CM5. La constante de disociación en el equilibrio (KD) es 148 nmoles/l y se calculó usando 5 concentraciones diferentes, partiendo de 400 nM de scDb hasta 25 nM.

panel derecho: sensorgrama del Biacore que ilustra el estudio de competición. En la flecha negra se inyectó sTRAIL a 1 µM para saturar todos los receptores presentes en el chip; en la flecha gris se inyectó scDb 16e2/ hUCTH1 a 400 nM. No se observó unión de scDb sobre el receptor saturado, lo que revela que los dos compuestos compiten por el mismo sitio de unión.

Figura 3C: análisis mediante Page-SDS y transferencia de Western reveló que la masa del scDb es de aproximadamente 54 kDa.

Figura 3D: análisis de SELDI-TOF que confirma los datos obtenidos en la Figura 3C.

Figura 4. Actividad citotóxica

Figura 4A. Citotoxicidad del scDb 16e2/ hUCTH1 biespecífico sobre líneas celulares de melanoma M64 (baja expresión de TRAIL-R2 y resistente a sTRAIL) y M15 (alta expresión de TRAIL-R2 y sensible a sTRAIL). Se usaron diferentes proporciones de E:T y concentraciones para evaluar la citotoxicidad de scDb. Se usó scDb a 1, 0,5 y 0,1 µg/ml con una proporción de E:T a partir de 10:1 hasta 0,15:1 con diluciones de F2 en experimentos de citotoxicidad para determinar la dosis óptima de scDb y la proporción de E:T. Los experimentos indicaron que la mejor proporción de E:T fue 5:1 y se observó ausencia de citotoxicidad en células tumorales no tratadas y que a una concentración de 0,5 µg/ml la actividad de scDb alcanza la meseta, como se describe en el Ejemplo 3.

Figura 4B. Los gráficos ilustraron 9 ensayos diferentes de inhibición del crecimiento realizados para probar la reproducibilidad de los resultados del tratamiento. En cada experimento se usó un lote diferente de PBLs (derivados de donantes sanos). El tratamiento de M64, M41 y M15 con 0,5 µg/ml de scDb más PBLs (proporción de E:T de 5:1) dio resultados similares en todos los experimentos. Las MDA-MB-468 negativas para TRAIL-R2 no respondieron al tratamiento, como se esperaba.

Figura 4C. Se realizó la inhibición del crecimiento mediada por PBLs dependiente de anticuerpo para varias líneas de células cancerosas usando una concentración de scDb de 0,5 µg/ml y una proporción de E:T de 5:1. Las células se expusieron al tratamiento durante 48 o 96 horas. El tratamiento indujo la inhibición de la proliferación en todas las líneas tumorales celulares positivas a TRAIL-R2 probadas; no se observó toxicidad en las células MDA-MB-468 TRAIL-R2 negativas y sobre células normales HEK293 con alta expresión de TRAIL-R2.

Figura 4D. Se realizó la inhibición del crecimiento mediada por PBLs dependiente de anticuerpo para varias líneas celulares cancerosas usando una concentración de scDb de 0,5 µg/ml y una proporción de E:T de 5:1. Las células se expusieron al tratamiento durante 48 o 96 horas. El tratamiento indujo la inhibición de la proliferación en todas las líneas tumorales celulares positivas a TRAIL-R2 ensayadas.

Figura 4E. Ensayo de liberación de calceína-AM. Las células tumorales se cargaron con calceína-AM que, una vez que entró en las células, se esterificó y se volvió fluorescente. Las células se trataron durante 4 y 16 horas para medir la toxicidad de las células T cuando se redirigieron con scDb. Los gráficos muestran los porcentajes de células lisadas. Después de 4 horas se lisaron aproximadamente el 45-50% de M15 y M41 con alta expresión de TRAIL-R2, mientras que para las M64 de baja expresión la variación de las células tratadas no fue significativa en comparación con el

control. Después de 16 horas, el 100% de las células tratadas, también las M64, se lisaron como consecuencia del tratamiento. No se observó lisis en las células TRAIL-R2-MDA-MB-468. El gráfico representa la media $\pm$ DE, $n=5$, $**p<0,01$, $***p<0,001$.

Figura 5. Actividad agonista

- 5 Figura 5A. Dibujo que representa el modo mediante el cual se ha multimerizado el scDb: el MAb anti-Tag podría unirse a la etiqueta presente en los scDbs dimerizándolos. Al añadir MAb anti-ratón, el conjugado anti-Tag/scDb podría dimerizarse e inducir la tetramerización de BsAbs.

- 10 Figura 5B. Actividad pro-apoptótica agonista de scDb frente a células M15 sensibles a sTRAIL. Las células M15 se trataron con varias dosis de scDb solo o dosis iguales de scDb dimerizado o tetramerizado de acuerdo con la descripción en la Figura 5A. La toxicidad celular se evaluó después de 24 horas de tratamiento usando el ensayo CellTiterGlo. Se usó sTRAIL a igual concentración de scDb, como control positivo. Los resultados se expresaron como porcentaje del control negativo.

- 15 Figura 5C. Actividad pro-apoptótica agonista de scDb sobre células de melanoma con diferente sensibilidad a TRAIL. Se trataron M15 sensibles, M41 semi-resistentes y M64 resistentes a sTRAIL con 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de scDb solo o multimerizado con la estrategia de anti-tag y anti-ratón, durante 24 horas (C). Se usó TRAIL soluble (100 ng/ml) como control positivo de la inducción de la apoptosis mediada por receptor.

Figura 5D. Dibujo que representa la tetramerización de scDb mediante la unión a biotina-estreptavidina. Se biotiniló scDb in vitro usando éster de Biotina N-hidroxi-succinimida (Sigma) y se incubó con estreptavidina. El scDb tetramérico se purificó mediante cromatografía de exclusión por tamaño.

- 20 Figura 5E. Actividad pro-apoptótica agonista de scDb tetramerizado con estreptavidina frente a células M15 sensibles a sTRAIL. Las células M15 se trataron con 0,5 o 0,05 $\mu\text{g/ml}$ de scDb tetramerizado. La toxicidad celular se evaluó después de 24 horas de tratamiento usando el ensayo CellTiterGlo. Los resultados se expresaron como porcentaje del control negativo.

Figura 6. Análisis de activación de células T mediada por scDb.

- 25 Figura 6A. Se incubaron células T recién aisladas en concentración de E:T = 5:1, con o sin 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de scDb en 3 líneas de células tumorales de melanoma diferentes, como se describe en el Ejemplo 3.

Expresión de CD25 y CD69.

- 30 Se midió la expresión en la superficie celular de CD69 y CD25, marcadores de activación en células T redirigidas, mediante análisis de citometría de flujo 24 horas después de comenzar el cultivo conjunto. Los gráficos representan el porcentaje de células positivas en comparación con la población total de células T para cada marcador. Se midió la auto-activación de las células T incubando células T sin células tumorales. Los resultados representan la media $\pm$ DE de 3 ensayos diferentes realizados con 3 lotes diversos de células T derivadas de donantes sanos.

Figura 6B. Se incubaron células T recién aisladas en concentración de E:T = 5:1, con o sin una concentración en titulación desde 0,01 a 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de scDb sobre líneas de células tumorales M15, como se describe en el Ejemplo 3.

- 35 Expresión de CD25, CD137, PD-1 y CD69 en células T CD4 y CD8 redirigidas.

Se midió la expresión en la superficie celular de CD137, PD-1, CD69 y CD25, marcadores asociados a activación en células T redirigidas, mediante análisis de citometría de flujo 16 horas después de comenzar el cultivo conjunto. Los gráficos representan el porcentaje de células positivas en comparación con la población total de células T CD4⁺ o CD8⁺ para cada marcador. Se midió la auto-activación de las células T incubando las células T sin células tumorales.

- 40 Figura 7: Perfil de liberación de citoquinas (ck) de células T redirigidas con scDb, como se describe en el Ejemplo 3.

- 45 Se recogió diariamente durante 4 días el medio de las células tumorales, incubadas con células T y con y sin scDb: se midió la cantidad de IL-2 (Figura 7A), IL-4 (Figura 7B), IL-6 (Figura 7C), IL-10 (Figura 7D), TNF α (Figura 7E), IFN γ (Figura 7F), GM-CSF (Figura 7G) e IL-8 (Figura 7H) usando Bioplex. Se representa en cada gráfico el valor medio de pocillos duplicados. Cada punto representa el nivel de ck producido después del tratamiento con scDb y de las células T restado de la producción basal de citoquinas cuando se incubaron las células T únicamente con células tumorales.

Descripción detallada de la invención.

La presente invención se refiere a nuevos anticuerpos biespecíficos en el formato scDb que tienen la capacidad de unirse tanto al TRAIL-R2 como al CD3 expresado en células T. Se han desarrollado muchas terapias en el campo de la inmunoterapia contra el cáncer, pero estas no siempre han sido eficaces o han dado buenos resultados.

- 50 De hecho, en la mayoría de los casos, tras una remisión preliminar o una estabilización de la enfermedad, el tumor recidivó y este hecho se debe especialmente a la aparición de fármaco-resistencia en las células tumorales. En los

últimos años, la terapia dirigida, en combinación con la quimioterapia, ha demostrado mejorar los resultados sobre la quimioterapia sola. En particular, una nueva clase de agentes terapéuticos, los anticuerpos biespecíficos, surgieron como una herramienta útil en inmunoterapia. Los anticuerpos biespecíficos actúan redirigiendo las células inmunes hacia las tumorales para matarlas.

- 5 La presente invención se refiere a un anticuerpo biespecífico capaz de unirse a TRAIL-R2 y al CD3 presente en las células T.

Entre los diferentes constructos anti-TRAIL-R2/anti-CD3, solo uno mostró buenas propiedades bioquímicas y actividad biológica. Usando diferentes métodos se demostró que el BsAb puede permitir la formación de la sinapsis inmunocitolítica entre las células tumorales y los linfocitos. Después de la formación de la sinapsis, se puede observar la activación de la célula T (tanto CD4⁺ como CD8⁺) con regulación positiva de CD69, CD137, PD-1 y CD25 y la producción de citoquinas inflamatorias sin toxicidad más allá del objetivo. Después de la formación de la sinapsis y de la activación, las células T fueron capaces de lisar las células tumorales derivadas de neoplasias muy diferentes, como cáncer de mama, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer hepatocelular y cáncer de pulmón. Los mismos experimentos realizados en células normales no mostraron la activación de las células T lo que da como resultado la ausencia de efectos citotóxicos.

Por lo tanto, la invención describe un diacuerpo biespecífico de cadena única que comprende:

- a. un dominio variable de una cadena pesada de una inmunoglobulina (VH) con una primera especificidad (A), en donde dicho dominio variable de la cadena pesada (VH_A) tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID N°: 1, en donde la primera especificidad (A) se dirige contra el antígeno TRAIL-R2;
- 20 b. un dominio variable de una cadena ligera de una inmunoglobulina (VL) con una segunda especificidad (B), en donde dicho dominio variable de la cadena ligera (VL_B) tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID N°: 3, en donde la segunda especificidad (B) se dirige contra el CD3 del linfocito T;
- c. un dominio variable de una cadena pesada de una inmunoglobulina (VH) con la especificidad (B), en donde dicho dominio variable de la cadena pesada (VH_B) tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID N°: 5, y
- 25 d. un dominio variable de una cadena ligera de una inmunoglobulina (VL) con la especificidad (A), en donde dicho dominio variable de la cadena ligera (VL_A) tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID N°: 7; en donde los dominios VH y VL del anticuerpo biespecífico de cadena única están conectados en el orden VH_A-VL_B-VH_B-VL_A, en donde cada dominio VH y VL está conectado con un enlazador peptídico, en donde dicho enlazador peptídico entre los dominios VH_A y VL_B y entre los dominios VH_B y VL_A consiste en cuatro residuos de aminoácidos de Glicina y un residuo de aminoácido de Serina (GGGGS), y el enlazador peptídico entre los dominios VL_B y VH_B consiste en tres secuencias enlazadoras que consisten en cuatro residuos de aminoácidos de Glicina y un residuo de aminoácido de Serina cada uno (GGGGS)₃.

35 El BsAb es activo en diferentes células tumorales como melanoma, carcinoma de ovario, carcinoma de mama, carcinoma de próstata, adenocarcinomas colorrectales, carcinoma hepatocelular y carcinoma escamoso de pulmón y combina la capacidad antitumoral potencial de TRAIL con la capacidad de evitar la resistencia.

El formato scDb deriva del formato de diacuerpo (Db). Los BsAgs, en el formato de Db con un resto anti-CD3, demostraron ser capaces de redirigir de manera eficaz las células T para lisar tumores, que incluyen células de cáncer de próstata mediante la unión al antígeno de membrana específico de próstata (Buhler P y cols., Cancer Immunol Immunother 2008, 57: 43-52) y linfoma de células B a través de la unión al CD19 (Cochlovius B., y cols., Journal of Immunology, 2000, 165: 888-895).

45 A pesar de los resultados alentadores in vitro, los Dbs encontraron inconvenientes significativos que limitaron su uso, como la reducida estabilidad in vivo y la presencia de homodímeros inactivos junto con los heterodímeros funcionales. Estos problemas se superaron mediante la introducción de otro enlazador peptídico de aproximadamente 15 aa que conectaba las dos cadenas polipeptídicas lo que permite el emparejamiento más eficaz entre dominios variables afines, que fusionan los dos dominios de anticuerpo lo que da como resultado diacuerpos de cadena única.

En la presente invención:

- el término "especificidad" como se usa en esta memoria, se refiere a la capacidad de reconocer una secuencia o dominio particular y se refiere a la capacidad de unir esa secuencia o dominio;
- el término anticuerpo biespecífico de cadena única (scBsAb) se refiere a una molécula de unión al antígeno múltiple que tiene dos brazos: el brazo anti-TRAIL-R2, que se une a TRAIL-R2 e imita el potencial pro-apoptótico del TRAIL soluble, y el brazo anti CD3 que dirige las células T hacia las tumorales y mata las células tumorales. El BsAb de acuerdo con la presente invención está en el scDb;
- el término "fragmento de este" como se usa en esta memoria, se refiere a fragmentos de anticuerpo de cadena única que tienen un tamaño más pequeño con respecto al anticuerpo correspondiente.

El anticuerpo biespecífico de cadena única de acuerdo con la presente invención está en el formato scDb, que tiene una forma ventajosamente más compacta en comparación con otros formatos de anticuerpos biespecíficos y permite la formación de las sinapsis inmunocitolíticas. Los mismos dominios variables de anticuerpos organizados/ensamblados en un formato tipo BITE no son funcionales.

- 5 Los resultados descritos en el Ejemplo 3 y mostrados en la Figura 2 indican que el tándem scFv BsAb 16e2/TR66 que está en el formato tipo BITE pierde su capacidad de unirse solamente después de 2 días. Sin ceñirse a ninguna teoría, esto se podría deber a la inestabilidad de la estructura que tenía la tendencia a agregarse como lo demuestra el perfil de cromatografía de exclusión por tamaño.

- 10 Por el contrario, el scDb 16e2/hUCHT1 de acuerdo con la invención, que está en el formato de diacuerpo, sorprendentemente fue estable y los agregados no superaron el 0,5% también después de 2 años (Figura 2B). Usando las mismas regiones variables (16e2 y hUCHT1) pero convirtiendo el BsAb en formato tándem scFv, se puede observar que el constructo nunca reconoce el TRAIL-R2 sino solo el CD3 (Figura 2C). También se construyó un scDb usando como anti-TRAIL-R2 Drozitumab, un derivado del 16e2 que varía del 16e2 solo en unos pocos aminoácidos y como anti-CD3 el hUCHT1. También en este caso el constructo funciona solo durante unos días.

- 15 En un aspecto adicional, la invención proporciona un anticuerpo biespecífico de cadena única, en donde dichos equivalentes directos tienen al menos un 95% de homología/identidad de secuencia global con dichos dominios variables.

- 20 Los equivalentes directos de los dominios variables VH y VL de acuerdo con la presente invención tienen al menos un 96%, 97%, 98% o 99% de similitud u homología de secuencia global. En una invención preferida, el anticuerpo biespecífico de cadena única tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID N°: 13, y también denominada "scDb 16e2/hUCHT1" o equivalentes directos de este. El BsAb de acuerdo con la presente invención también es un ejemplo representado en la Figura 1C que informa sobre un ejemplo de la secuencia en la que están conectados los dominios VH y VL.

En un aspecto, un ejemplo de BsAb de acuerdo con la invención está en la siguiente secuencia:

- 25 el dominio VHA, seguido de una secuencia enlazadora que consiste en cuatro (4) residuos de aminoácidos de Glicina y un (1) residuo de aminoácido de Serina (GGGGS), el dominio VL_B, seguido de tres (3) secuencias enlazadoras que consisten cada una en cuatro residuos de aminoácidos de Glicina y un residuo de aminoácido de Serina cada uno ((GGGGS)₃) que corresponden a la SEQ ID N°: 15), seguido por el dominio VH_B, seguido por una secuencia enlazadora que consiste en cuatro (4) residuos de aminoácidos de Glicina y un (1) residuo de aminoácido de Serina (GGGGS) y el dominio VLA.

- 30 En un aspecto adicional, un ejemplo de BsAb de acuerdo con la invención tiene enlazadores y dominios en las siguientes secuencias: SEQ ID N°: 22, SEQ ID N°: 2, SEQ ID N°: 10, SEQ ID N°: 4, SEQ ID N°: 11, SEQ ID N°: 6, SEQ ID N°: 12, SEQ ID N°: 8, enlazador terminal GCGGCCGC.

- 35 Las secuencias enlazadoras pueden incluir un sitio de enzima de restricción para fines de clonación, aunque el experto en la técnica puede comprender fácilmente que dichos sitios de restricción se pueden modificar de acuerdo con las necesidades del investigador, y que las secuencias enlazadoras no se limitan a un sitio de restricción particular.

En una realización preferida, la presente descripción proporciona un BsAb que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N° 13, y una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N°: 21.

- 40 En un segundo aspecto de esta, esta invención proporciona además una composición que comprende una molécula de anticuerpo biespecífico de cadena única de acuerdo con la presente invención, y un agente de marcaje.

En un aspecto preferido, la composición de acuerdo con la invención comprende un agente de marcaje elegido del grupo que consiste en un radionucleótido, nanopartículas fluorescentes o cualquier método capaz de multimerizar el BsAb (como etiqueta de biotina o cremallera de leucina) de acuerdo con la presente invención

- 45 En un aspecto adicional de la presente invención se encuentra una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo biespecífico de cadena única, de acuerdo con la presente invención y un transportador farmacéuticamente aceptable.

La composición farmacéutica de acuerdo con la invención es para ruta de administración tópica, intramuscular, infusión intravenosa, subcutánea u otras rutas de administración.

- 50 La composición farmacéutica proporcionada se puede usar en combinación con al menos un compuesto adicional que sea capaz de mejorar o reducir su eficacia. Ejemplos de compuestos que son capaces de mejorar o reducir la eficacia de la composición farmacéutica de acuerdo con la invención incluyen sensibilizadores TRAIL que se incluyen en el grupo de Antraciclinas (como Doxorrubicina), inhibidores de HDAC (p.ej., ácido hidroxámico de suberoilánilida), inhibidores de CDK (p. ej., Flavopiridol), inhibidores de ER (p. ej., Tamoxifeno), inhibidores de Bcl-2 (p. ej., ABT-737), miméticos de Smac (p. ej., LBW242), carbo- o cis- platino, irinotecán, bortezomib.

De acuerdo con otro aspecto, la invención descrita proporciona un método *in vitro* para redirigir la acción citotóxica de los linfocitos T hacia las células tumorales, que comprende la etapa de poner en contacto dicha célula tumoral con el anticuerpo biespecífico de cadena única como se describe en esta memoria.

- 5 De acuerdo con otro aspecto, la invención descrita proporciona un anticuerpo biespecífico de cadena única, de acuerdo con la presente invención, para usar en el tratamiento de un tumor.

En un aspecto preferido, el anticuerpo biespecífico de cadena única, de acuerdo con la presente invención, es para usar en el tratamiento de un tumor, en donde dicho tumor se selecciona del grupo que consiste en melanoma, carcinoma de ovario, carcinoma de mama, carcinoma de próstata, adenocarcinomas colorrectales, carcinoma hepatocelular y carcinoma escamoso de pulmón.

- 10 De manera ventajosa, el scDb de acuerdo con la presente invención se puede usar en el tratamiento de todos los tumores positivos para TRAIL-R2 que derivan de diferentes órganos y en diferentes etapas y grados.

En un aspecto preferido, el anticuerpo biespecífico de cadena única, de acuerdo con la presente invención, es para usar también en el tratamiento de pacientes que son resistentes o intolerantes al tratamiento previo con un agente antitumoral con al menos un agente antitumoral o en donde se debe evitar el tratamiento con un agente antitumoral.

15 Esto brinda una mayor posibilidad de tratamiento para aquellos pacientes que son resistentes o se vuelven resistentes a otros tratamientos.

Además, el anticuerpo biespecífico de cadena única, de acuerdo con la presente invención es para el tratamiento que es profiláctico o terapéutico.

- 20 Para los propósitos de la presente invención, cada dominio de anticuerpo biespecífico de cadena única o enlazador tiene una SEQ ID N° correspondiente, como sigue:

SEQ ID N°: 1 corresponde a la secuencia de aminoácidos de un dominio variable de una cadena pesada de una inmunoglobulina (VH): VHA 16E2 (Clase IGHV 3-20*01);

SEQ ID N°. 2 corresponde a la secuencia de nucleótidos de un dominio variable de una cadena pesada de una inmunoglobulina (VH): VHA;

- 25 SEQ ID N°. 3 corresponde a la secuencia de aminoácidos de un dominio variable de una cadena ligera de una inmunoglobulina (VL): VLB (hUCTH1);

SEQ ID N°. 4 corresponde a la secuencia de nucleótidos de un dominio variable de una cadena ligera de una inmunoglobulina (VL): VLB;

- 30 SEQ ID N°. 5 corresponde a la secuencia de aminoácidos de un dominio variable de una cadena pesada de una inmunoglobulina (VH): VHB (hUCTH1);

SEQ ID N°. 6 corresponde a la secuencia de nucleótidos de un dominio variable de una cadena pesada de una inmunoglobulina (VH): VHB;

SEQ ID N°. 7 corresponde a la secuencia de aminoácidos de un dominio variable de una cadena ligera de una inmunoglobulina (VL): VLA de 16E2 (Clase IGLV3-19*01);

- 35 SEQ ID N°. 8 corresponde a la secuencia de nucleótidos de un dominio variable de una cadena ligera de una inmunoglobulina (VL): VLA;

SEQ ID N°: 9 (secuencia que viene antes del dominio VHA, sitio de restricción Sfi I)

SEQ ID N°: 10 (enlazador entre los dominios VHA y VLB, sitio de restricción Age I)

SEQ ID N°: 11 (enlazador entre los dominios VLB y VHB, enlazador (GGGGS)₃)

- 40 SEQ ID N°: 12 (enlazador entre los dominios VHB y VLA, sitio de restricción Xba I)

Secuencia del enlazador terminal: GCGGCCGC (enlazador terminal, después del dominio VLA, sitio de restricción Not I)

SEQ ID N°: 13 corresponde a la secuencia de aminoácidos del anticuerpo biespecífico de cadena única scDb 16e2/hUCTH1

- 45 SEQ ID N°. 14 corresponde a la secuencia de nucleótidos del anticuerpo biespecífico de cadena única scDb 16e2/hUCTH1 con una secuencia corriente arriba que se usó para clonar el scDb en el vector.

SEQ ID N°. 15 corresponde a la secuencia de aminoácidos del enlazador alternativo entre los dominios VLB y VHB.

SEQ ID N°. 16 corresponde a la secuencia de aminoácidos del anticuerpo biespecífico de cadena única con las etiquetas de His y Myc

SEQ ID N°. 17 corresponde a la secuencia de aminoácidos del Clon 7 anti-TRAIL-R2 ScFv aislado con la técnica de visualización de fagos (Phage Display)

5 SEQ ID N°. 18 corresponde a la secuencia de aminoácidos del Clon 8 anti-TRAIL-R2 ScFv aislado con Phage Display

SEQ ID N°. 19 corresponde a la secuencia de aminoácidos del Clon 44 anti-TRAIL-R2 ScFv aislado con Phage Display

SEQ ID N°. 20 corresponde a la secuencia de aminoácidos del Clon 56 anti-TRAIL-R2 ScFv aislado con Phage Display

SEQ ID N°. 21 corresponde a la secuencia de nucleótidos del anticuerpo biespecífico de cadena única scDb 16e2/hUCTH1 (BsAb)

10 SEQ ID N°. 22 corresponde a la secuencia de nucleótidos del enlazador (GGGGS)

Varias realizaciones y aspectos de la presente invención, como se delinean anteriormente en esta memoria y como se reivindica en la sección de reivindicaciones a continuación, encuentran apoyo experimental en los siguientes ejemplos.

Ejemplos

15 Se hace ahora referencia a los siguientes ejemplos que, junto con la descripción anterior, ilustran algunas realizaciones de la invención.

Líneas celulares

Se usaron células de melanoma humano M41, M15 y M64. M15, M64 y M41 son células que tienen diferente expresión de TRAIL-R2 y sensibilidad al tratamiento con sTRAIL: en particular, M15 son sensibles a sTRAIL y con alta expresión; M41 son parcialmente sensibles a sTRAIL y con alta expresión mientras que M64 son resistentes con baja expresión.

20 Las HeLa (adenocarcinoma epitelial de cuello de útero), A431 (carcinoma epitelial epidermoide), SKOV3, A2774, A2780 y NL3507 INT-Ov-11 (carcinomas epiteliales de ovario), MDA-MB-231 y MT-3 (cáncer de mama triple negativas), LnCAP, DU145 y PC3 (carcinoma de próstata), CaCo2 (adenocarcinomas colorrectales), HepG2 (carcinoma hepatocelular), SkMes (carcinoma escamoso de pulmón), HEK-293 (riñón embrionario normal), Jurkat (línea inmortalizada de linfocitos T humanos) y MDA-MB-468 (línea celular triple negativa de cáncer de mama, TRAIL-R2 negativa), SU-DHL-4 (linfoma) se adquirieron en la American Type Culture Collection (Manassas, MD). Nuestro grupo desarrolló INT-Ov-11 (carcinoma epitelial de ovario).

El hibridoma que produce el mAb, el mAb 9E10 anti-etiqueta myc (CRL-1729) se adquirió en ATCC.

Cepas bacterianas

30 Cepas de Escherichia coli. Se usó TG1 {supE^{hi}-1 ((lac-proAB) hsd (5[F' traD36 + proAB + lacIq lacZ(M15)]}) para la presentación en la técnica de visualización de fagos y se usó HB2151 {nal^r thi-1 ara lac-proAB [F' proAB + lacIq lacZ(M15)]} para la producción soluble del anticuerpo biespecífico.

Ejemplo 1.

35 Aislamiento de fragmentos de anticuerpo de cadena única (fragmento variable scFv de cadena única) frente a TRAIL-R2.

Se realizaron tres ciclos de enriquecimiento para aislar scFv frente a TRAIL-R2 como se describe a continuación. El título de los fagos eluidos aumentó gradualmente después de cada ciclo y se probó la unión de los fagos producidos en ELISA de fagos y aumentó de manera proporcional con el enriquecimiento de 768 colonias picadas al azar, derivadas de fagos después del enriquecimiento, se probaron en ELISA de fagos de clon único y se aislaron, secuenciaron y caracterizaron 4 clones, específicos de TRAIL-R2 nativo. Se produjeron de forma soluble los 4 scFvs fueron capaces de unirse específicamente a células TRAIL-R2⁺.

Materiales y métodos:

Phage Display de Anticuerpos

45 Se aislaron scFvs dirigidos frente a TRAIL-R2 usando la técnica de Phage Display de anticuerpos. Se usó una librería de visualización de fagos de scFv humano fabricada previamente (patentada) y se realizaron 3 rondas de selección. Para la selección de TRAIL-R2 nativo, se lisaron 6x10⁶ células de linfoma positivas para el receptor SU-DHL-4. La proteína TRAIL-R2, contenida en el lisado, se capturó con anticuerpo de ratón anti-TRAIL-R2 humano (R&D Systems) previamente conjugado a DYNABEADS[®] M-280 anti-IgG de ratón en oveja (Life Technologies). El TRAIL-R2 atrapado en las perlas magnéticas se incubó en MPBS (leche al 4% + PBS) en agitación durante una hora y después se añadió

la librería de fagos y se incubó durante dos horas a temperatura ambiente en agitación y se lavó con PBST (PBS y Tween al 0,1%) durante 20, 15 y 10 veces respectivamente en el primero, segundo y tercer ciclo de enriquecimiento. Después de la etapa de lavado, los fagos que mostraban un fragmento de anticuerpo específico para el receptor permanecieron unidos a las perlas y se usaron para infectar 2 ml de *E. coli* TG1 crecidas a una D.O. de 0,4-0,5 en medio TY 2x. Las bacterias infectadas se plaquearon en TYE 2x+ ampicilina a 100 µg/ml en una placa cuadrada (100 x 15 mm) y se crecieron a 30°C O/N (durante toda la noche). Se contaron las colonias, se cribaron mediante PCR y se raspó la placa. Se inocularon 50 µl de raspado de bacterias en 50 ml de medio TY 2x con glucosa al 1% y ampicilina (100 mg/ml) para producir fagos para las sucesivas rondas. Cuando la D.O. alcanzó 0,4-0,5, se infectaron las bacterias con 5x10⁵ ufp de fago helper M13KO7 (New England Biolabs) durante 30 minutos a 37°C en un baño termostático. A continuación, se centrifugaron las bacterias y se resuspendieron en el mismo medio sin glucosa y se crecieron a 30°C O/N. Los fagos se precipitaron con PEG, se resuspendieron en PBS y se titularon antes de su uso para las sucesivas rondas de selección. Después de la tercera ronda, se probaron los fagos en FACS para evaluar la capacidad de unión a TRAIL-R2. Se realizó el ELISA de fago único con las colonias individuales derivadas después del enriquecimiento.

ELISA de fago de clon único

Después de la tercera ronda de selección, las bacterias infectadas con fagos se plaquearon sobre placas de TYE 2x + ampicilina. Se realizó la producción de fagos de clon único, como se describió anteriormente, en cada pocillo de una placa de 96 pocillos profunda. Se realizó un ELISA de fago único para probar la capacidad de unión del sobrenadante de cada pocillo. Se recubrió una placa de ELISA de 96 pocillos con anti-TRAIL-R2 (R&D Systems) O/N a 4°C. Después de 3 lavados con PBS-Tween al 0,1% y PBS, se incubaron 0,5 µg de lisado de SU-DHL-4 durante 1 h a temperatura ambiente. Se reveló la presencia de clones específicos con el anticuerpo anti-M13 HRP.

Expresión soluble de fragmentos de anticuerpos

Se produjeron anticuerpos biespecíficos o fragmentos de anticuerpos solubles en *E. coli*. Se transformaron *E. coli* HB2151 competentes recientes, se plaquearon en TYE 2x y se crecieron O/N a 37°C. Se inoculó una única colonia y se creció en medio TY 2x (glucosa al 0,1% y 100 µg/ml de ampicilina) durante toda la noche a 37°C. Al día siguiente, se inoculó el cultivo en medio fresco a partir de una D.O. de 0,1 y se crecieron las bacterias hasta que el cultivo alcanzó una D.O. de 0,8-0,9. El cultivo se centrifugó y se cambió el medio agotado con medio fresco específico para la inducción de la proteína soluble (TY 2x + glucosa al 0,1% + 100 µg/ml de ampicilina + IPTG 1 mM). Las bacterias se incubaron O/N a la temperatura que era óptima para cada proteína (25-30°C) para permitir una eficaz expresión de proteína soluble. Al día siguiente, se recolectaron las bacterias mediante centrifugación y se realizó un protocolo de tratamiento de shock osmótico que usa tampón Tris 200 mM pH 7,5 que contenía EDTA 1 mM y sacarosa al 20% durante 1 h a 4°C en agitación, para extraer las proteínas periplásmicas que contenían el anticuerpo biespecífico o el fragmento de anticuerpo.

Las preparaciones periplásmicas se purificaron usando un protocolo IMAC con una columna de cromatografía de níquel o de proteína L.

Ejemplo 2.

Construcción de anticuerpos biespecíficos

Se usaron los dominios variables de los 4 scFvs anti-TRAIL-R2 aislados descritos en el Ejemplo 1 y se los asoció con los dominios variables de uno de los dos hibridomas anti-CD3 murinos descritos a continuación (TR66 y OKT3) para construir anticuerpos biespecíficos en formato tándem de scFv (SEQ ID N°s 17, 18, 19 y 20). La estructura del anticuerpo biespecífico estaba compuesta por los dos scFvs, el primero anti-TRAIL-R2 y el segundo anti-CD3, unidos por un enlazador corto GGGGS que confiere rigidez a la estructura y no permite los pares mal emparejados de dominios variables de diferentes especificidades (FIG 1A). Uno de estos clones, el clon 8 (SEQ ID N°: 18), al emparejarse con TR66 scFv como formato de Tándem scFv, mostró la mejor capacidad de unión. Mediante FACS en líneas celulares NHL, HeLa y melanoma con diferente expresión de TRAIL-R2, el BsAb demuestra una buena reactividad similar a la IgG completa bivalente del control positivo a pesar de su unión monovalente. Desafortunadamente, los BsAbs demostraron una escasa estabilidad a lo largo del tiempo debido probablemente a la presencia de agregados como se demostró mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC).

Para encontrar un clon más estable, se mutagenizó el clon 8 de forma aleatoria y el conjunto de scFvs mutados se clonaron en un vector que contenía scFv TR66. Se realizó el ELISA de clon único para aislar los clones con mejor unión a las células positivas. De los 90 clones, dos, C2 y C3, dan buena unión y especificidad. Sus secuencias demuestran que tienen 2 y 1 mutaciones puntuales en los marcos, respectivamente. De manera más precisa, en C2 hay un cambio de aminoácido en el marco 1 y 1 en el marco 2 del VH y, en C3 hay un cambio de aminoácido en el marco 1 del VL. En cualquier caso, la estabilidad todavía no era suficiente para nuestros propósitos.

Paralelamente, se decidió comenzar con la selección de una librería directamente en el formato BsAb tipo BITE: diferentes tipos de enlazadores pueden influir en la unión y las propiedades de los fragmentos scFv y el scFv puede tener un comportamiento diferente si se ensambla como BsAb. El conjunto de fragmentos obtenidos después del segundo cribado de la librería de scFv nativa, a partir de la que se seleccionaron los clones descritos anteriormente,

se clonaron en un vector que contenía el scFv de TR66. También se generó y se produjo un constructo, que contenía un clon 16e2 anti-TRAIL-R2 bien caracterizado, para su uso como un control positivo. La librería obtenida se calentó de modo transitorio para inducir el desplegamiento y promover las agregaciones. Después de enfriar, los fragmentos de anticuerpos de la técnica de visualización de fagos que se desplegaron de forma reversible se enriquecen, por lo tanto, con respecto a los que no lo hacen. Después de dos rondas de selección, 6 de los 90 clones resultaron positivos en ELISA en células de melanoma y negativos en una línea celular que no expresa TRAIL-R2 (MDA-MB-468). Estos 6 clones se analizaron adicionalmente mediante FACS y tres de ellos demostraron una buena unión en ambos brazos. Además, los clones que contenían scFv 16e2 eran capaces de unirse específicamente a TRAIL-R2 y CD3 pero, al igual que los otros 6 clones, mantuvieron la especificidad durante al menos 1 semana y después se perdió la unión debido probablemente a la presencia de agregados como se demostró mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) (FIG 2A).

Tabla 1. Diferentes constructos producidos y problemas encontrados

<u>Constructo</u>	<u>Estabilidad</u>	<u>Problemas encontrados</u>
ScFv 16e2/TR66 tándem	Estable durante 5-7 días	Presencia de agregados
ScFv 16e2/hUCTH1 tándem	No estable	Presencia de agregados
scDb 16e2/hUCTH1	Estable	Sin agregados
scDb Droz/hUCTH1	Estable durante 1 día	Dificultad en la producción/Pérdida de funcionalidad
scDb 16e2 -1 mut /hUCTH1	Estable durante 2-3 días	Presencia de agregados
scDb 16e2 -2 mut /hUCTH1	Estable durante 2-3 días	Presencia de agregados
ScFv tándem y scFvs que contienen diferentes dominios variables anti-TRAIL-R2 y hUCTH1 o dominios anti-CD3 TR66	No estable	Dificultad en la producción/purificación Presencia de agregados

Materiales y métodos:

Construcción de anticuerpo biespecífico en formato tipo BITE

Para estos propósitos, se unieron los fragmentos Fv de cadena única aislados dirigidos frente a TRAIL-R2 mediante un enlazador GGGGS flexible a un scFv anti-CD3. Los scFvs anti-CD3 usados se derivaban de dos hibridomas TR66 y OKT3 de ratón. Se clonaron los genes de anticuerpo en el vector pIT2 que contenía, después del casete del gen biespecífico, ambas etiquetas de hexahistidina y de un Myc. Los anticuerpos biespecíficos se expresaron en E.coli HB2151 y se purificaron como se describe en el Ejemplo 1.

Amplificación de Vh y Vi derivados del segundo cribado anti-TRAIL-R2

Se aislaron plásmidos de los fagos derivados después de dos ciclos de cribado en TRAIL-R2 nativo usando Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification (Promega). Se amplificaron los scFvs por PCR usando un conjunto de cebadores específicos de todas las líneas germinales Vh y Jk, y se clonaron en el vector pIT2 que contenía scFv TR66 a través de sitios SfiI/NotI codificados por cebador, para generar una librería de anticuerpos biespecíficos. Esta librería se cribó frente a TRAIL-R2 natural inmovilizado en perlas magnéticas usando un anticuerpo comercial anti-TRAIL-R2.

Especificidad de unión del anticuerpo recombinante: FACS

En todos los experimentos se incubaron 2×10^5 células con el anticuerpo primario en PBS que contenía 1% de FCS saturante durante 30 minutos a 4°C. Los BsAbs se detectaron usando un anticuerpo anti-etiqueta de Histidina y un anti-IgG de ratón (especificidad H+L) marcado con Alexa 488. Se usaron como controles positivos anti-TRAIL-R2 humano de ratón (R&D Systems) y el mAb TR66 de ratón, derivado de Hibridoma. Se midió el marcaje de fluorescencia usando un instrumento FACS Calibur (Becton Dickinson, Heidelberg, Alemania). El análisis de datos se realizó usando el paquete informático FlowJo (Tree Star Inc.).

Ejemplo 3.

Nuevo formato.

La falta de estabilidad en el formato tipo BiTE indujo a construir los anticuerpos biespecíficos en un formato diferente. Un formato compacto, que permite la adyacencia de las células T y tumorales necesaria para la sinapsis inmunocitolítica, es el Diacuerpo Biespecífico de cadena única (scDb). El formato de diacuerpo biespecífico (Figura 1B) está compuesto por dos scFvs en los que el extremo C-terminal de un dominio VH está conectado al extremo N-terminal de un dominio VL de otra especificidad usando un enlazador corto rígido para restringir el emparejamiento intra-catenario de VH y VL. En el formato scDb, otro enlazador (GGGS)₃ entre las dos cadenas estabiliza la estructura. Se construyeron scDbs con la secuencia de los dominios variables de todos los svFvs anti-TRAIL-R2 aislados, 16e2 o Drozitumab (Genentech) y con el anticuerpo humanizado UCTH1 (hUCTH1) para la especificidad anti-CD3. El scFv de hUCTH1 se ha usado en muchos constructos BsAb y ha demostrado ser estable cuando se usa unido con 16e2 para formar un scDb.

Los constructos se clonaron en el plásmido pIT2 que permite la secreción del scDb en el periplasma bacteriano de HB2151 después de la inducción con IPTG. Los BsAbs producidos tienen en el extremo C-terminal dos secuencias que codifican respectivamente unas etiquetas de c-myc y de hexahistidina. Se insertó la etiqueta de His para permitir la purificación de los BsAbs usando un protocolo IMAC.

Entre todos los diferentes constructos producidos en formatos scFv biespecífico en tándem o en scDb, se observó que el bajo rendimiento de producción, la falta de unión y/o la presencia de agregación excluyen la posibilidad de tener un reactivo estable excepto para el scDb construido con 16e2 y hUCTH1.

Todos los constructos tuvieron un rendimiento muy bajo de producción en comparación con el scDb 16e2 x hUCTH1. El rendimiento de la producción estandarizada es de aproximadamente 50-100 µg/ml mientras que para el scDb es de aproximadamente 1-2 mg/ml. Para excluir que la diferencia de rendimiento de producción no se debe al azar, se realizaron aproximadamente 20 intentos de producción diferentes y los resultados fueron comparables.

También se puede observar que TaScFv 16e2 x hUCTH1 no pudo unir la especificidad TRAIL-R2 (Figura 2C) y que otros constructos como scDb Drozitumab x hUCTH1 (Figura 2D) o TaScFv 16e2 x TR66 (Figura 2A) eran capaces de unir ambas especificidades inmediatamente después de la producción, pero perdían la capacidad de unión a TRAIL-R2 o a CD3 respectivamente después de un almacenamiento de 1-3 días. Para investigar la causa de esta pérdida de unión, se realizó un ensayo de cromatografía de exclusión por tamaño (SUPEROSE 12 10/300) (intervalo de separación: 300 Kd-10 Kd; GE Healthcare) y se observó la agregación de TaScFv 16E2 x TR66 que se produjo en las 16 horas posteriores a la purificación. El formato scDb 16E2 x hUCTH1 fue mejor en comparación con los otros constructos sin tendencia a la agregación y conservación de la afinidad de unión hacia ambas especificidades, TRAIL-R2 y CD3, también después de un almacenamiento de dos años (Figura 2B).

Caracterización del diacuerpo de cadena única

Se probó el scDb purificado mediante electroforesis en gel con SDS del 4-12% y se tiñó con azul de Coomassie o, después de hacer la transferencia en una membrana de nitrocelulosa, usando un MAbs anti-His específico para el epítipo hexahistidinilo. La banda detectada tenía el peso molecular correcto y no se observaron otras bandas (Figura 3C). El análisis de cromatografía de exclusión por tamaño en una columna de SUPEROSE 12 10/300 mostró que la pureza del scDb después de la purificación era mayor del 97%. Las pruebas de FACScalibur demostraron la unión específica del scDb a células de melanoma TRAIL-R2⁺ y a células Jurkat CD3⁺. No se observó unión a células MDA-MB-468 completamente negativas para ambas especificidades (Figura 3A).

Análisis BIAcore

La afinidad de unión a TRAIL-R2 del BsAb se midió mediante resonancia de plasmón superficial usando BIAcore. El análisis se realizó usando TRAIL-R2 recombinante humano inmovilizado en el chip. En base a los datos experimentales, se calcularon las curvas de asociación y disociación y las evaluaciones cinéticas dieron lugar a una constante de afinidad calculada (KD) de $1,48 \times 10^7$ nM (Figura 3B, panel izquierdo).

Para evaluar la competición en la unión del brazo anti-TRAIL del scDb con sTRAIL, se inmovilizó el receptor recombinante en un chip y se saturó con 1 µM de TRAIL soluble. El análisis mostró una fuerte competición por el mismo sitio de unión ya que no se observó unión de BsAb a TRAIL-R2 saturado con sTRAIL (Figura 3B, panel derecho). Por esta razón, se investigó si el scDb podría actuar como sTRAIL de una manera agonista.

Actividad agonista de scDb

Para caracterizar con profundidad la actividad agonista de TRAILR2 se usó scDb en forma monomérica o multimerizada con diferentes métodos. El primer método que se usó aprovechaba la posibilidad del reconocimiento de la etiqueta Myc ejercido por el anticuerpo monoclonal 9E10: este anticuerpo podría reconocer la etiqueta myc y permitir la dimerización del scDb y, si se incubaba con un anticuerpo anti-ratón específico para Fc, que se podría unir al Fc de 9E10, podría tener una forma tetramérica artificial del scDb. El segundo método aprovecha las propiedades de tetramerización de la estreptavidina: se biotiniló el scDb y se incubó con estreptavidina. Se aislaron los scDbs tetramerizados con SEC y se usaron para tratar células.

M15, M64 y M41 son células que tienen diferente expresión de TRAIL-R2 y sensibilidad al tratamiento con sTRAIL: en particular, las M15 son sensibles a sTRAIL y de alta expresión; las M41 son parcialmente sensibles a sTRAIL y de alta expresión, mientras que las M64 son resistentes con baja expresión. Todos los métodos usados para multimerizar el scDb sugieren un efecto agonista y, en particular, el scDb multimerizado con la estrategia de la biotina-estreptavidina demuestra la mejor actividad agonista.

Inducción de citotoxicidad por scDb

Se investigó la capacidad del anticuerpo biespecífico para inducir inhibición del crecimiento o citotoxicidad en células tumorales redirigiendo los PBLs activados o no activados, aislados de donantes sanos, sobre las células tumorales. Las líneas celulares de melanoma M15, M41 y M64, las líneas celulares de cáncer de ovario A2774, A2780, SKOV3, NL3507 y A431, la línea celular de cáncer epidermoide A431, las líneas celulares de carcinoma de mama triple negativas MDA-MB-231 y MT-3, las líneas celulares de carcinoma de próstata LnCap, DU145 y PC3, la línea celular de adenocarcinoma colorrectal CaCO2, la línea celular de carcinoma hepatocelular HepG2 y la línea celular de carcinoma escamoso de pulmón SkMes que expresan TRAIL-R2 se usaron como células diana. La línea celular MDA-MB-468, negativa para TRAIL-R2, se usó para probar la ausencia de citotoxicidad fuera del objetivo; HEK-293, línea celular de riñón normal immortalizada, se usó para excluir la toxicidad en las células normales. Se midió el efecto del scDb usando CellTiterGlo para la inhibición del crecimiento o el ensayo de liberación de Calceína AM para la citotoxicidad directa de las células T. Los primeros experimentos se realizaron usando diferentes concentraciones de BsAb (a partir de 1 µg/ml con diluciones 1:2 hasta alcanzar 0,01 µg/ml), diferentes proporciones de efector a diana (20:1 a 1,25:1) y PBLs activados o no activados.

Los mejores resultados se obtuvieron usando una concentración de 0,5 µg/ml y una proporción E:T de 5:1.

El scDb muestra un buen efecto sobre todas las líneas celulares tumorales usadas. Los datos relativos a M64 y M15 se muestran en la Figura 4A.

Se realizaron otros experimentos que usan estas condiciones para probar la reproducibilidad de los resultados usando PBLs extraídos de sangre periférica de 10 donantes sanos diferentes. Para evitar distorsiones debidas al diferente poder citotóxico de los PBMC derivados de diferentes donantes, antes del tratamiento de las células tumorales, se evaluó el estado de activación basal de los PBMC mediante FACS. Si los marcadores CD69 y CD25 son demasiado altos, los PBMC se consideraron ya activados y no se usaron en el tratamiento. En líneas celulares de melanoma, el tratamiento con scDb y PBMC repitió los mismos resultados. No se observó citotoxicidad fuera del objetivo en MDA-MB-468. Además, la desviación estándar muy baja calculada en cada grupo indicó que el tratamiento es repetible y no está influenciado por los diferentes conjuntos de PBL (Figura 4B).

Con el fin de caracterizar la reactividad del anticuerpo biespecífico se evaluó la presencia del receptor TRAIL-R2 en las diferentes líneas celulares cancerosas. La expresión de superficie de TRAIL-R2 se analizó mediante FACS usando un mAb anti-TRAIL-R2. A partir de este análisis se encontró que las líneas celulares de carcinoma de ovario INT-Ov-11, A2774, A2780, SKOV3, NL3507, las líneas celulares de carcinoma de mama triple negativas MDA-MB-231 y MT-3, las líneas celulares de carcinoma de próstata LnCap, DU145 y PC3, la línea celular de adenocarcinoma colorrectal CaCO2, la línea celular de carcinoma hepatocelular HepG2, la línea celular de carcinoma escamoso de pulmón SkMes, la línea celular de cáncer epidermoide A431, expresan TRAIL-R2 y se usaron como células diana. HEK-293, una línea celular de riñón normal immortalizada, presentó un gran nivel de TRAIL-R2 y se usó para excluir la toxicidad en las células normales.

Después del redireccionamiento de los PBLs (proporción E:T de 5:1) con 0,5 µg/ml de scDb se observó que el BsAb era capaz de inducir la inhibición del crecimiento de todas las líneas celulares usadas. No se observó citotoxicidad en las HEK-293 tratadas (Figura 4C-4D).

Liberación de Calceína AM

Para investigar la citotoxicidad directa de las células T se usó la liberación de Calceína AM (calcein-acetoximetil diacetiléster) (Lichtenfels y cols., 1994 y Roden y cols., 1999), un método que era comparable con la liberación de ⁵¹Cr. Se determinó la concentración de calceína-AM para el número y densidad de células diana tumorales incubando las células a un intervalo de concentración de 1-10 µM, evaluando la separación óptima entre la liberación máxima y la espontánea (datos no mostrados). El tratamiento con scDb mostró buenos resultados y fue capaz de redirigir a las células T para lisar las células de melanoma M15, M64 y M41. Las células T redirigidas podrían dañar las células tumorales y se liberó calceína en el medio. Después de 4 horas la citotoxicidad fue de aproximadamente el 50% para M15 y M41 de alta expresión TRAIL-R2 y de aproximadamente el 30% para M64 de baja expresión. Después de 16 horas, la citotoxicidad alcanzó el 100% para todas las líneas celulares tratadas. No se observó citotoxicidad directa en MDA-MB-468, línea celular TRAIL-R2 negativa (Figura 4E).

Activación de células T

Para diseccionar el mecanismo de citotoxicidad, se analizó el estado de activación de las PBMC después de la incubación conjunta con células normales y tumorales positivas y negativas para TRAIL-R2. Los marcadores de

activación CD69 y CD25, expresados en células T presentes en PBMC después de la incubación con células TRAIL-R2⁺, aumentaron solamente en presencia de scDb. Por el contrario, no hubo regulación positiva de los dos marcadores en ausencia de scDb o después del cultivo conjunto con TRAIL-R2-MDA-MB-468 o con células normales HEK-293 con alta expresión de TRAIL-R2 (Figura 6A). Los experimentos realizados que tratan la línea celular M15 revelaron que se indujo una expresión dependiente de la dosis de los marcadores de activación de las células T CD25, CD137, CD69 y PD-1 tanto en subpoblaciones de células T CD4⁺ como CD8⁺ (Figura 6B).

La activación de las células T, después del redireccionamiento mediado por scDb hacia las células tumorales, se demostró adicionalmente por el aumento de la concentración de citoquinas liberadas en el medio. En particular, la figura 7 muestra que se indujo específicamente un aumento de la producción de estas citoquinas solo en presencia de scDb con un pico de producción a las 24 horas. La producción de citoquinas con respecto a los sobrenadantes de 24 horas disminuyó después de 48 horas y volvió a ser similar después de 72 horas. En todos los cuatro tiempos, las citoquinas medidas en los medios tratados con scDb son mayores que las producidas en los medios de las células tratadas solo con PBMC. No se observó producción de citoquinas usando células normales o negativas para TRAIL-R2.

Materiales y métodos

BIAcore

Se evaluó la unión del brazo de BsAb anti-TRAIL-R2 mediante resonancia de plasmón de superficie usando un BIAcore 2000 equipado con chips sensores CM5 de grado de investigación (Biacore AB, Uppsala, Suecia). Se inmovilizaron TRAIL-R2 humano recombinante (R&D Systems) y la proteína no correlacionada humana, BSA (Thermo Scientific) en dos carriles diferentes de chips sensores CM5 usando un protocolo estándar de acoplamiento de amina con N-hidroxisuccinimida (NHS), 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) e hidrócloruro de etanolamina (pH 8,5). Se inyectó el BsAb durante 3 minutos a 30 µl/min de velocidad de flujo. Se realizaron los análisis cinéticos a concentraciones que varían de 400 a 25 nM de scDb. Se verificó la restauración de la línea de base inicial después de cada inyección. Los datos obtenidos se analizaron mediante el paquete informático BIAevaluation 3.2 (ajuste global) asumiendo un modelo de unión de Langmuir 1:1.

Caracterización bioquímica e integridad

Se analizaron el tamaño y la homogeneidad mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecil sulfato sódico (PAGE-SDS), transferencia de Western y con espectrometría de masas (SELDI-TOF).

Se analizó la potencial dimerización por cromatografía de exclusión por tamaño en SUPEROSA12 10/300 (intervalo de separación: 300 Kd-10Kd; GE Healthcare)

Aislamiento de PBLs

Se aislaron PBMC de la capa leucocitaria de donantes sanos mediante el protocolo estándar de centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll (Ficoll plus hystopaque, GE Healthcare). Las PBMC se resuspendieron en medio completo RPMI 1640 y el número de células se ajustó a 1×10^6 /ml. El matraz se dejó reposar durante 30 minutos a 37°C en un incubador humidificado con un 5% de CO₂, para permitir la adhesión de los monocitos. Los PBLs presentes en el sobrenadante se eliminaron y se pusieron en otro matraz. Los PBLs se cultivaron en RPMI 1640 con un 5% de FBS o se activaron usando IL-2 y PHA durante 4 días.

Inhibición de la proliferación de células tumorales/normales y ensayos de citotoxicidad

La inhibición de la proliferación de células T redireccionadas se evaluó mediante ensayo MTT usando PBLs y un conjunto de diferentes líneas celulares TRAIL-R2⁺. Se plaquearon $1,2 \times 10^4$ células en cada pocillo de una placa de fondo plano de 96 pocillos con el medio apropiado y se incubaron ON para permitir su unión. Se añadieron 0,5 µg/ml de scDb y las células se incubaron durante 1 hora antes de añadir los PBLs (proporción de E:T: 5:1). Como controles negativos: se usaron células sin tratar, células incubadas solo con scDb o células incubadas solo con PBLs. Después de 48 o 96 horas, se eliminó el sobrenadante y los pocillos se lavaron tres veces con PBS para eliminar los PBLs. En cada pocillo se añadieron 100 µl de medio fresco que contenía 0,5 mg/ml de sal MTT. Después de 3 horas se descartó el sobrenadante y se usaron 150 µl de disolvente MTT (isopropanol + HCl 4 mM + NP40 al 0,1%) para resuspender las sales de formazán formadas. Se leyó la absorbancia a 590 nm (filtro de referencia de 620 nm) usando un lector de microplacas Biorad-550.

Se evaluó la citotoxicidad de las células T dirigidas mediante el ensayo de liberación de Calceína AM (Biodivision Inc.). Se resuspendieron 10^6 células diana en 1 ml de medio completo que contenía 15 µM de calceína-AM, se incubaron 30 minutos a 37°C y se lavaron 3 veces con medio fresco. Se sembraron 10^4 células en placas de fondo redondo de 96 pocillos siguiendo el mismo tratamiento (tres triplicados para cada uno) usado para el ensayo de inhibición de la proliferación. Se usaron 6 pocillos replicados para la medición de la liberación espontánea y 6 para la liberación máxima (células diana en un medio que contenía Tritón X-100 al 2%). Después de 4 horas, las placas se centrifugaron a 1.500 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante, que contenía calceína fluorescente liberada, se

transfirió a una placa de 96 pocillos de paredes negras. Se midió la intensidad de fluorescencia con un lector Ultra multiplaca (Tecan Group, Mannedorf/Zurich, Suiza), con longitudes de onda de extinción/emisión de 485/535 nm.

Activación de células T

Evaluación de marcadores de activación

- 5 Se usaron células de melanoma TRAIL-R2⁺ (M15, M41 y M64) y células normales Hek-293 y células TRAIL-R2-MDA-MB-468 como células diana y se crecieron en RPMI 1640 en placas de 48 pocillos (Corning) a una densidad de $3,5 \times 10^4$ células por pocillo. Después de 12 horas se añadieron 0,5 µg/ml de scDb y se incubaron 1 h para permitir la unión a TRAIL-R2 presente en las células tumorales. Se usaron PBMC humanas recién aisladas como células efectoras y se añadieron a las células diana tratadas/no tratadas con scDb en una proporción efector-a-diana de 5:1. Después de la incubación durante 16 horas a 37°C en CO₂ al 5%, se recuperaron las células T contenidas en el sobrenadante, se lavaron con PBS y se tiñeron con anti-CD137 humano (Miltenyi Biotec), anti-PD-1 humano BV421 (Biolegend), anti-CD69 humano (BD Biosciences) y anti-CD25 humano (Caltag Laboratories), marcados con diferentes fluorocromos, durante 30 minutos en hielo. Después de lavar tres veces con PBS + FCS al 1% se analizaron las células mediante citometría de flujo en un FACSCalibur.

- 15 Determinación de la liberación de citoquinas (Bioplex)

- 20 Para determinar las cantidades de IFN-γ, IL-4, TNF e IL-2 secretadas, se recogieron los sobrenadantes diariamente durante 4 días después del inicio del tratamiento de las células tumorales con scDb más células T. Se analizaron los sobrenadantes para determinar la secreción de citoquinas usando el estándar 27-Plex de citoquinas humanas Bio-plex Pro™, Grupo I (BIORAD), de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se midió la absorción de las muestras y los valores obtenidos se usaron para calcular la concentración de las citoquinas en las muestras, de acuerdo con los valores obtenidos para las series estándar proporcionadas por el fabricante.

A partir de la anterior descripción y de los ejemplos mencionados anteriormente, resulta evidente la ventaja lograda por el producto descrito y obtenido de acuerdo con la presente invención.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> FONDAZIONE IRCCS ISTITUTO NAZIONALE DEI TUMORI

<120> Anticuerpos biespecíficos para usar en la inmunoterapia del cáncer

5 <130> 13278PTWO

<150> EP15174741.7

<151> 01-07-2015

10 <160> 22

<170> BiSSAP 1.3

<210> 1

15 <211> 121

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

20 <223> dominio variable de una cadena pesada de una inmunoglobulina (VH): VHa de 16e2 (Clase IGHV 3-20*01)

<400> 1

```
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Glu Arg Pro Gly Gly
1          5          10          15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
20          25          30
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35          40          45
Ser Gly Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Ala Asp Ser Val
50          55          60
Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65          70          75
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85          90          95
Ala Lys Ile Leu Gly Ala Gly Arg Gly Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly
100         105         110
Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115         120
```

25 <210> 2

<211> 363

<212> DNA

<213> Homo sapiens

30 <220>

<223> dominio variable de una cadena pesada de una inmunoglobulina (VH): VHa;

<400> 2

```
gaggtacagc tgggtcaatc aggtggtggg gttgagagac ccggagggag tctccggttg      60
tcttgtgctg ccagcggctt tacgttcgat gattacggga tgctgtgggt taggcaagct      120
ccaggcaagg gcctagaatg ggtatctggg ataaattgga acggcgggtc aacagggtat      180
gctgatagtg tgaaaggcag ggttactatt tccagggata atgccaaaaa ttcgctgtat      240
cttcagatga attcgtgctg agcggaggat actgcagtct actactgtgc taagatcctt      300
ggagcaggcc gtggatggta ttttgactta tgggggaagg gtaccaccgt gacgggtctcg      360
tct                                                                 363
```

<210> 3

<211> 108

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> dominio variable de una cadena ligera de una inmunoglobulina (VL): VLb (UCTH1) Anticuerpo humanizado con CDR murino

<400> 3

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr
          20          25          30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
          35          40          45
Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
          50          55          60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65          70          75          80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp
          85          90          95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
          100          105

```

10

<210> 4
<211> 324
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

15

<220>

<223> /nota="secuencia de aminoácidos de un dominio variable de una cadena ligera de una inmunoglobulina (VL): VLb (UCTH1)" /nota="Anticuerpo humanizado con CDR murino"

20

```

<400> 4
gatattcaaa tgactcagtc cccatcctca ctctcggcat cagttggtga tcgagtgacg      60
ataacatgta gggcctcgca ggacatccgc aactatctta actggtacca acaaaaacca      120
gggaaggctc caaaattact aatctattac acctcacgtc tcgaatcagg tgttcctagt      180
cgcttcagcg gatcaggttc cggaacagat tataccctta ctatatcgtc cctccaacca      240
gaagactttg ccacttatta ctgtcaacag ggcaacacct taccctggac ttttggacag      300
gggacaaaag tcgagattaa gcgc                                           324

```

<210> 5

<211> 122
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

25

<220>

<223> dominio variable de una cadena pesada de una inmunoglobulina (VH): VHb (UCTH1) Anticuerpo humanizado con CDR murino

30

<400> 5

ES 2 848 391 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30
 Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly Val Ser Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 6
 <211> 366
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> dominio variable de una cadena pesada de una inmunoglobulina (VH): VHb

<400> 6
 gaagtacaac tgggtgagag tgggggcggt ttagttcaac cgggcggaag cctgagactt 60
 tcgtgcgccg cgagtggata ttcttttacg ggctacacaa tgaactgggt ccggcaggca 120
 ccaggaaagg ggcttgaatg ggctcgttta ataaacccat ataagggcgt aagcacctat 180
 aaccagaaat ttaaagatcg tttcacaata tcagtcgata aatctaagaa taccgcctat 240
 ctccaaatga attccctcag agctgaagat accgccgtgt attactgtgc aaggagcgggt 300
 tactatggcg attcagattg gtacttcgat gtgtggggac aggggacgct tgtaactgtg 360
 tcgtcc 366

<210> 7
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> dominio variable de una cadena ligera de una inmunoglobulina (VL): VLa de 16e2 (Clase IGLV3-19*01)

<400> 7
 Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln Thr
 1 5 10 15
 Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala Ser
 20 25 30
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr Gly
 35 40 45
 Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser
 50 55 60
 Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu Asp
 65 70 75 80
 Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn His Val
 85 90 95
 Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105

<210> 8
 <211> 321

<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
5 <223> dominio variable de una cadena ligera de una inmunoglobulina (VL): VLa de 16e2 (Clase IGLV3-19*01)

<400> 8
agtgaactaa ctcaggaccc cgctgtgtct gtcgcgcttg gccaaacggt gcggataacc 60
tgtcaagggtg acagtctaag gtctattat gcattcttggt atcaacagaa acccggacaa 120
gcaccgggttc tggttatcta cggtaaaaac aatcgccctt cgggtatacc tgatcgcttc 180
tccgggtcga gctccgggaa tacagcctct ctaacgataa cgggggctca agcagaagat 240
gaagcagact attattgcaa ttcaaggac agctctggca accacgtcgt ctttggggga 300
ggcaciaaagt tgacagtcct t 321

10 <210> 9
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens

15 <220>
<223> (secuencia que viene antes del dominio VHA, sitio de restricción Sfi I)

<400> 9
gcggcccagc cgccatggc c 21

20 <210> 10
<211> 18
<212> DNA
<213> Homo sapiens

25 <220>
<223> (enlazador entre los dominios VHA y VLB, sitio de restricción Age I)

<400> 10
30 accggtggag gcggttca 18

<210> 11
<211> 45
<212> DNA
35 <213> Homo sapiens

<220>
<223> (enlazador entre los dominios VLB y VHB)

<400> 11
40 ggtggaggcg gtcaggcgg aggtggctct ggcggtggcg gatcg 45

<210> 12
<211> 18
45 <212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> (enlazador entre los dominios VHB y VLA, sitio de restricción Xba I)

50 <400> 12
ggtggaggcg gttctaga 18

<210> 13
55 <211> 487
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> anticuerpo biespecífico de cadena única

5

<400> 13

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Glu	Arg	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Asp	Asp	Tyr
			20					25					30		
Gly	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ser	Gly	Ile	Asn	Trp	Asn	Gly	Gly	Ser	Thr	Gly	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
	50					55					60				
Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr
65					70				75						80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85					90					95		
Ala	Lys	Ile	Leu	Gly	Ala	Gly	Arg	Gly	Trp	Tyr	Phe	Asp	Leu	Trp	Gly
			100					105					110		
Lys	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Thr	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp
	115						120					125			
Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Asp

130	135	140
Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr Leu		
145	150	155
Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr		160
	165	170
Tyr Thr Ser Arg Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser		175
	180	185
Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu		190
	195	200
Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp Thr		205
	210	215
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Gly Gly Gly Gly Ser		220
225	230	235
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu		240
	245	250
Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys		255
	260	265
Ala Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Thr Met Asn Trp Val Arg		270
	275	280
Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Leu Ile Asn Pro Tyr		285
	290	295
Lys Gly Val Ser Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile		300
305	310	315
Ser Val Asp Lys Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu		320
	325	330
Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr		335
	340	345
Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val		350
	355	360
Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Ser Glu Leu Thr Gln Asp		365
	370	375
Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln		380
385	390	395
Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro		400
	405	410
Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser		415
	420	425
Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser		430
	435	440
Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys		445
	450	455
Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn His Val Val Phe Gly Gly Gly Thr		460
465	470	475
Lys Leu Thr Val Leu Ala Ala		480
	485	

<210> 14

<211> 1484

5 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> anticuerpo biespecífico de cadena única con vector term. aguas arriba

10

<400> 14

gcgcccccagc cggccatggc cgaggtacag ctggtgcaat caggtggtgg ggttgagaga 60

cccggaggga gtctccggtt gtcttgtgct gccagcggct ttacgttcga tgattacggg 120

atgtcgtggg ttaggcaagc tocaggcaag ggcctagaat gggatatctgg gataaattgg 180
aacggcgggt caacagggtg tgctgatagt gtgaaaggca gggttactat ttocagggat 240
aatgccaaaa attcgtctga tottcagatg aattcgtctgc gagcggagga tactgcagtc 300
tactactgtg ctaagatcct tggagcaggc cgtggatggg attttgactt atgggggaag 360
gggtaccaccg tgacgggtctc gtctaccggg ggaggcgggt cagatattca aatgactcag 420
tccccatcct cactctcggc atcagttggg gatcgagtga cgataacatg tagggcctcg 480
caggacatcc gcaactatct taactggtac caacaaaaac cagggaaggc tccaaaatta 540
ctaactctatt acacctcacg tctcgaatca ggtgttctta gtgcgttcag cggatcagggt 600
tccggaacag attataccct tactatatcg tccctccaac cagaagactt tgccacttat 660
tactgtcaac agggcaacac cttaccctgg acttttgac aggggacaaa agtcogagatt 720
aagcgcgggtg gaggcgggtc aggcggagggt ggctctggcg gtggcggatc ggaagtacaa 780
ctgggttgaga gtggggggcg tttagttcaa cggggcgga gcttgagact ttogtgcgcc 840
gogagtggat attcttttac gggctacaca atgaactggg tccggcaggc accaggaaag 900
gggcttgaat gggctcgttt aataaaccca tataaggcg taagcaccta taaccagaaa 960
tttaaagatc gtttcacaat atcagtcgat aaatctaaga ataccgccta tctccaaatg 1020
aattccctca gagctgaaga taccgccgtg tattactgtg caaggagcgg ttactatggc 1080
gattcagatt ggtacttcga tgtgtgggga caggggacgc ttgtaactgt gtogtccggg 1140
ggaggcgggt ctagaagtga actaactcag gaccccgctg tgtctgtcgc gcttggccaa 1200
acggtgcgga taacctgtca aggtgacagt ctaaggtcct attatgcac ttggtatcaa 1260
cagaaacccg gacaagcacc tgttctgggt atctacggta aaaacaatcg cccttcgggt 1320
atacctgac gcttctccgg gtcgagctcc gggaatacag cctctctaac gataacgggg 1380
gctcaagcag aagatgaagc agactattat tgcaattcaa gggacagctc tggcaaccac 1440
gtcgtctttg ggggaggcac aaagttgaca gtccttgccg ccgc 1484

<210> 15
<211> 15
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
10 <223> (enlazador alternativo entre los dominios VLB y VHB)

<400> 15
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

15 <210> 16
<211> 511
<212> PRT
20 <213> Homo sapiens

<220>
<223> anticuerpo biespecífico de cadena única con etiquetas His y Myc

<400> 16

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Glu	Arg	Pro	Gly	Gly		
1				5				10						15			
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Asp	Asp	Tyr		
		20						25					30				
Gly	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val		
	35						40					45					
Ser	Gly	Ile	Asn	Trp	Asn	Gly	Gly	Ser	Thr	Gly	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val		
	50					55					60						
Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr		
65					70				75						80		
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys		
			85						90					95			
Ala	Lys	Ile	Leu	Gly	Ala	Gly	Arg	Gly	Trp	Tyr	Phe	Asp	Leu	Trp	Gly		
		100						105					110				
Lys	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Thr	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp		
	115						120						125				
Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Asp		
	130					135						140					
Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Arg	Asn	Tyr	Leu		
145					150					155					160		
Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr		
			165					170						175			
Tyr	Thr	Ser	Arg	Leu	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser		
		180						185					190				
Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu		
	195						200					205					
Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Gly	Asn	Thr	Leu	Pro	Trp	Thr		
	210					215					220						
Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser		
225					230					235					240		
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu		
			245						250					255			
Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys		
		260						265					270				
Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	Gly	Tyr	Thr	Met	Asn	Trp	Val	Arg		
	275						280					285					
Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ala	Leu	Ile	Asn	Pro	Tyr		
	290					295					300						
Lys	Gly	Val	Ser	Thr	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Asp	Arg	Phe	Thr	Ile		
305					310					315					320		
Ser	Val	Asp	Lys	Ser	Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu		
			325						330					335			
Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Ser	Gly	Tyr	Tyr		
		340						345					350				
Gly	Asp	Ser	Asp	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val		
	355						360					365					
Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Arg	Ser	Glu	Leu	Thr	Gln	Asp		

```

      370              375              380
Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln
385              390              395              400
Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
      405              410              415
Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser
      420              425              430
Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser
      435              440              445
Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
      450              455              460
Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn His Val Val Phe Gly Gly Gly Thr
465              470              475              480
Lys Leu Thr Val Leu Ala Ala His His His His His Gly Ala
      485              490              495
Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
      500              505              510

```

<210> 17
 <211> 254
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Clon 7 anti-TRAIL-R2 ScFv aislado con Phage Display (VH-ENLAZADOR-VL)

```

<400> 17
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Ser Pro Gly Glu
1              5              10              15
Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Leu Gly Tyr Asp Phe Thr Thr Tyr
      20              25              30
Trp Ile Ala Leu Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Met
      35              40              45
Gly Leu Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Lys Tyr Ser Pro Ser Phe
50              55              60
Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65              70              75              80
Leu Gln Trp Ser Ser Leu Arg Pro Ser Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
      85              90              95
Ala Arg His Asp Val Gly Tyr Cys Ser Ser Ser Asn Cys Ala Lys Arg
      100              105              110
Pro Glu Tyr Phe Gln His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
      115              120              125
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
130              135              140
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly
145              150              155              160
Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser His Gly Ile Ser Ser Tyr
      165              170              175
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
      180              185              190
Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Gly Gly
      195              200              205
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Val Ser Gly Leu Gln Pro
210              215              220
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu
225              230              235              240
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Ala
      245              250

```

<210> 18
 <211> 242
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>

<223> Clon 8 anti-TRAIL-R2 ScFv aislado con Phage Display (VH-ENLAZADOR-VL)

<400> 18

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile Ser Gln Gln Gly Gln Val Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Arg Trp Asn Arg Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110
Ile Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
115 120 125
Gly Gly Ser Thr Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
130 135 140
Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser
145 150 155 160
Ile Ser Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
165 170 175
Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Gly Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser
180 185 190
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
195 200 205
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Ser
210 215 220
Met Ser Pro Asn Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
225 230 235 240
5 Ala Ala

<210> 19

<211> 250

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<220>

<223> Clon 44 anti-TRAIL-R2 ScFv aislado con Phage Display (VH-ENLAZADOR-VL)

15 <400> 19

Gln Val His Leu Arg Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
20 25 30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Ser Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Pro Asn His Gly Gly Asp Arg Arg Asp Asp Ala Leu Asp
100 105 110
Met Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Glu Leu Thr Gln
130 135 140
Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln Thr Val Arg Ile Thr Cys
145 150 155 160
Gln Gly His Ser Leu Arg Ser Tyr Phe Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Arg
165 170 175
Pro Arg Gln Ala Pro Thr Leu Val Ile Tyr Gly Lys Asn Asn Arg Pro
180 185 190
Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala
195 200 205
Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr
210 215 220
Cys Gly Ser Arg Asp Ser Ser Ser Thr His Arg Gly Val Phe Gly Gly
225 230 235 240
Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Ala Ala
245 250

<210> 20
<211> 231
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
10 <223> Clon 56 anti-TRAIL-R2 ScFv aislado con Phage Display (VH-ENLAZADOR-VL)

<400> 20
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ser Ile Ala Asn Gly Lys Met Thr Gln Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Lys Arg Trp Asn Arg Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Ile
100 105 110
Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
115 120 125
Gly Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser

ES 2 848 391 T3

130	135	140
Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser		
145	150	155
Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp		160
	165	170
Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser		175
	180	185
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu		190
	195	200
Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Gly Gln		205
	210	215
Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		220
225	230	

<210> 21
 <211> 1463
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> anticuerpo biespecífico de cadena única

<400> 21
 gaggtacagc tgggtgcaatc aggtggtggg gttgagagac ccggaggagg tctccggttg 60
 tcttgtgctg ccagcggctt tacgttcgat gattacggga tgctgtgggt taggcaagct 120
 ccaggcaagg gcctagaatg ggtatctggg ataaattgga acggcgggtc aacagggtat 180
 gctgatagtg tgaaaggcag ggttactatt tccagggaata atgccaaaaa ttogctgtat 240
 cttcagatga attcgtgctg agcggaggat actgcagtct actactgtgc taagatcctt 300
 ggagcaggcc gtggatggta ttttgactta tgggggaagg gtaccaccgt gacgggtctcg 360
 tctaccggtg gaggcggctt agatattcaa atgactcagt ccccatcctc actctcggca 420
 tcagttggtg atcgagtgc gataacatgt agggcctcgc aggacatccg caactatctt 480
 aactggtacc aacaaaaacc aggaaggct ccaaaattac taatctatta cacctcacgt 540
 ctgcaatcag gtgttcctag tcgttcctcgc ggatcagggt ccggaacaga ttataccctt 600
 actatatcgt ccctccaacc agaagacttt gccacttatt actgtcaaca gggcaacacc 660
 ttaccctgga cttttggaca ggggacaaaa gtogagatta agcgcgggtg aggcgggttca 720
 ggcggagggtg gctctggcgg tggcggatcg gaagtacaac tggttgagag tgggggagggt 780
 ttagttcaac cgggcggaag cctgagactt togtgcgccg cgagtggata ttcttttacg 840
 ggctacacaa tgaactgggt ccggcaggca ccaggaaagg ggcttgaatg ggtocttcta 900
 ataaacccat ataaggcgt aagcacctat aaccagaaat ttaaagatcg tttcacaata 960
 tcagtcgata aatctaagaa taccgcctat ctocaaatga attccctcag agctgaagat 1020
 accgccgtgt attactgtgc aaggagcgggt tactatggcg attcagattg gtacttcgat 1080

ES 2 848 391 T3

```

gtgtggggac aggggacgct tgtaactgtg togtccggtg gaggcgggtc tagaagtgaa 1140
ctaactcagg accccgctgt gtctgtcgcg cttggccaaa cgggtcggat aacctgtcaa 1200
ggtgacagtc taaggtccta ttatgcatct tggatatcaac agaaaccgg acaagcacct 1260
gttctgggta tctacggtaa aaacaatcgc ccttcgggta tacctgatcg cttctccggg 1320
tcgagctccg ggaatacagc ctctctaacg ataacggggg ctcaagcaga agatgaagca 1380
gactattatt gcaattcaag ggacagctct ggcaaccacg togtctttgg gggaggcaca 1440
aagttgacag tccttgcggc cgc 1463

```

<210> 22
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> enlazador entre los dominios VHA y VLB

<220>
 <221> variación
 <222> 15
 <223> /sustituir="A puede ser sustituido por T"

<400> 22
 ggtggaggcg gttca 15

REIVINDICACIONES

1. Un diacuerpo biespecífico de cadena única que comprende:

a. un dominio variable de una cadena pesada de una inmunoglobulina (VH) con una primera especificidad (A), en donde dicho dominio variable de la cadena pesada (VH_A) tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID N°: 1, en donde la primera especificidad (A) se dirige contra el antígeno TRAIL-R2;

b. un dominio variable de una cadena ligera de una inmunoglobulina (VL) con una segunda especificidad (B), en donde dicho dominio variable de la cadena ligera (VL_B) tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID N°: 3, en donde la segunda especificidad (B) se dirige contra un CD3 del linfocito T;

c. un dominio variable de una cadena pesada de una inmunoglobulina (VH) con la especificidad (B), en donde dicho dominio variable de la cadena pesada (VH_B) tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID N°: 5; y

d. un dominio variable de una cadena ligera de una inmunoglobulina (VL) con la especificidad (A), en donde dicho dominio variable de la cadena ligera (VL_A) tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID N°: 7;

en donde los dominios VH y VL del anticuerpo biespecífico de cadena única están conectados en el orden VH_A-VL_B-VH_B-VL_A, en donde cada dominio VH y VL está conectado con un enlazador peptídico, en donde dicho enlazador peptídico entre los dominios VH_A y VL_B y entre los dominios VH_B y VL_A consiste en cuatro residuos de aminoácidos de Glicina y un residuo de aminoácido de Serina (GGGGS), y el enlazador peptídico entre los dominios VL_B y VH_B consiste en tres secuencias enlazadoras que consisten en cuatro residuos de aminoácidos de Glicina y un residuo de aminoácido de Serina cada uno (GGGGS)₃.

2. El anticuerpo biespecífico de cadena única de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID N°: 13.

3. Una composición que comprende un anticuerpo biespecífico de cadena única de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 y un agente de marcaje.

4. La composición de acuerdo con la reivindicación 3, en donde dicho agente de marcaje se elige del grupo que consiste en un radionucleótido o nanopartículas fluorescentes.

5. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo biespecífico de cadena única de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 y un transportador farmacéuticamente aceptable.

6. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 5, para rutas de administración intramuscular, intravenosa, por infusión, subcutánea o por inhalación.

7. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6, usada en combinación con al menos un compuesto adicional que es capaz de mejorar o reducir su eficacia.

8. Un método *in vitro* para redirigir la acción citotóxica de los linfocitos T sobre una célula tumoral que comprende la etapa de poner en contacto dicha célula tumoral con el anticuerpo biespecífico de cadena única de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2.

9. Un anticuerpo biespecífico de cadena única, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, para usar en el tratamiento de un tumor.

10. El anticuerpo biespecífico de cadena única para usar de acuerdo con la reivindicación 9, en donde dicho tumor se selecciona del grupo que consiste en melanoma, carcinoma de ovario, carcinoma de mama, carcinoma de próstata, adenocarcinomas colorrectales, carcinoma hepatocelular y carcinoma escamoso de pulmón.

11. El anticuerpo biespecífico de cadena única para usar de acuerdo con la reivindicación 9, en donde dicho tratamiento es de pacientes que son resistentes o intolerantes al tratamiento previo con al menos un agente antitumoral o en donde se debe evitar el tratamiento con un agente antitumoral.

12. El anticuerpo biespecífico de cadena única para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 11, en donde dicho tratamiento es profiláctico o terapéutico.

FIGURA 1

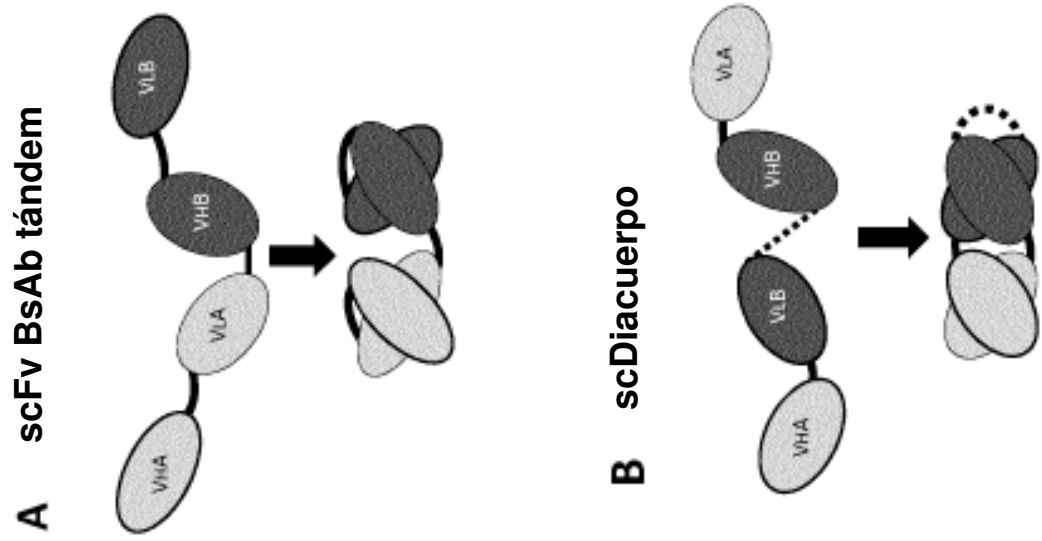


FIGURA 1

C Diacuerpo de cadena única



FIGURA 2A

A ScFv 16e2/TR66 tándem

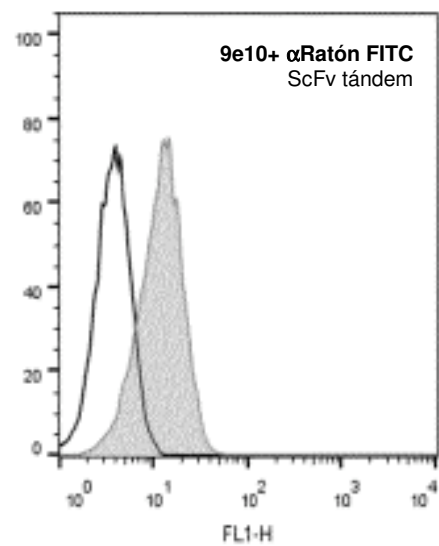
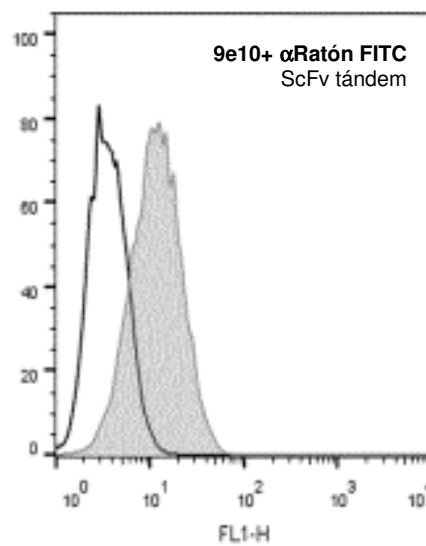
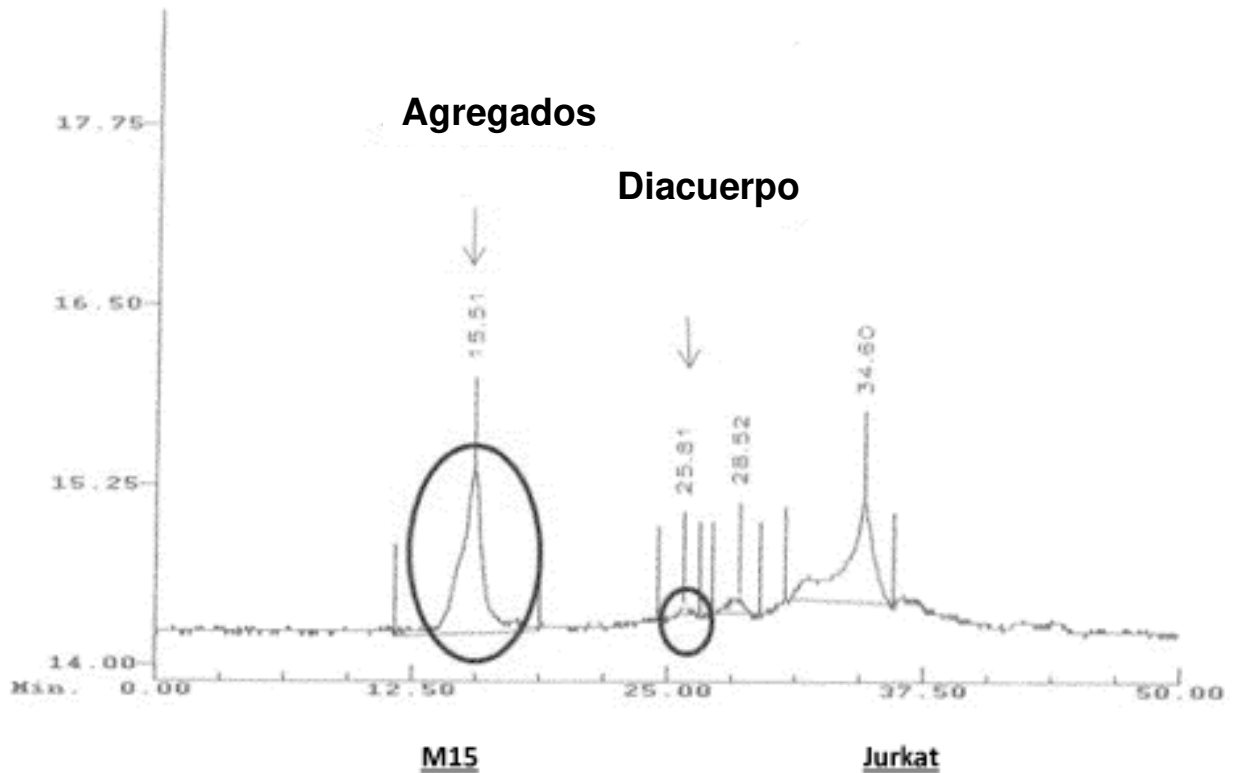
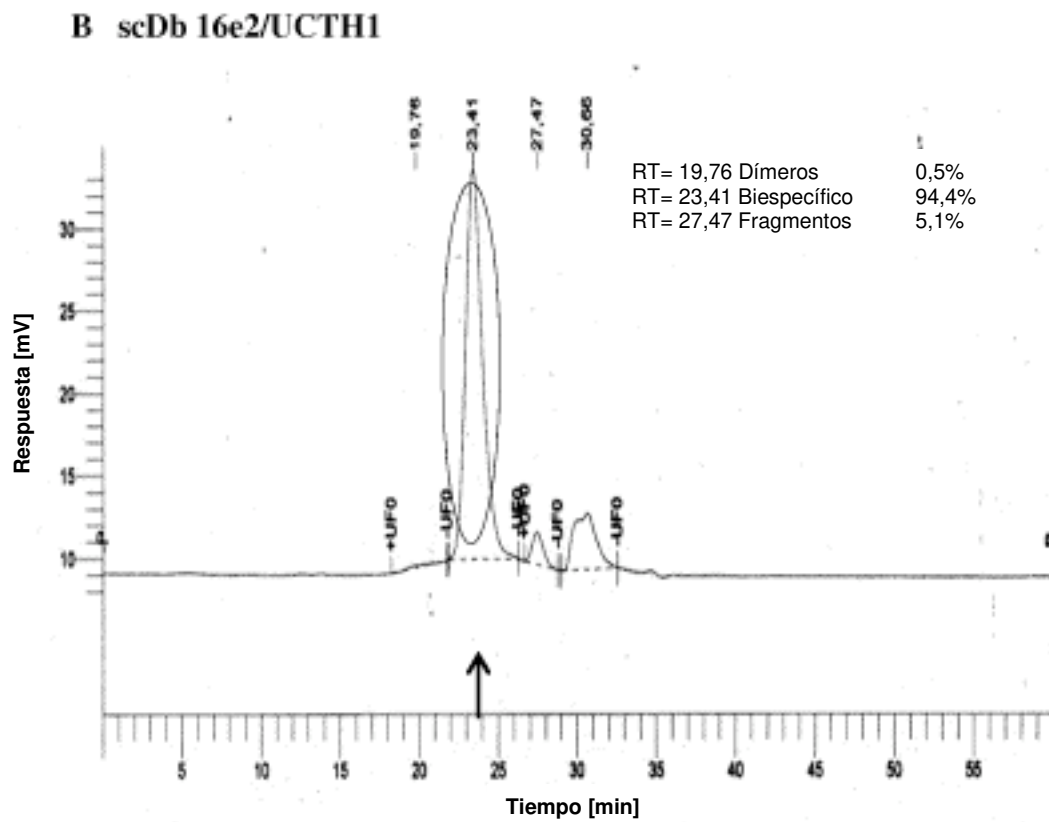
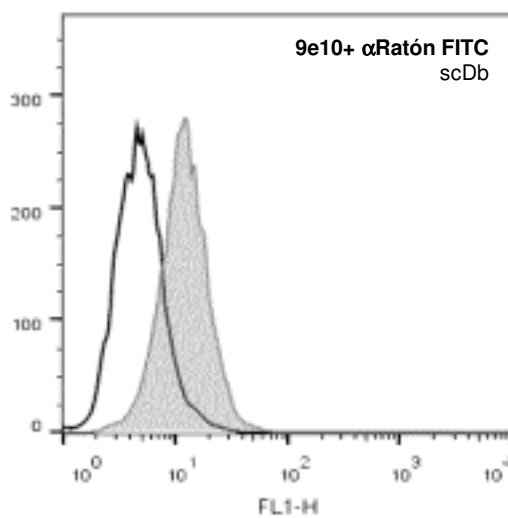


FIGURA 2B



M15



Jurkat

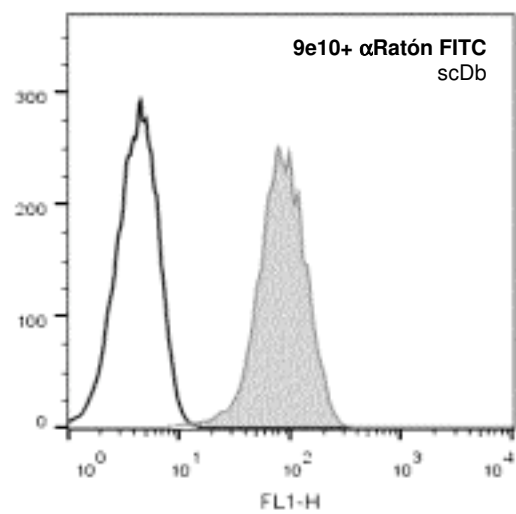
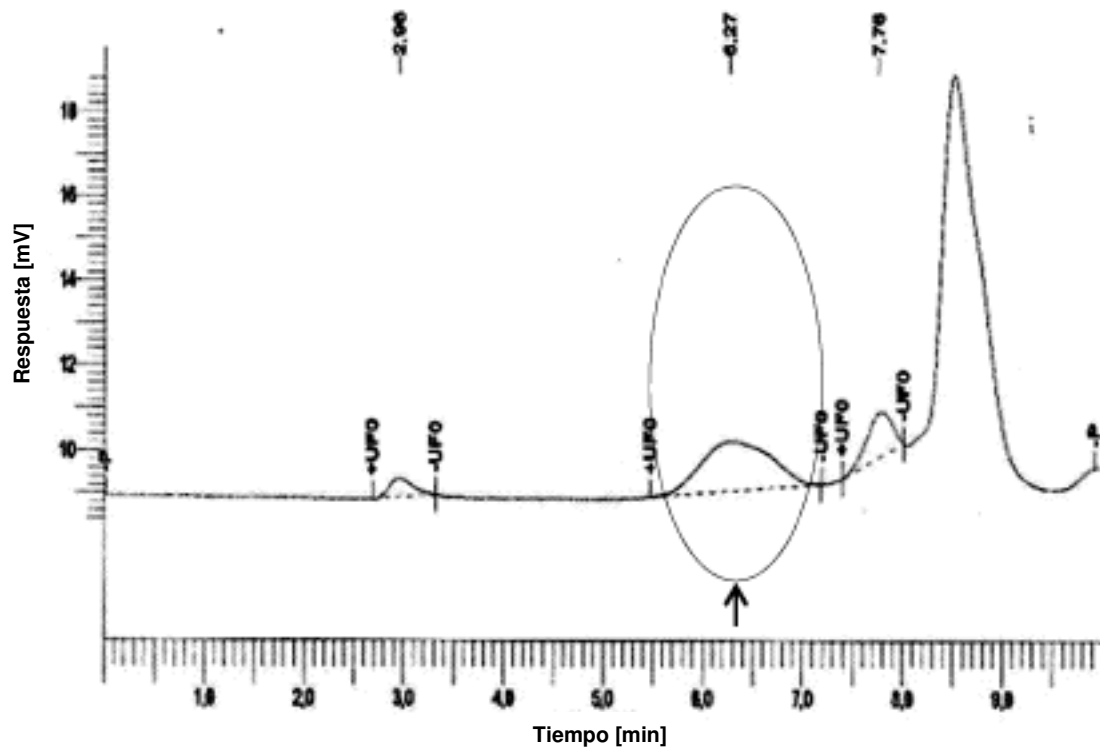
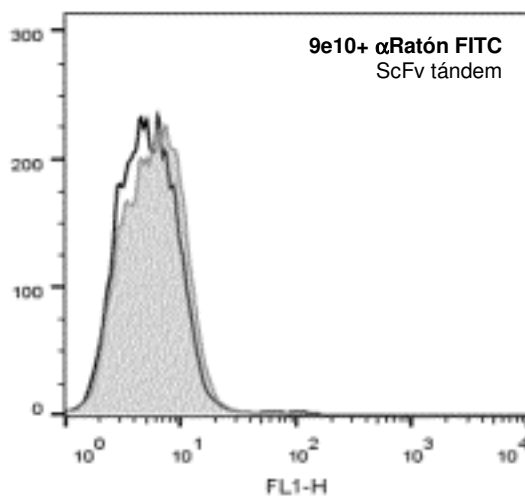


FIGURA 2C

C ScFv 16e2/UCTH1 tándem



M15



Jurkat

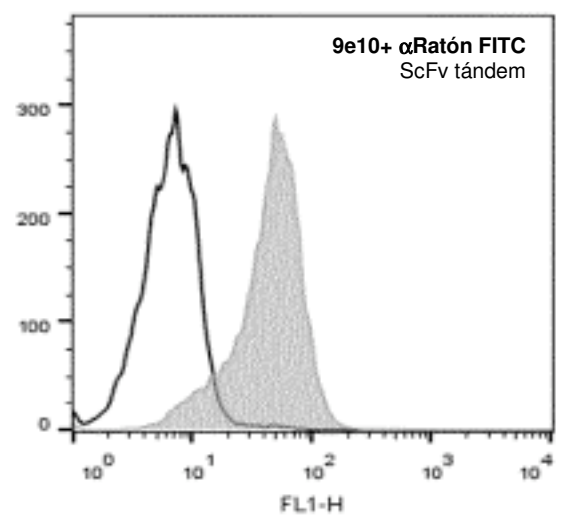
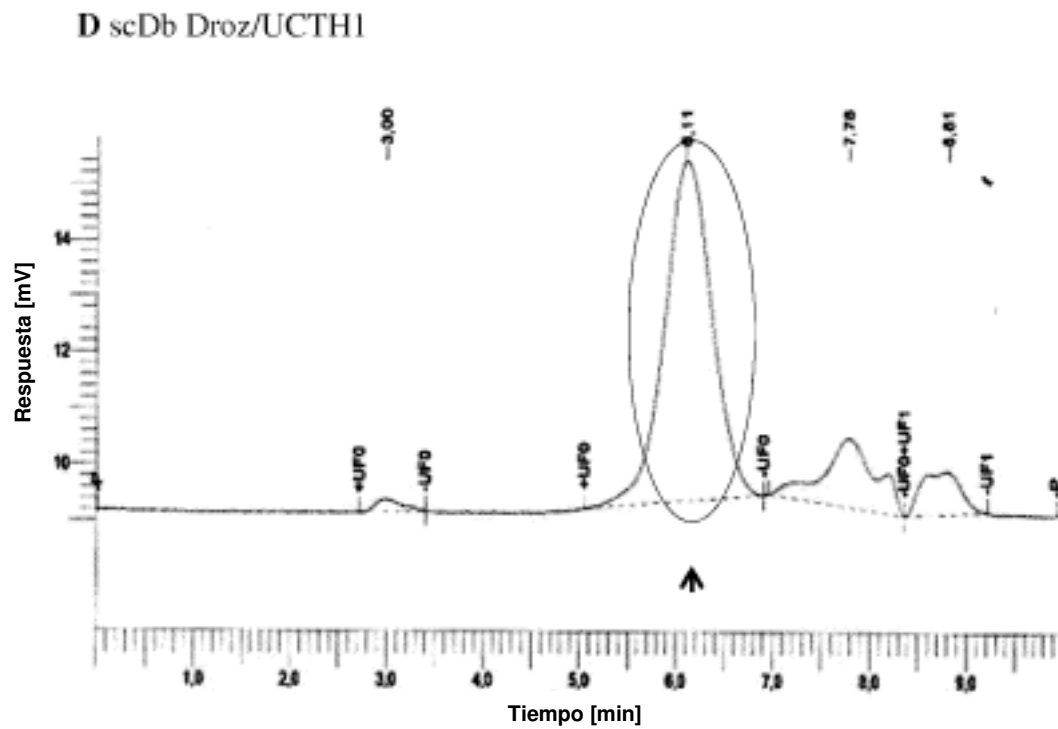
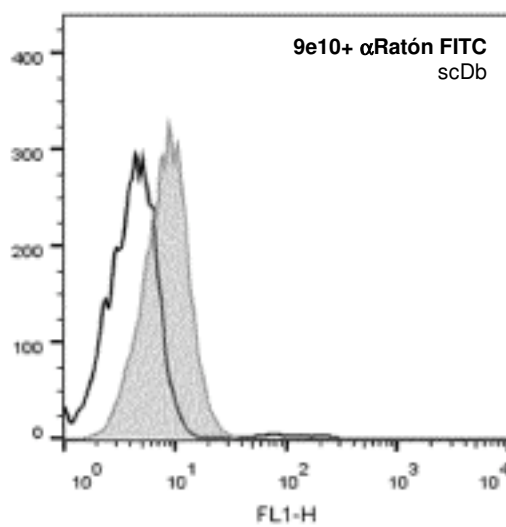


FIGURA 2D



M15



Jurkat

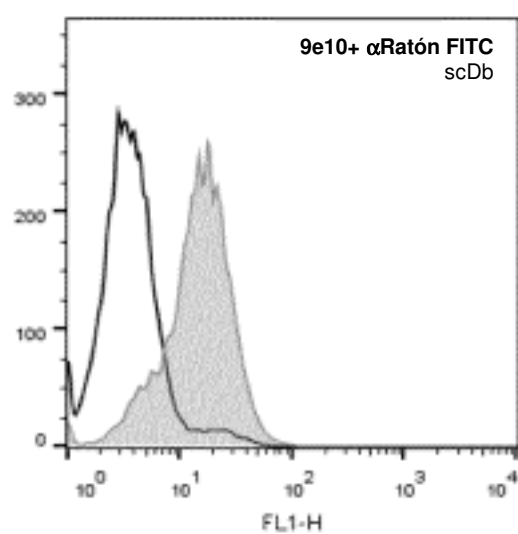


FIGURA 3A

A

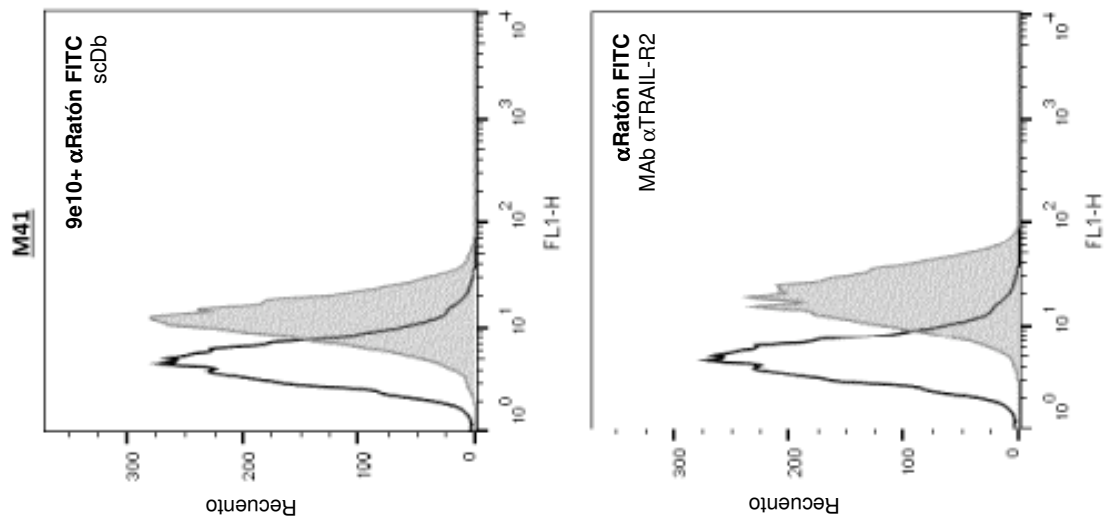


FIGURA 3A continuación

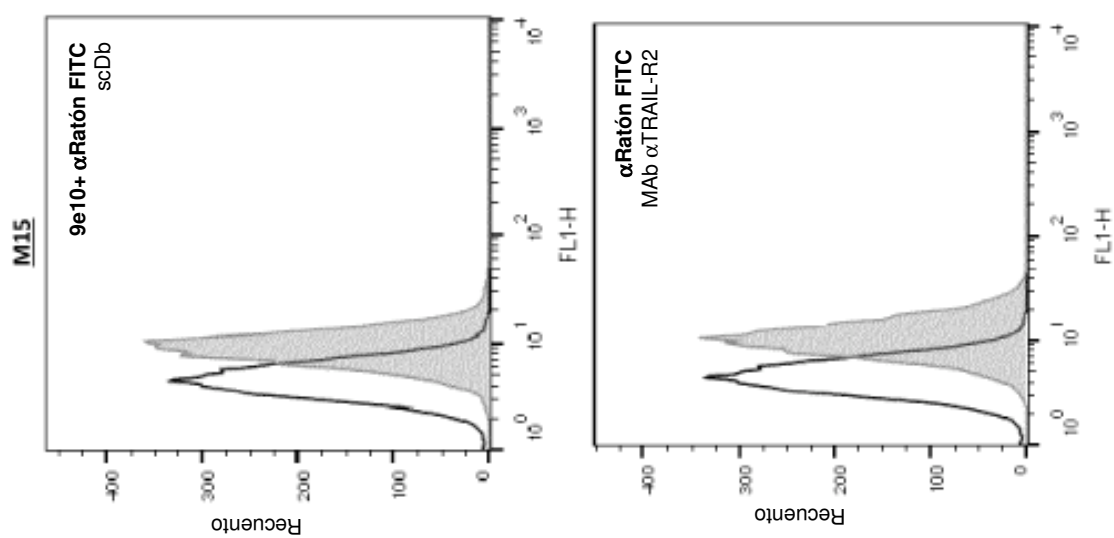


FIGURA 3A continuación

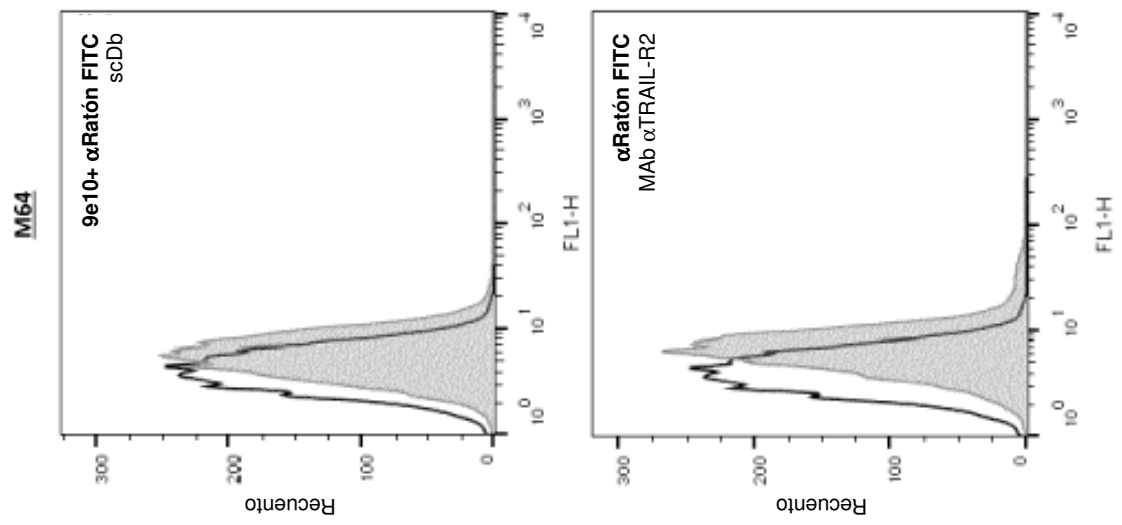


FIGURA 3A continuación

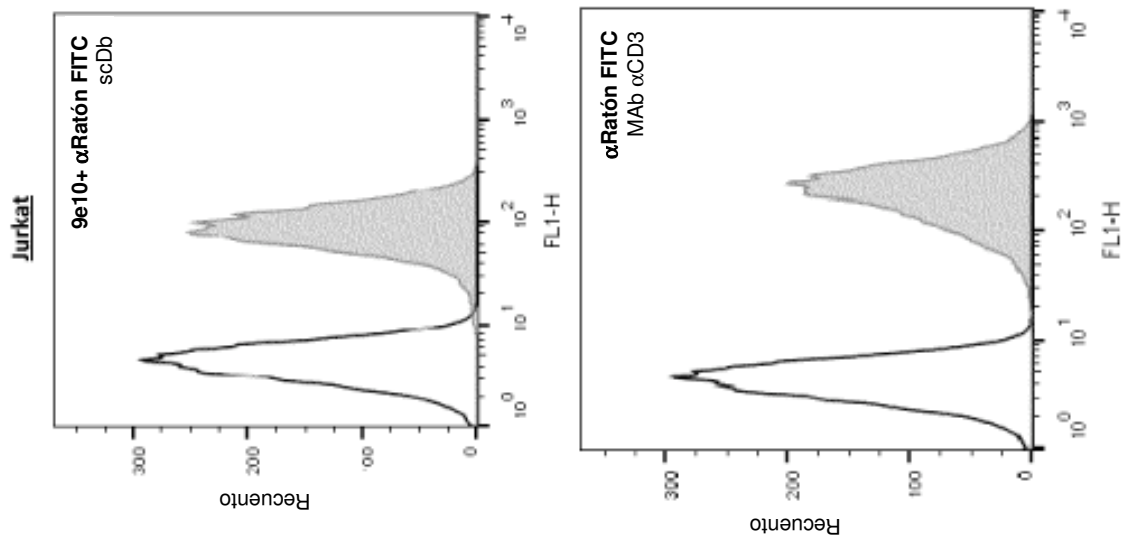


FIGURA 3A continuación

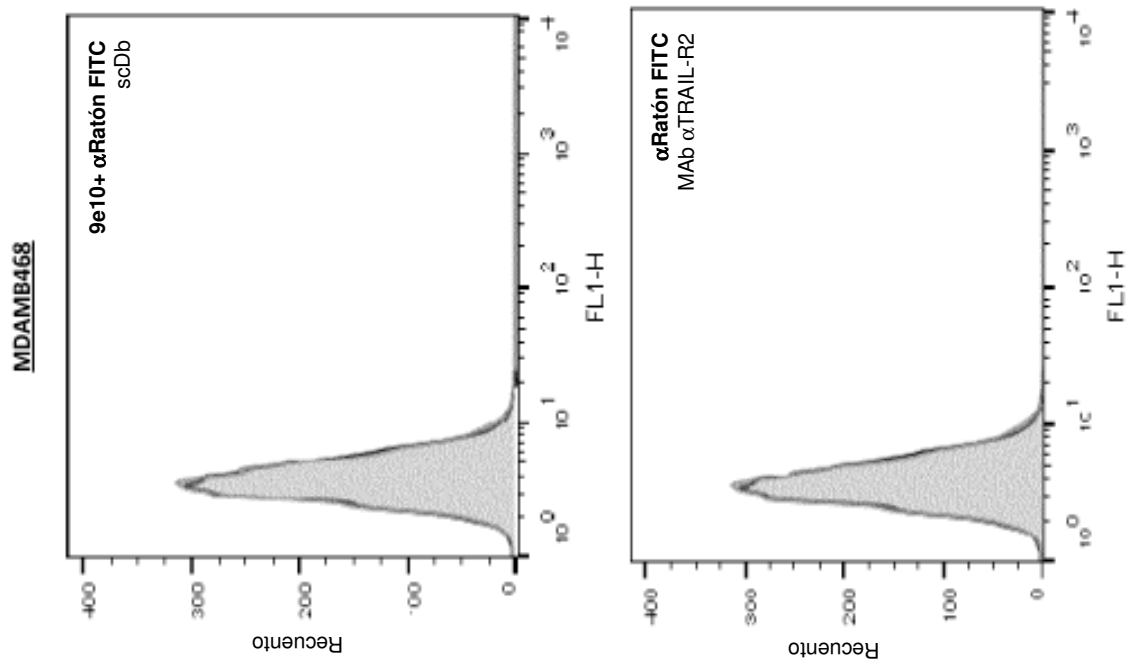


FIGURA 3B

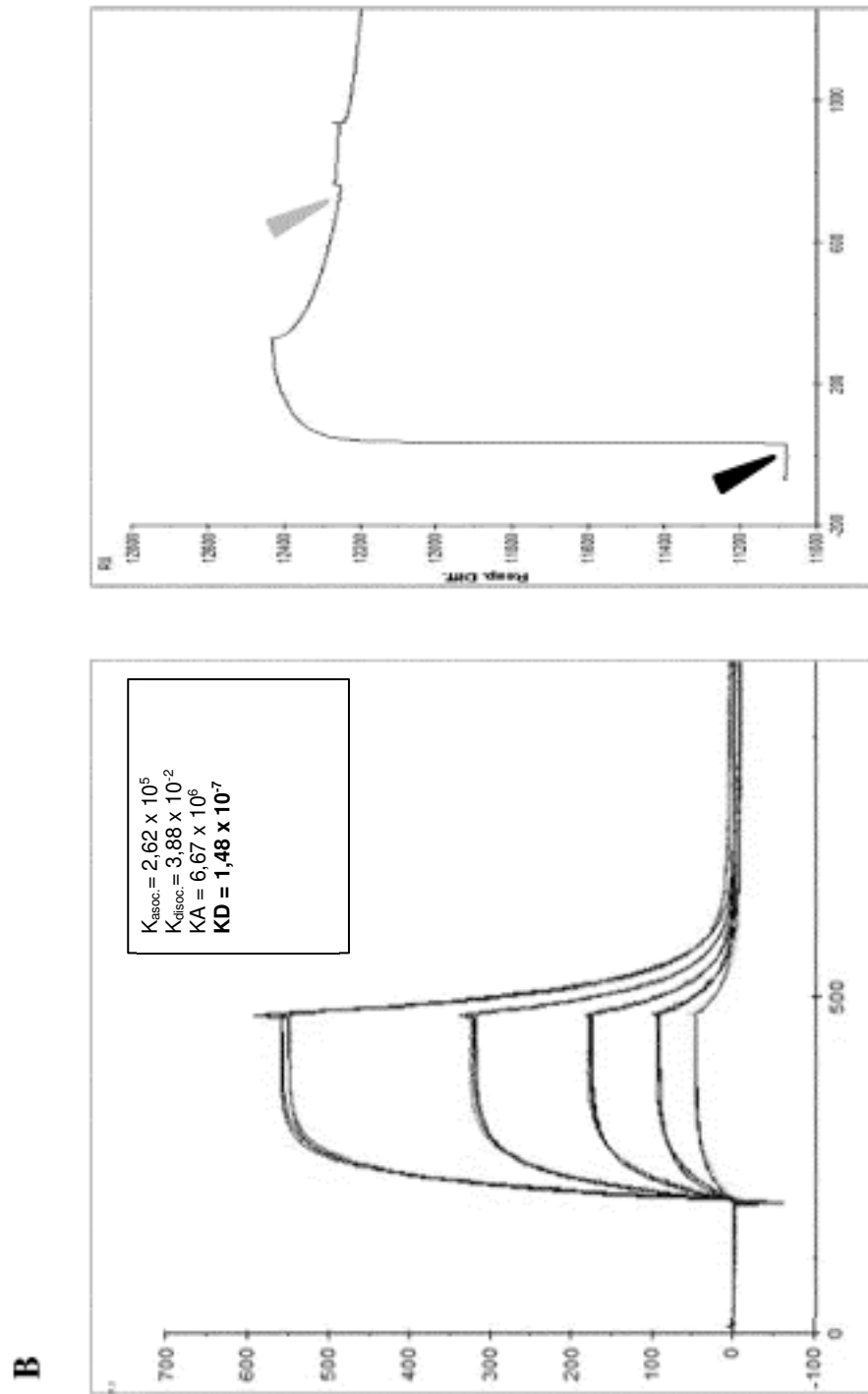
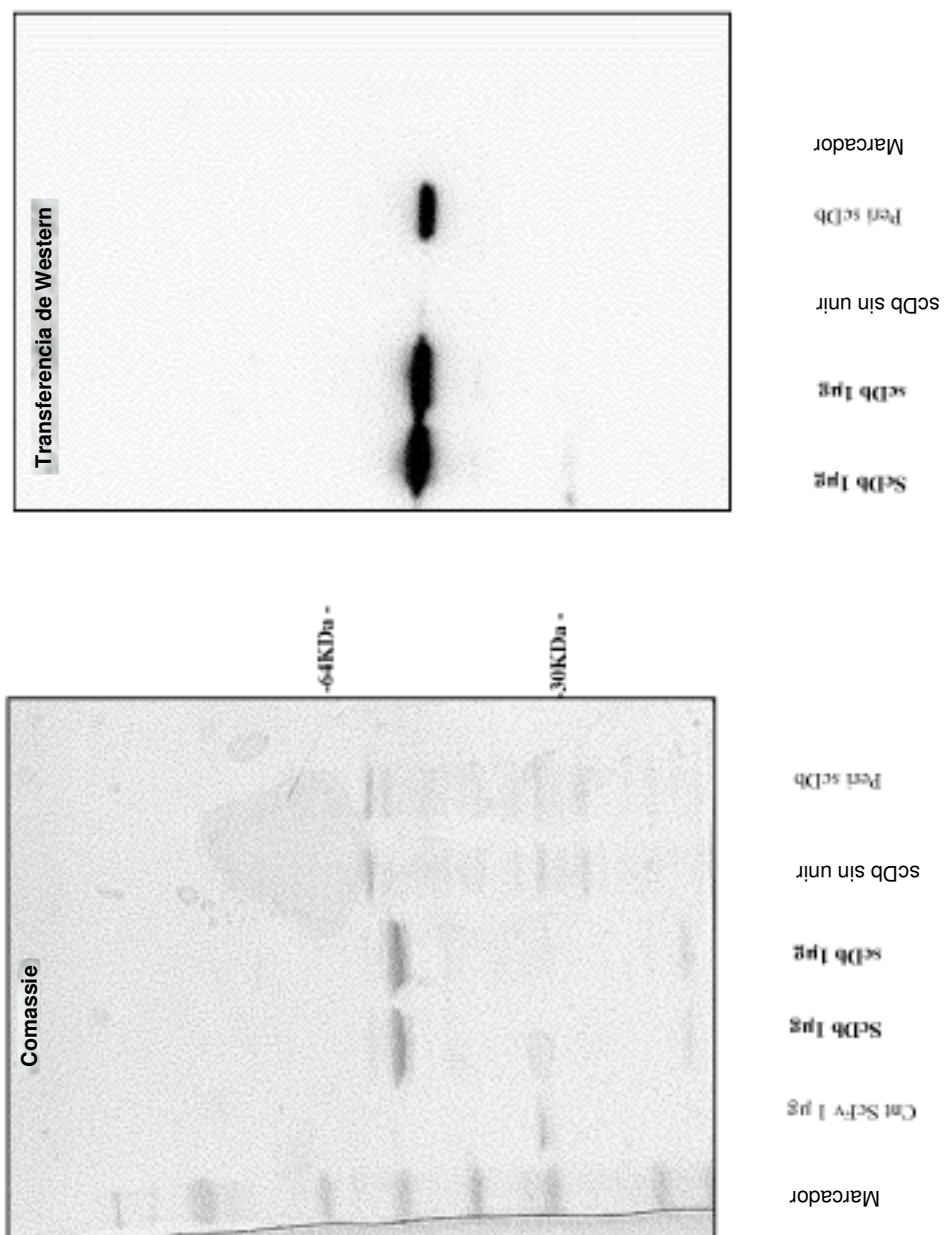


FIGURA 3C



C

FIGURA 3D

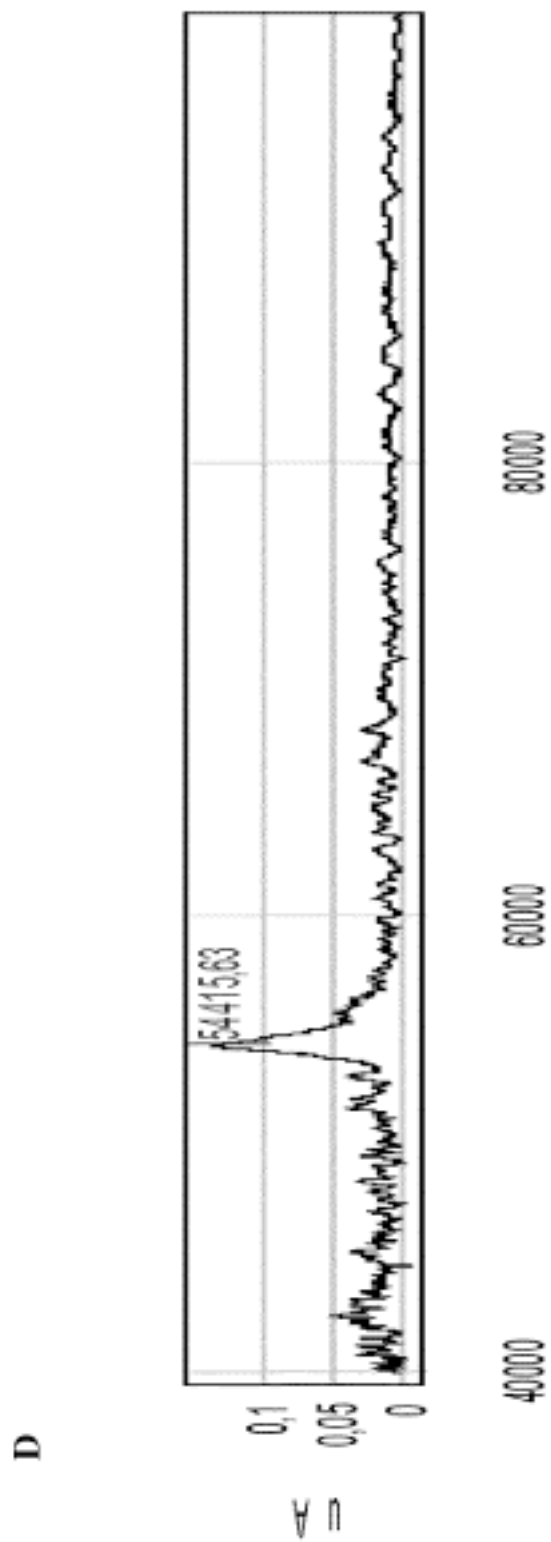


FIGURA 4

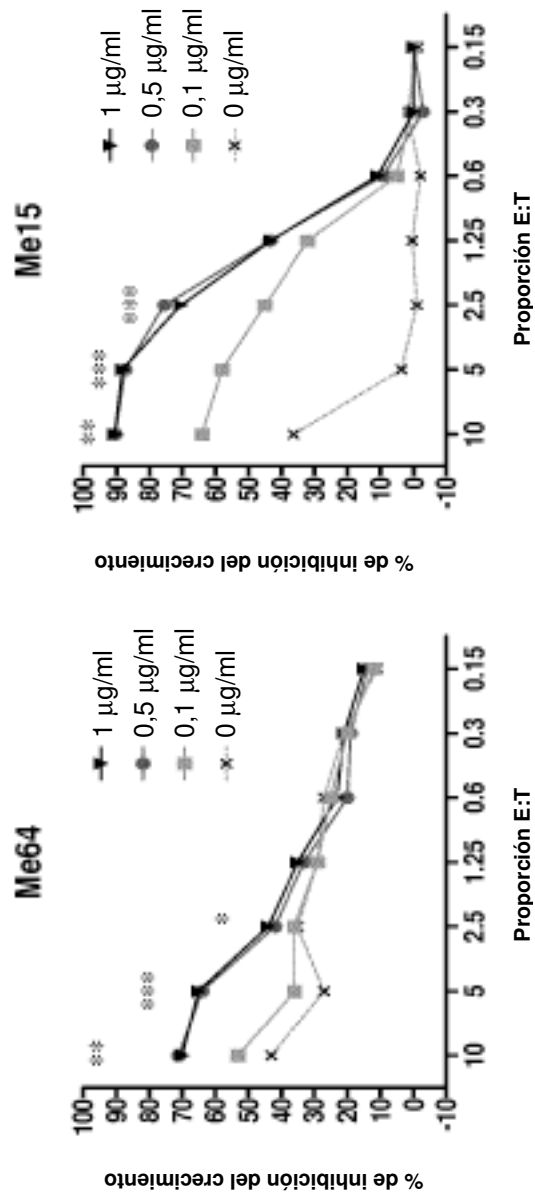


FIGURA 4

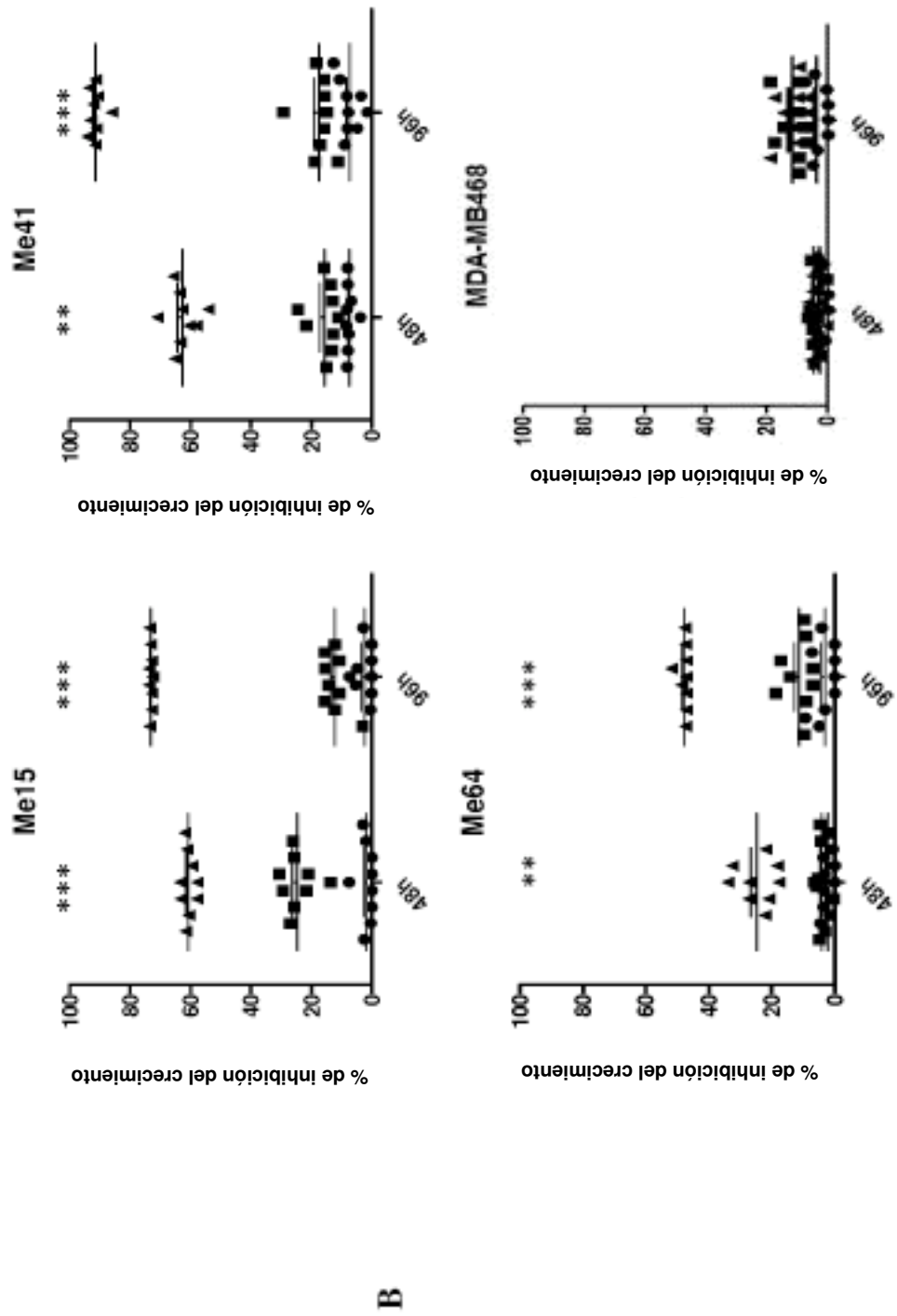


FIGURA 4

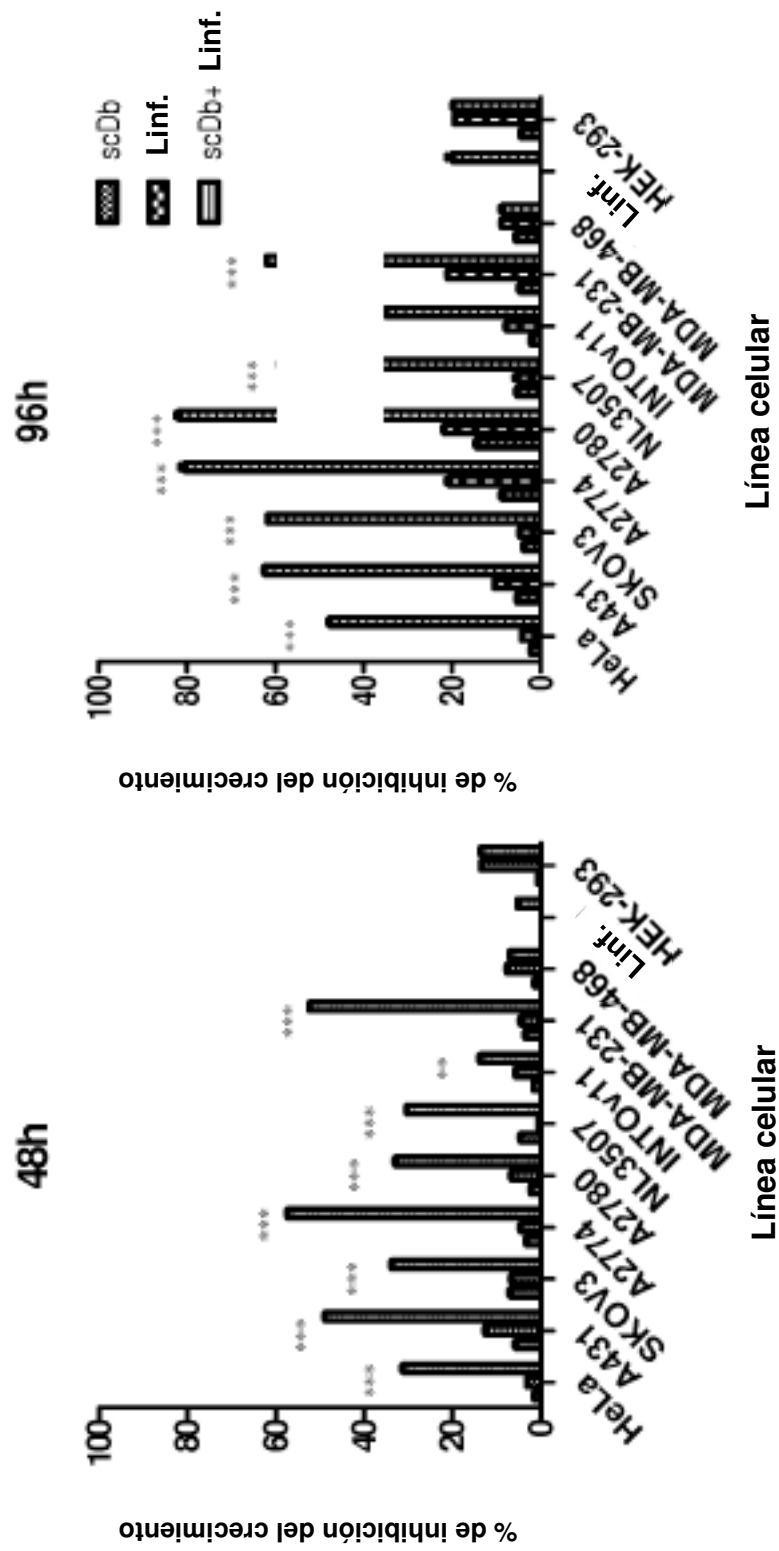


FIGURA 4

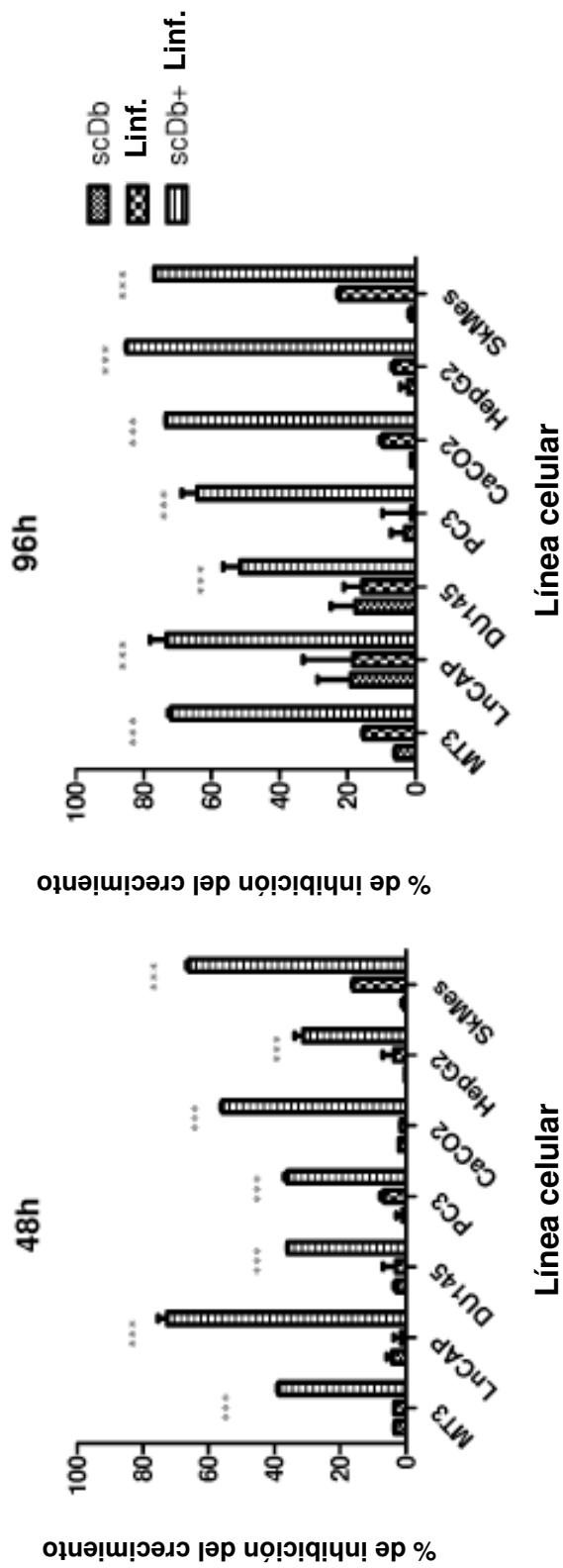


FIGURA 4

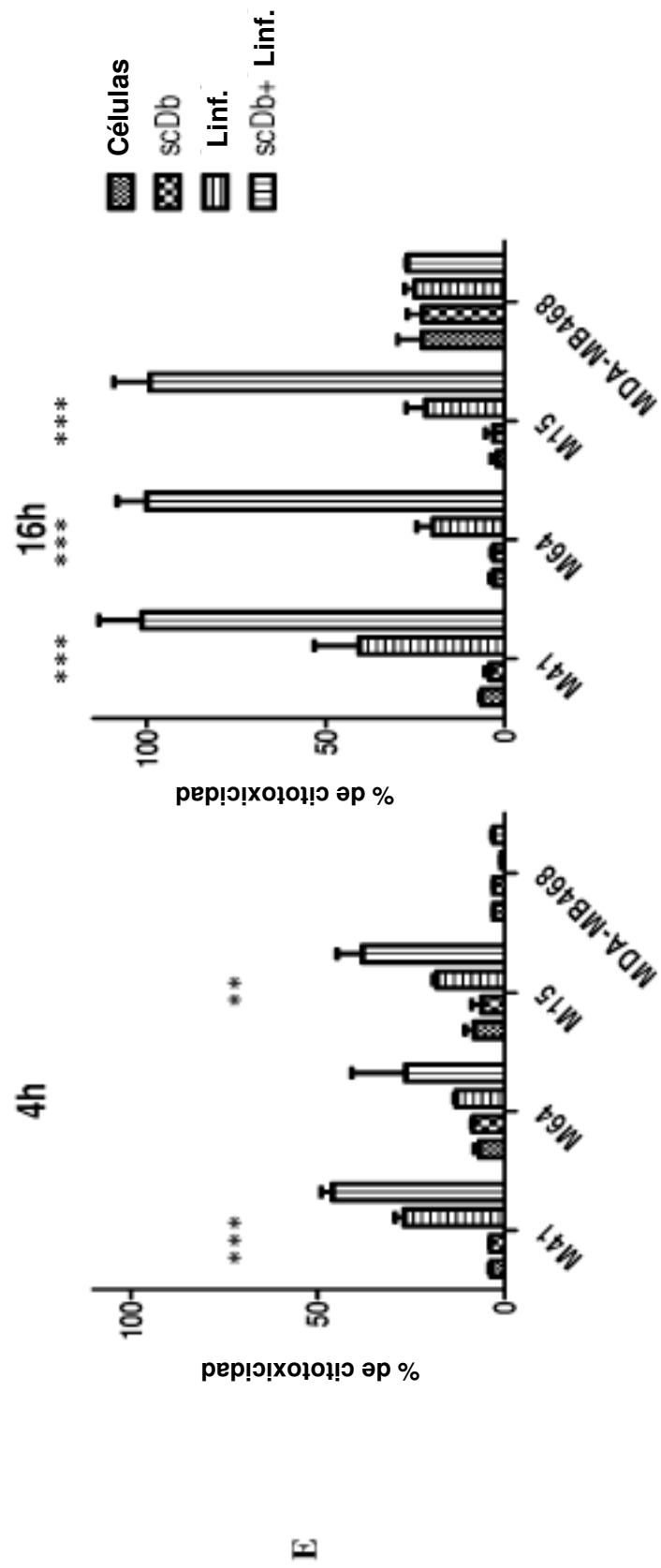


FIGURA 5

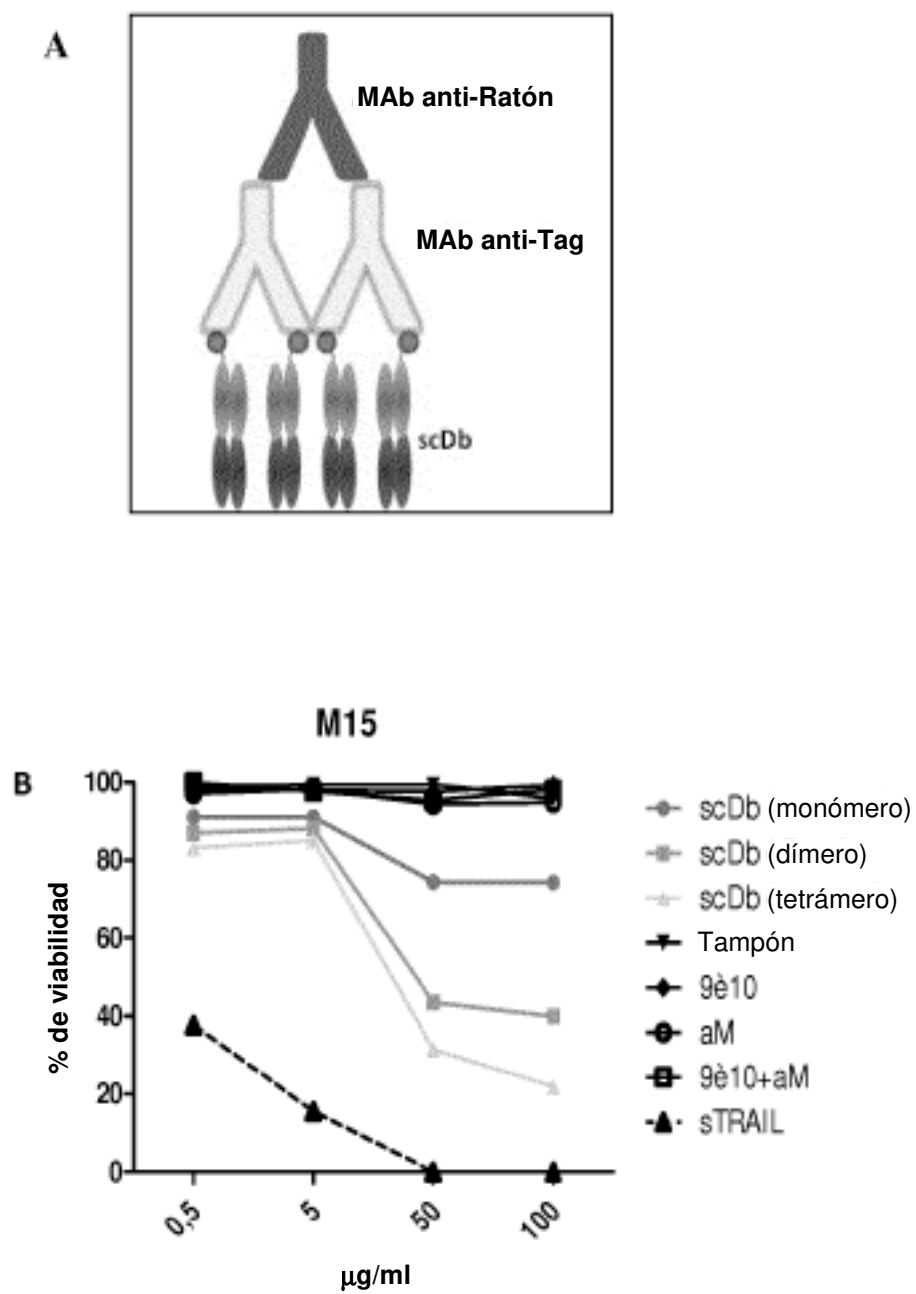


FIGURA 5

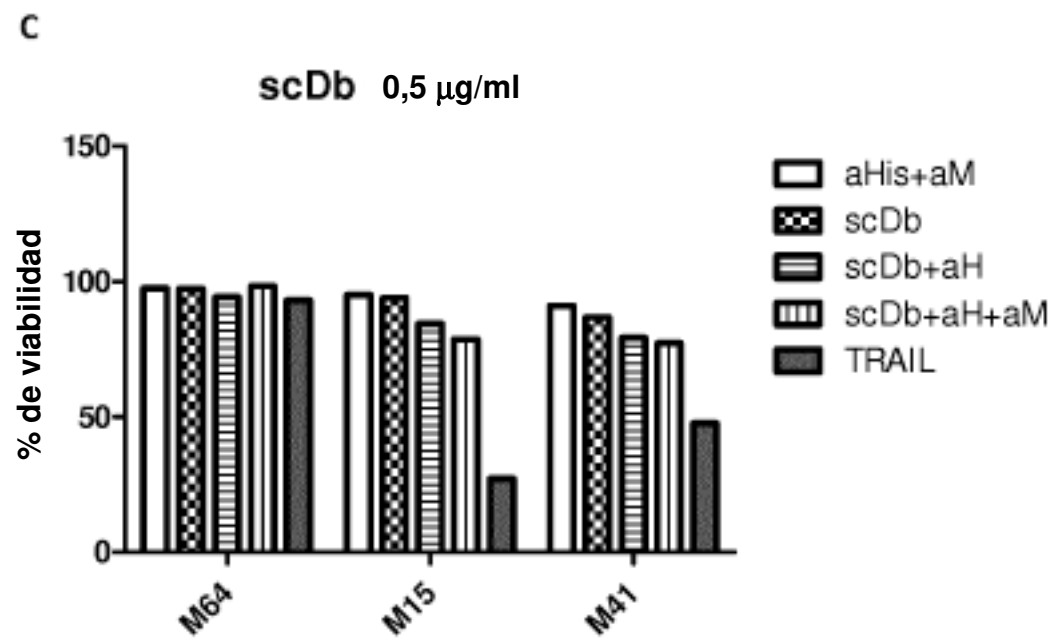


FIGURA 5

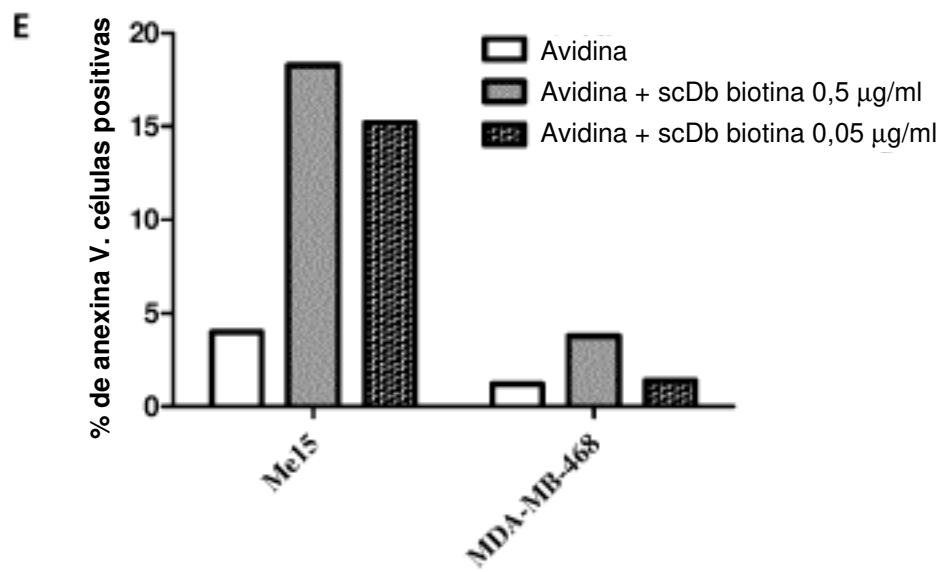
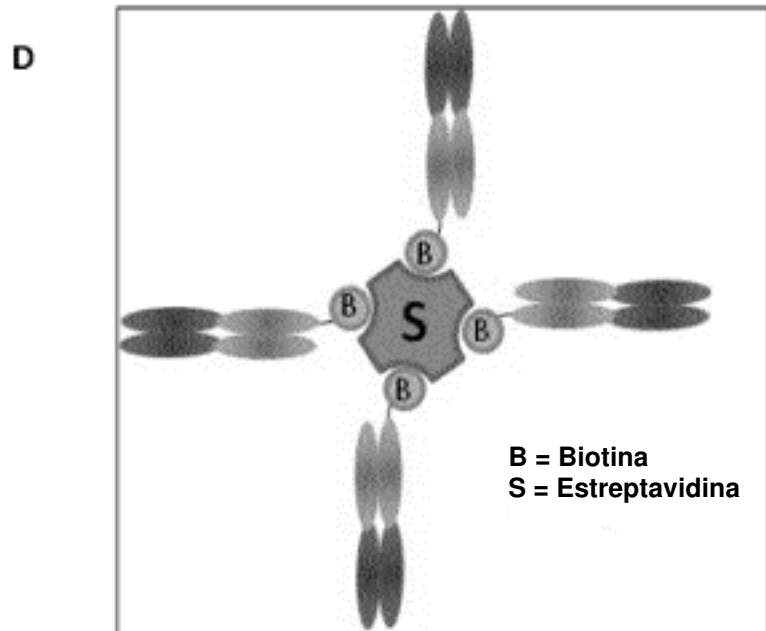


FIGURA 6

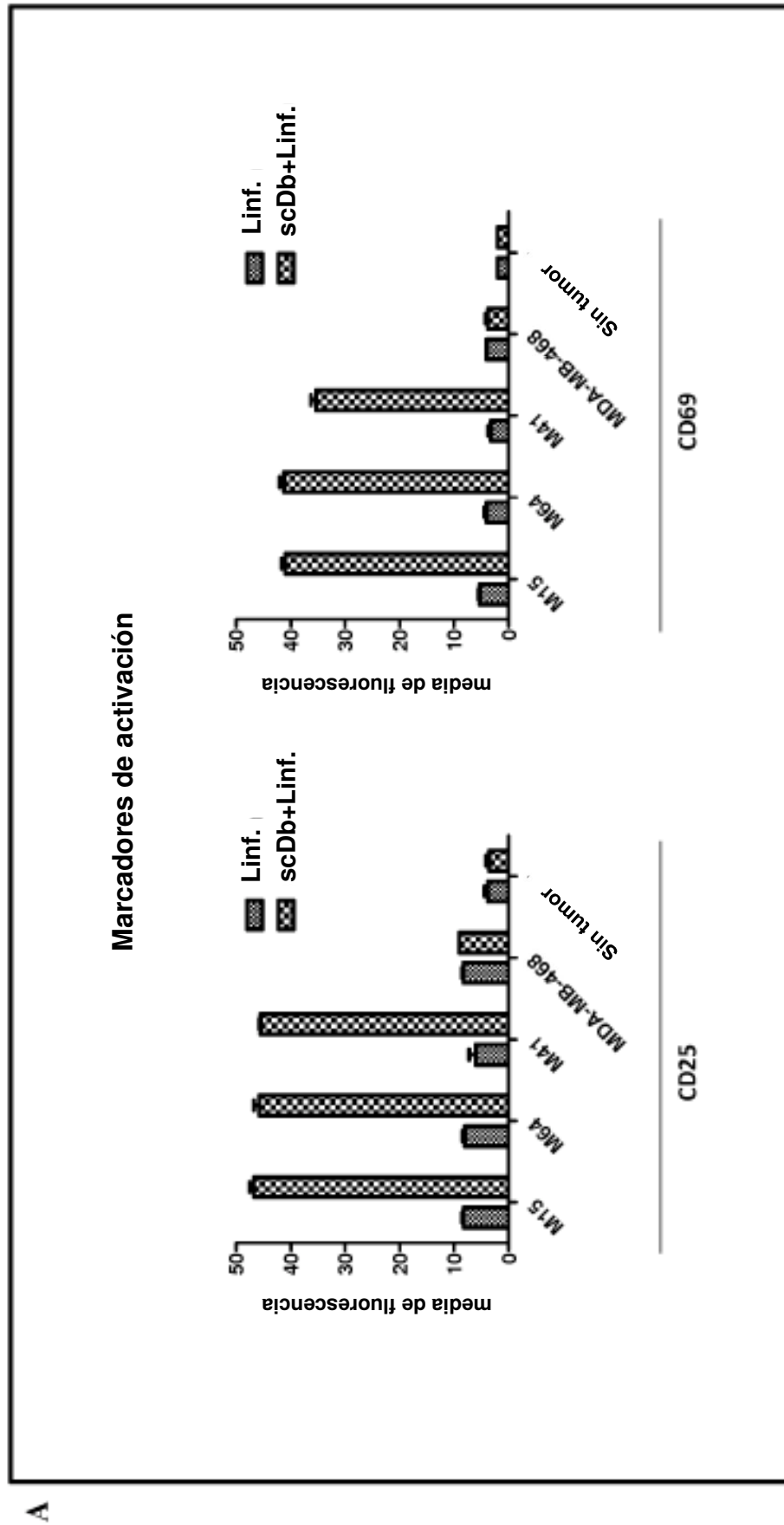


FIGURA 6

B

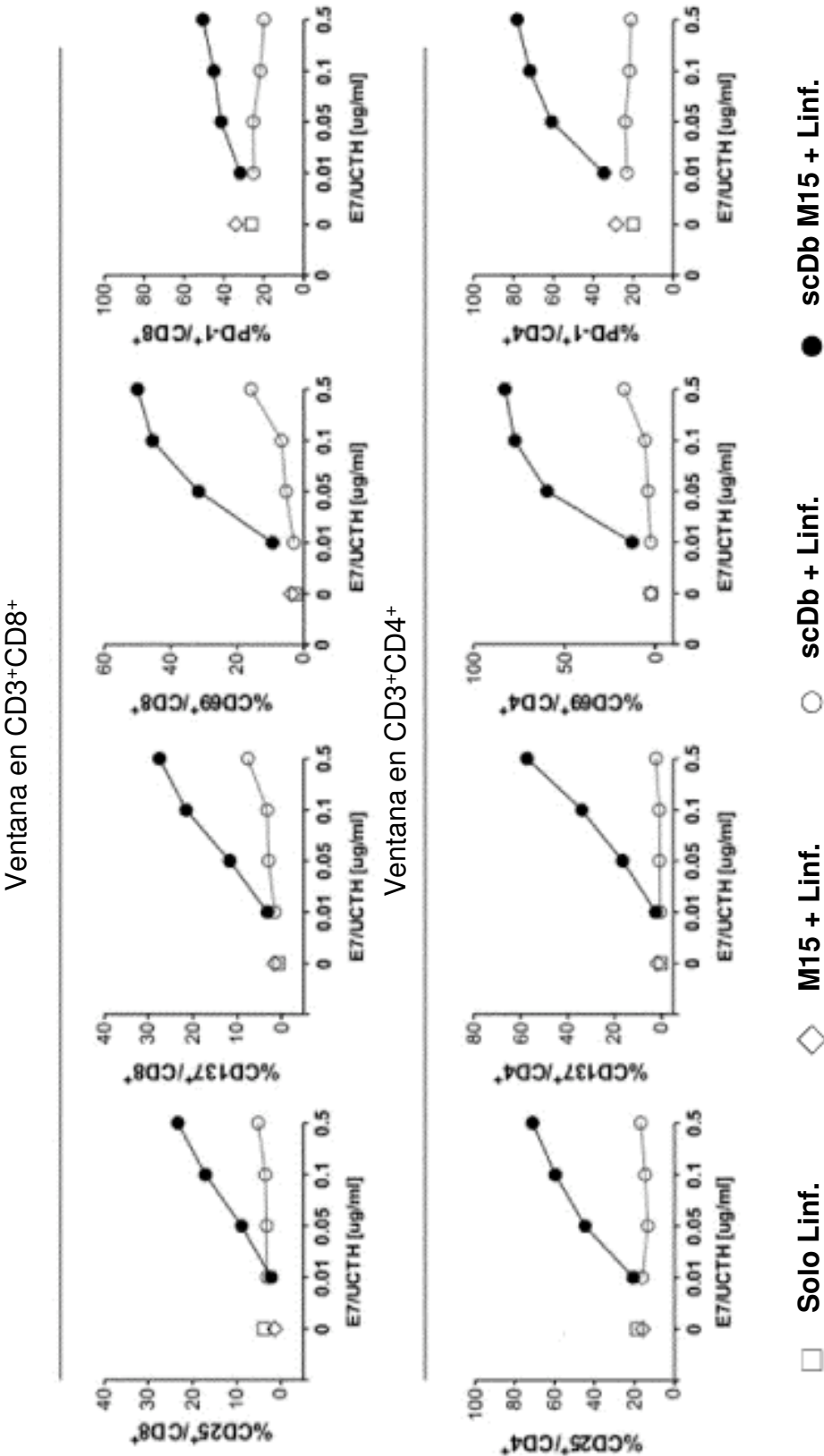


FIGURA 7

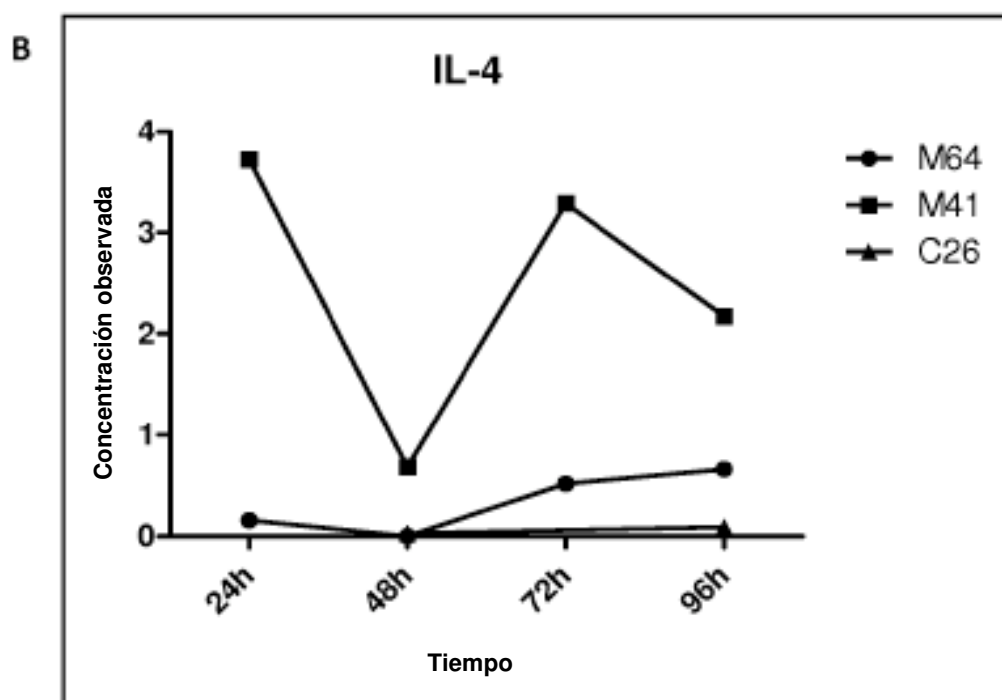
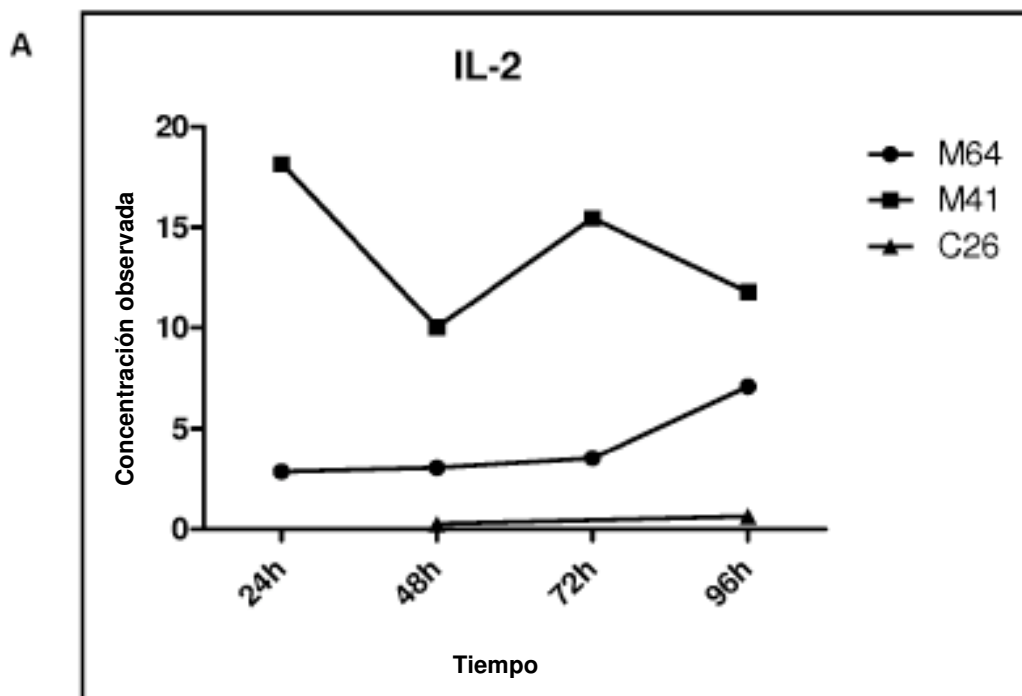


FIGURA 7

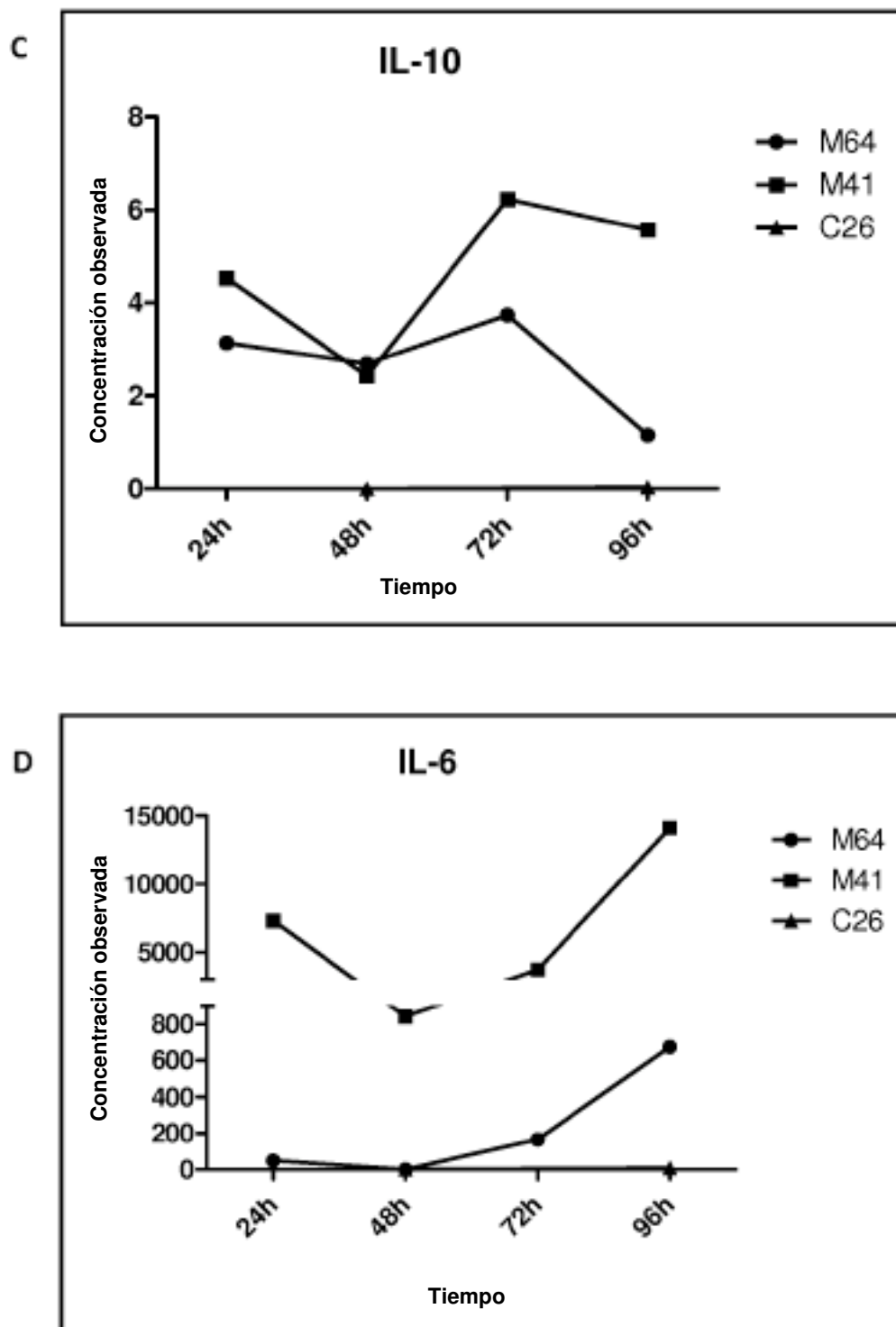


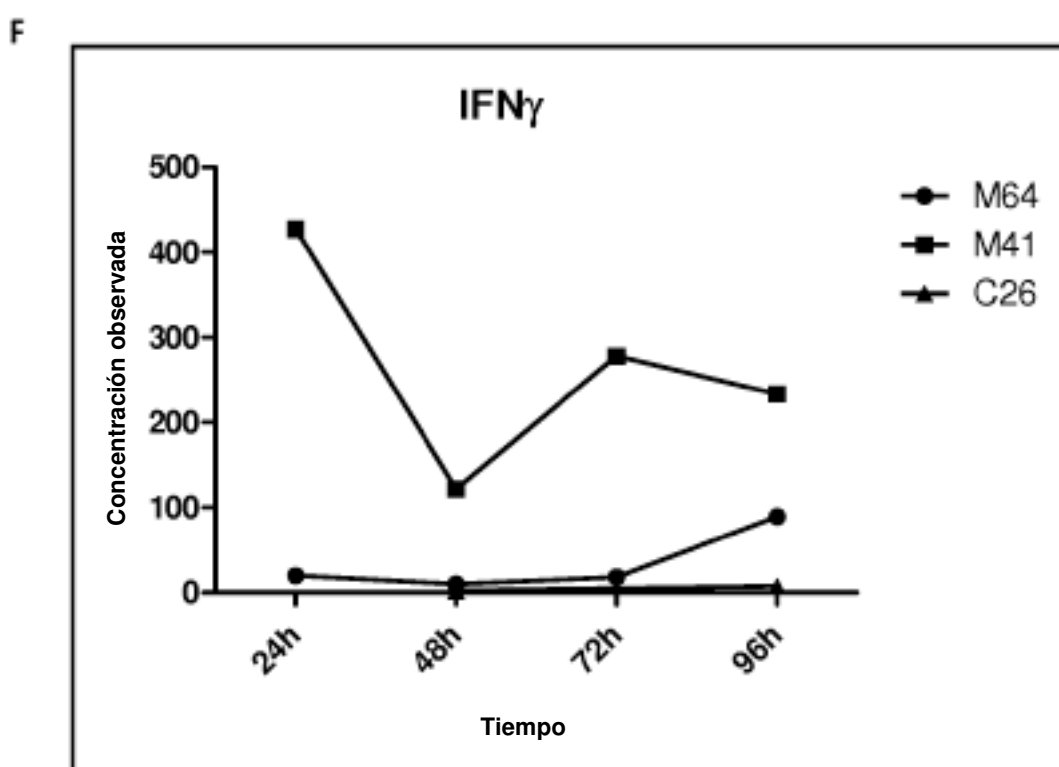
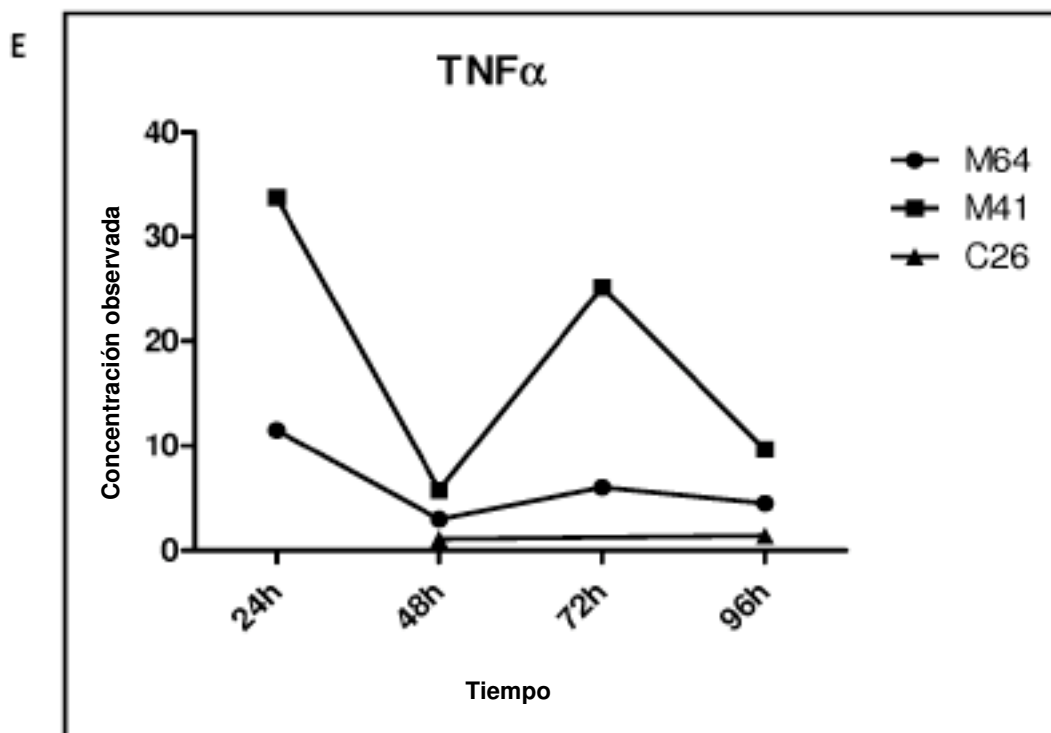
FIGURA 7

FIGURA 7

