

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 532 381**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)

**C07K 16/30** (2006.01)

**C07K 16/46** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.07.2008 E 08773968 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.12.2014 EP 2185595**

54 Título: **Derivados de anticuerpos recombinantes, de cadena sencilla, trivalentes triespecíficos o biespecíficos**

30 Prioridad:

**10.07.2007 EP 07013510**

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

**26.03.2015**

73 Titular/es:

**FRIEDRICH-ALEXANDER-UNIVERSITÄT  
ERLANGEN-NÜRNBERG (100.0%)  
SCHLOSSPLATZ 4  
91054 ERLANGEN, DE**

72 Inventor/es:

**KELLNER, CHRISTIAN;  
SINGER, HEIKO;  
FEY, GEORG, H. y  
BRÜNKE, JÖRG**

74 Agente/Representante:

**ILLESCAS TABOADA, Manuel**

ES 2 532 381 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).

Derivados de anticuerpos recombinantes, de cadena sencilla, trivalentes trispecíficos o biespecíficos

## DESCRIPCIÓN

5

La presente invención se refiere una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido como se caracteriza en las reivindicaciones adjuntas. La presente invención se refiere además a un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de la invención, un huésped no humano transformado con el vector de la invención, un procedimiento para producir un polipéptido que comprende cultivar la célula hospedadora de la invención en condiciones adecuadas y aislar el polipéptido producido y un polipéptido codificado por la molécula de ácido nucleico de la invención o producido por el procedimiento de la invención. Además, la presente invención se refiere a composiciones para diagnóstico y farmacéuticas y procedimientos para tratar tumores.

10

15

En la presente memoria descriptiva, se citan varios documentos. El contenido de la divulgación de estos documentos incluyendo los manuales de los fabricantes se incorpora en su totalidad por referencia.

20

Las leucemias son cánceres de la sangre o de la médula ósea y se caracterizan por una proliferación anómala de células sanguíneas, habitualmente leucocitos. La leucemia se divide clínica y patológicamente en sus formas aguda y crónica. La *leucemia aguda* se caracteriza por la proliferación rápida de células sanguíneas inmaduras. Este alto número de células inmaduras hace a la médula ósea incapaz de producir células sanguíneas sanas. Las formas agudas de leucemia pueden producirse en niños y jóvenes adultos. Se requiere tratamiento inmediato en leucemias agudas debido a la rápida progresión y acumulación de las células malignas, que después se vierten al torrente sanguíneo y se propagan a otros órganos del cuerpo. La *leucemia crónica* se distingue por la acumulación excesiva de células sanguíneas relativamente maduras, pero aún anómalas. Típicamente tarda de meses a años en progresar, las células se producen a una velocidad mucho mayor que las células normales, dando como resultado muchos glóbulos blancos anómalos en la sangre. La leucemia crónica se produce principalmente en personas mayores, pero puede teóricamente producirse en cualquier grupo de edad. Mientras que la leucemia aguda debe tratarse inmediatamente, las formas crónicas se controlan en ocasiones durante algún tiempo antes del tratamiento para asegurar la eficacia máxima de la terapia. Las enfermedades se clasifican además de acuerdo con el tipo de célula anómala que se halle mayoritariamente en la sangre (células linfoides frente a células mieloides) dando como resultado cuatro categorías principales de leucemia: leucemia linfocítica aguda (también conocida como Leucemia Linfoblástica Aguda, o ALL), Leucemia Linfocítica Crónica (CLL), Leucemia Mielógena Aguda (también conocida como Leucemia Mielocítica Aguda o AML) y Leucemia Mielógena Crónica (CML).

25

30

35

La terapia aplicada habitualmente de enfermedades cancerosas que se originan en el sistema hematopoyético incluye irradiación y/o quimioterapia. Además, en ciertas circunstancias, la posibilidad adicional de trasplante de médula ósea se considera adecuada. Sin embargo, estas terapias son más o menos tóxicas para el paciente y la mayoría de las veces, no conducen a la cura completa de la enfermedad. Recientemente, una inmunoterapia basada en anticuerpos monoclonales ha entrado en la fase clínica y se ha demostrado ya que es eficaz. Ejemplos prominentes son el Rituximab (anti-CD20) para el tratamiento de ciertos linfomas no-Hodgkin de linfocitos B (NHL) y Campath 1H (anti-CD52) en el tratamiento de ciertas leucemias linfáticas crónicas (Reff *et al.*, 1994; Onrust *et al.*, 1999; Riechmann *et al.*, 1988; Hale *et al.*, 1988). También se ha demostrado que este enfoque es exitoso en enfermedades tales como diferentes tipos de hemoblastosis y también en tumores sólidos. Otros anticuerpos están en un estado clínico avanzado, por ejemplo Epratuzumab (anti-CD22) para NHL (Carnahan *et al.*, 2003; Leonard *et al.*, 2003).

40

45

Una alternativa a esos anticuerpos son anticuerpos unidos a isótopos radiactivos. Son ejemplos de estos anticuerpos BEXXAR (anti CD20-I131) y ZEVALIN (anti CD20-Y90) (Kaminski *et al.*, 1993; Davis *et al.*, 2007; Cheung *et al.*; 2006). En lugar de radioisótopos, pueden usarse otras sustancias tales como toxinas, tal como se realiza para la inmunotoxina Mylotarg (anti CD33 acoplado con la toxina caliqueamicina; Hamann *et al.*, 2002; Sievers *et al.*, 1999).

50

La ventaja general de los anticuerpos en el tratamiento de enfermedades cancerosas es su mayor especificidad por células cancerosas en comparación con células sanas. En particular en el caso de enfermedades hematológicas, las células tumorales son fácilmente accesibles debido a su presencia en la sangre, médula ósea o tejidos menos compactos.

55

Los inconvenientes importantes de los anticuerpos en el uso anterior son su tamaño que limita su accesibilidad a ciertos tejidos o su capacidad para penetrar en tumores. Además, las interacciones con receptores de Fc de células no citotóxicas (por ejemplo linfocitos B o plaquetas) o con receptores inhibidores tales como FcγRIIIb alteran su efecto terapéutico (Peipp y Valerius, 2002; Clynes *et al.*, 2000). Además, los polimorfismos bi-alélicos pueden reducir la sensibilidad a una terapia de anticuerpo, lo que se demostró, por ejemplo, para Rituximab (Cartron *et al.*, 2002; Weng y Levy, 2003).

60

Aunque la relevancia clínica de la citotoxicidad dependiente del complemento aún sigue sin estar clara (Weng y Levy 2001), el reclutamiento de células efectoras inmunitarias y la inducción de ADCC por implicación de receptores de Fc (FcR) desempeña un papel importante *in vitro* e *in vivo*, como se ha demostrado para Rituximab (Cartron, *et al.* 2002, Weng y Levy 2003). Por lo tanto, la potenciación de la actividad ADCC puede representar un enfoque prometedor para mejorar la terapia basada en anticuerpos (Ab). En consecuencia, se han usado varios enfoques diferentes para potenciar las funciones mediadas por células efectoras de diferentes anticuerpos monoclonales

65

(mAb), por ejemplo, mejora de la unión de la parte Fc con los FcR por glico-ingeniería o mediante introducción de sustituciones de aminoácidos (Barbin, *et al* 2006, Lazar, *et al* 2006).

Se ha conseguido una mejora significativa adicional de las funciones efectoras mediante la generación de anticuerpos biespecíficos (bsAb), que en algunos casos produjeron citotoxicidad *in vitro* aún más fuerte que los mAb parentales (Weiner, *et al* 1993) y fueron capaces de superar algunas de las limitaciones de los anticuerpos convencionales (Peipp y Valerius, 2002). Dos sitios de unión, uno para un antígeno expresado en células tumorales y otro para una molécula desencadenante en la superficie de células efectoras inmunes (por ejemplo células T, células NK, monocitos, macrófagos o granulocitos) conducen al reclutamiento eficaz de estas células efectoras a las células tumorales y a destrucción específica de las células tumorales mediante citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) o fagocitosis. Típicamente, la lisis de células tumorales se induce por unión del anticuerpo con moléculas desencadenantes citotóxicas tales como CD2, CD28 o CD3 (expresadas en células T), CD16 (Fc $\gamma$ RIIIa, expresada en células NK), CD64 (Fc $\gamma$ RI; expresada en neutrófilos activados y monocitos/macrófagos) o CD89 (Fc $\alpha$ RI, expresada en neutrófilos; Peipp y Valerius, 2002). Se sabe que los células NK están entre los primeros en regenerarse después de trasplantes con células madre, lo que los hace particularmente adecuados para eliminar las células de la enfermedad mínima residual (MRD) (Eyrich *et al.*, 2001; Lang *et al.*, 2003).

En comparación con técnicas utilizadas previamente, la disponibilidad de anticuerpos recombinantes facilita en gran medida la producción y purificación de anticuerpos biespecíficos. Son conocidos habitualmente formatos de anticuerpos tales como los diacuerpos, minicuerpos, diacuerpos de cadena sencilla o fragmentos variables de cadena sencilla biespecíficos en tándem (bsscFv) (Peipp y Valerius, 2002), de los cuales los dos últimos consisten en solamente una molécula.

El antígeno o los antígenos elegido(s) para unirse con el derivado de anticuerpo terapéutico es/son cruciales para la terapia. Se han descrito anteriormente anticuerpos que se unen a CD19 expresado en linfocitos B en el tratamiento de neoplasias linfoides B (Grossbard *et al.*, 1992). CD19 se expresa en linfocitos B en todos los estadios de su desarrollo excepto para la célula plasmática madura. Hasta ahora, este antígeno no se ha encontrado en células madre hematopoyéticas u otras células más allá del compartimento linfoide B. Los formatos usados hasta la fecha comprendían anticuerpos completos, inmunoconjugados, inmunoliposomas, inmunotoxinas y formatos biespecíficos. El tratamiento de seis pacientes con un anticuerpo murino CD19 IgG2A condujo a la remisión parcial en un paciente (Hekmann *et al.*, 1991). Un anticuerpo de CD19 quimérico modificado por ingeniería genética con glicol fue capaz de mediar en la ADCC mediante células NK (Barbin *et al*, 2006), un anticuerpo CD19 quimérico adicional desaceleró el crecimiento de un tumor positivo para CD19 en un modelo de ratón SCID (Pietersz *et al.*, 1995). Se desarrollaron derivados de anticuerpo anti-CD19 acoplados con el inhibidor de la tirosina quinasa genisteína así como con radioisótopos, citotoxinas o exotoxinas que mostraron todos una mejora de la enfermedad cancerosa (Messinger *et al.*, 1998; Vervoordeldonk *et al.*, 1994; Vallera *et al.*, 2004; Schwemmlin *et al.*, 2007). Anticuerpos biespecíficos conocidos son, por ejemplo, los dirigidos contra CD19 y CD64 usando macrófagos estimulados por interferón como células efectoras (Ely *et al.*, 1996). Los derivados de anticuerpos dirigidos contra CD19 y CD3 (Haagen *et al.*, 1992; Weiner y de Gast, 1995; Kiprianov *et al.*, 1998; Loffler *et al.*, 2000) así como CD19 y CD16 (Kiprianov *et al.*, 2002) activan células T citotóxicas o células NK, respectivamente. Aunque los datos de cultivo celular demostraron actividad lítica significativa para los derivados de anticuerpos biespecíficos [CD19xCD3], el entrecruzamiento de CD3 mediado por el anticuerpo condujo a activación de células T no específica, provocando una toxicidad en la célula asociada con el anticuerpo (Segal *et al.*, 1999). Se han producido derivados de anticuerpos [CD19xCD16] como una molécula Fv de cadena simple, como un diacuerpo bicatenario y como un diacuerpo tetravalente y se ha demostrado que son eficaces en un modelo de ratón de linfoma humano (documento EP 1314741; Affimed Therapeutics AG). CD16 es el receptor de baja afinidad por IgG (Fc $\gamma$ RIII), que se expresa de forma constitutiva como una isoforma transmembrana en la superficie de células NK y macrófagos (CD16a), y como una molécula anclada a glicosil fosfatidil inositol (GPI) en la superficie de neutrófilos (CD16b) (Ravetch y Kinetic, 1991; van de Winkel y Anderson, 1991). Para la señalización intracelular, CD16a requiere la asociación con la cadena Fc $\gamma$ R que contiene el motivo de activación basado en tirosina de inmunorreceptor (ITAM), el cual desencadena la señalización corriente abajo. Los estudios con anticuerpos biespecíficos acoplados de forma convencional que redirigen células NK mediante CD16 han demostrado citólisis potente de células malignas en cultivo y en modelos animales (García de Palazzo *et al*, 1992; Hombach *et al*, 1993; Kiprianov *et al*, 2002). Por lo tanto, se iniciaron ensayos clínicos con anticuerpos biespecíficos dirigidos a CD16 (Weiner *et al*, 1995; Hartmann *et al*, 1997). Sin embargo, la inmunogenicidad de anticuerpos de hibridomas-híbridos, así como los efectos secundarios no deseados provocados por la presencia de dominios Fc, y dificultades en la producción de suficientes cantidades de material de uso clínico han limitado estos ensayos clínicos. Otro anticuerpo biespecífico anti[CD19xCD16] utiliza dos Fv de cadena sencilla combinados en una cadena polipeptídica (Bruenke *et al.*, 2005).

La eficacia de los anticuerpos depende de su estabilidad en el suero humano, su localización en el organismo y su afinidad. Se han desarrollado varios medios para influir en estas propiedades. Por ejemplo, un enlace disulfuro entre los dos dominios variables de un anticuerpo scFv puede mejorar en gran medida la estabilidad en suero, pero con mucha frecuencia da como resultado expresión insoluble de la proteína recombinante o conduce a una reducción de la afinidad. Medidas adicionales aplicables para la mejora de las propiedades farmacocinéticas son acoplar el derivado del anticuerpo con polietilenglicol (PEG), componentes que se unan con albúmina de suero humano (HSA), con la HSA en sí misma o con péptidos que proporcionen sitios de N-glicosilación al derivado del anticuerpo (Kubetzko *et al*, 2006; Huhlov & Chester, 2004; Muller *et al*, 2007; Schoonjans *et al*, 2000; Stork *et al*, 2008).

- Finalmente, la afinidad con las células tumorales diana podría potenciarse desarrollando derivados de anticuerpo multivalentes. Los formatos publicados comprenden minicuerpos, triacuerpos, diacuerpos tetravalentes o triacuerpos trivalentes, que están equipados con una o más especificidades. Su tamaño reducido permite la penetración en el tumor así como un tiempo de retención mayor en el organismo, ya que su peso molecular queda aún por encima de la barrera de exclusión de los riñones. Una desventaja restante de las moléculas que comprenden más de dos sitios de unión a antígeno, es que todavía consisten en al menos dos cadenas polipeptídicas, ya que hasta ahora no se ha descrito que pueda obtenerse una molécula de cadena sencilla con más de dos especificidades que sea aplicable como producto terapéutico. Si un derivado de anticuerpo consiste en más de una cadena polipeptídica es más difícil producirlo y purificarlo para obtener una mezcla homogénea.
- Finalmente, la afinidad similar de derivados de un anticuerpo con el mismo número de sitios de unión específicos, tanto para células tumorales como para células efectoras, con frecuencia conduce a la activación de estas últimas sin ser reclutadas a un tumor u otra célula antes, lo que conduce a un potencial citotóxico reducido de la célula efectora.
- La presente invención proporciona nuevos y ventajosos derivados de anticuerpo adecuados como productos terapéuticos en enfermedades hematológicas, que tienen una mayor afinidad por las células tumorales que por las células efectoras, desplazando de este modo la afección hacia las células tumorales, siendo más estables y mostrando un tiempo de retención en plasma prolongado *in vivo*.
- En consecuencia, la presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido tal y como se caracteriza en las reivindicaciones adjuntas, en el que el polipéptido consiste en (a) un primer dominio de inmunoglobulina que consiste en un dominio  $V_L$  unido a un dominio  $V_H$ , en el que el dominio de inmunoglobulina se une específicamente a un antígeno expresado en células tumorales; (b) un segundo dominio de inmunoglobulina que consiste en un dominio  $V_L$  unido a un dominio  $V_H$ , en el que el dominio de inmunoglobulina se une específicamente a un antígeno expresado en células tumorales; y (c) un tercer dominio de inmunoglobulina que consiste en un dominio  $V_L$  unido a un dominio  $V_H$ , en el que el dominio de inmunoglobulina se une específicamente a un antígeno de células efectoras, en el que la célula efectora se selecciona del grupo que consiste en células NK, células T, granulocitos neutrófilos, monocitos y macrófagos; en el que al menos uno de los antígenos expresado en células tumorales y al que se une el dominio de inmunoglobulina de (a) o (b), es un antígeno expresado en células madre tumorales o en células precursoras o progenitoras tumorales; y (d) opcionalmente, al menos un (poli)péptido no relacionado con dominios de inmunoglobulina; y en el que la molécula de ácido nucleico codifica al menos un enlazador que separa al menos un dominio  $V_H$  de un dominio  $V_L$  o al menos un dominio  $V_L$  de uno  $V_H$ .
- De acuerdo con la presente invención la expresión "molécula de ácido nucleico" define una cadena molecular lineal que consiste en más de 30 nucleótidos. El grupo de moléculas designado en el presente documento como "moléculas de ácido nucleico" también comprende genes completos.
- Las "moléculas de ácido nucleico", de acuerdo con la presente invención, incluyen ADN, tal como ADNc o ADN genómico y ARN. Se incluyen además moléculas miméticas de ácidos nucleicos conocidas en el estado del arte como derivados sintéticos o semisintéticos de ADN o ARN y polímeros mixtos. Dichas moléculas miméticas de ácido nucleico o derivados de ácido nucleico de acuerdo con la invención, incluyen ácido nucleico fosforotioato, ácido nucleico fosforamidato, ácido ribonucleico 2'-O-metoxietil, ácido nucleico morfolino, ácido nucleico hexitol (HNA), y ácido nucleico bloqueado (LNA) (véase Braasch y Corey, Chem Biol 2001, 8: 1). El LNA es un derivado del ARN en el que el anillo de ribosa está limitado a un enlace de metileno entre el oxígeno 2' y el carbono 4'. Pueden contener adicionalmente bases nucleotídicas derivadas o no naturales, como se apreciará fácilmente por los expertos en la materia.
- La presente invención contempla además moléculas de ácido nucleico complementarias a la molécula de ácido nucleico anteriormente definida, así como moléculas de ácido nucleico que hibridan con la misma en condiciones rigurosas.
- Se conoce bien en la técnica cómo realizar experimentos de hibridación con moléculas de ácido nucleico. De forma correspondiente, la persona experta en la materia conoce qué condiciones de hibridación tiene que usar para permitir una hibridación exitosa. El establecimiento de condiciones de hibridación adecuadas se indica en libros de texto convencionales tales como Sambrook, Russell "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (2001); Ausubel, "Current Protocols in Molecular Biology", Green Publishing Associates y Wiley Interscience, N.Y. (1989), o Higgins y Hames (Eds.) "Nucleic acid hybridization, a practical approach" IRL Press Oxford, Washington DC, (1985).
- Las "condiciones rigurosas" se refieren a condiciones de hibridación en la que los polinucleótidos que son capaces de hibridar con los polinucleótidos de la invención o partes de los mismos, hibridan con estas secuencias diana en un grado detectablemente mayor que con otras secuencias (por ejemplo, al menos 2 veces sobre el fondo). Las condiciones rigurosas son dependientes de secuencia y serán distintas en diferentes circunstancias. Controlando la rigurosidad de la hibridación y/o condiciones de lavado, pueden identificarse secuencias dianas que tienen al menos 90% de identidad de secuencia, más preferentemente 95%, tal como 98% y más preferentemente 100% de identidad de secuencia con la sonda (condiciones de hibridación altamente rigurosas). Como alternativa, las condiciones de rigurosidad pueden ajustarse para permitir un mayor grado de desapareamiento en las secuencias (condiciones de hibridación de rigurosidad baja). Dichas condiciones altamente rigurosas y poco rigurosas para

hibridación se conocen bien por los expertos en la materia. Por ejemplo las “condiciones rigurosas” se refieren a condiciones de hibridación que comprenden, por ejemplo, una incubación durante una noche a 65°C en SSC 4x (NaCl 600 mM, citrato sódico 60 mM) seguido de un lavado a 65°C en SSC 1x durante una hora. Como alternativa, las condiciones de hibridación pueden comprender: una incubación durante una noche a 42°C en una solución que comprende formamida al 50%, SSC 5x (NaCl 750 mM, citrato sódico 75 mM), fosfato sódico 50 mM (pH 7,6) solución de Denhardt 5x, dextran sulfato 10% y ADN de esperma de salmón fragmentado y desnaturalizado 20 µg/ml, seguido de un lavado, por ejemplo, en SSC 0,1-0,5x a aproximadamente 55-65°C durante aproximadamente de 5 a 20 min. Dichas condiciones de hibridación también se conocen por los expertos en la materia como “condiciones altamente rigurosas para hibridación”.

También se contemplan moléculas de ácido nucleico que hibridan con los polinucleótidos de la invención en condiciones de hibridación de menor rigurosidad (“condiciones para hibridación de baja rigurosidad”). Los cambios en la rigurosidad de la hibridación se consiguen principalmente mediante la manipulación de la concentración de formamida (menores porcentajes de formamida dan como resultado rigurosidad reducida), condiciones salinas o temperatura. Por ejemplo, las condiciones de menor rigurosidad incluyen una incubación durante una noche a 50°C en SSC 4x o una incubación durante una noche a 37°C en una solución que comprende SSPE 6x (SSPE 20x = NaCl 3 M; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2 M; EDTA 0,02 M, pH 7,4), SDS al 0,5 %, formamida al 30%, ADN de esperma de salmón 100 mg/ml de bloqueo; seguido de lavados a 50°C con SSPE 1x, SDS 0,1%. Además, para conseguir una rigurosidad aún menor, después de la hibridación rigurosa pueden hacerse lavados a concentraciones salinas mayores (por ejemplo SSC 5x). Debe observarse que pueden conseguirse variaciones en las condiciones anteriores mediante la inclusión y/o sustitución de reactivos de bloqueo alternativos. Los reactivos de bloqueo típicos incluyen reactivos de Denhardt, BLOTTO, heparina, ADN de esperma de salmón desnaturalizado y formulaciones patentadas disponibles en el mercado. La inclusión de reactivos de bloqueo específicos puede requerir la modificación de las condiciones de hibridación descritas anteriormente, debido a problemas con la compatibilidad. Dichas modificaciones pueden efectuarse en general por el experto en la materia sin más. La realización indicada anteriormente en el presente documento se refiere preferentemente a condiciones altamente rigurosas y como alternativa a condiciones de menor rigurosidad. Puede formarse un complejo de hibridación en solución (por ejemplo, análisis Cot o Rot) o entre una secuencia de ácido nucleico presente en solución y otra secuencia ácido nucleico inmovilizada en un soporte sólido (por ejemplo, membranas, filtros, microplacas, puntas o portaobjetos de vidrio a los que, por ejemplo, se han fijado células).

El término “polipéptido” tal como se usa en el presente documento, describe cadenas moleculares lineales de aminoácidos, incluyendo proteínas monocatenarias o sus fragmentos, que contienen más de 30 aminoácidos. En consecuencia, el término “péptido” tal como se usa en la presente invención, describe cadenas lineales de aminoácidos que contienen hasta 30 aminoácidos. Además, también están abarcados por la invención peptidomiméticos de dichas proteínas/polipéptidos en los que el aminoácido o los aminoácidos y/o enlace(s) peptídico(s) se han remplazado por análogos funcionales. Dichos análogos funcionales incluyen todos los aminoácidos conocidos distintos de los 20 aminoácidos codificados por genes, tales como la selenocisteína. Los términos “polipéptido” y “proteína”, que se usan de forma intercambiable, también se refieren a polipéptidos/proteínas modificados de forma natural en los que la modificación se efectúa, por ejemplo, por glicosilación, acetilación, fosforilación y modificaciones similares que se conocen bien en la técnica.

La expresión “dominio de inmunoglobulina que comprende un dominio V<sub>L</sub> ligado a un dominio V<sub>H</sub>” se refiere a dominios variables del fragmento cadena sencilla de inmunoglobulinas (scFv) que han mostrado ser necesarios y suficientes para unirse con su antígeno. Cada uno de los dominios V<sub>H</sub> o V<sub>L</sub> comprende tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR), regiones altamente variables responsables principalmente de la unión del antígeno. Cuando sea aplicable, un dominio V<sub>L</sub> o V<sub>H</sub> puede consistir en al menos una CDR por dominio, preferentemente al menos dos, preferentemente las tres, siempre que el dominio de inmunoglobulina resultante ejerza la función deseada, es decir se una específicamente a su antígeno diana.

La molécula de ácido nucleico de la invención puede codificar dominios de inmunoglobulina derivados de una única especie, pero también moléculas quiméricas o humanizadas.

Con respecto a la disposición del dominio V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> en el dominio de inmunoglobulina, el dominio V<sub>L</sub> puede situarse en la posición N- o C-terminal del dominio V<sub>H</sub>. En consecuencia, en el ácido nucleico de la presente invención, el ácido nucleico que codifica el dominio V<sub>L</sub> puede situarse en posición 5' o 3' del codificado por el dominio V<sub>H</sub>. El experto en la materia puede determinar qué disposición de los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> es más adecuada para un scFv específico.

La expresión “se une específicamente” o “uniéndose específicamente” (que tiene el mismo significado que “interacciona específicamente”) como se usa de acuerdo con la presente invención, significa que el dominio de inmunoglobulina no, o esencialmente no reacciona de forma cruzada con un epítipo con una estructura similar a la del antígeno diana. Puede ensayarse la reactividad cruzada de un panel de los dominios de inmunoglobulina que se investigan, por ejemplo, evaluando la unión de dicho panel de dominios de inmunoglobulina en condiciones convencionales con el epítipo de interés así como con varios epítopos más o menos estrechamente relacionados (estructuralmente y/o funcionalmente). Solamente los dominios de inmunoglobulina que se unen con el epítipo de interés en su contexto relevante (por ejemplo, un motivo específico en la estructura de una proteína) pero no, o esencialmente no, se unen a ninguno de los otros epítopos, se consideran específicos para el epítipo de interés y por lo tanto, son dominios de inmunoglobulina de acuerdo con la presente invención. Se describen procedimientos correspondientes por ejemplo en Harlow y Lane, 1988 y 1999, en el lugar citado.

La expresión “antígeno expresado en células tumorales” se refiere a antígenos expresados en la superficie de células tumorales. Las “células tumorales” de acuerdo con la presente invención, son células transformadas que son características de, o dan lugar a tumores. El término “tumor” de acuerdo con la presente invención, se refiere no solamente a tumores sólidos, sino también a afecciones de tumores no sólidos, tales como, por ejemplo, la leucemia.

Un “antígeno de célula efectora” es un antígeno expresado en la superficie de células efectoras. La expresión “células efectoras” tal como se usa a lo largo de la presente invención, se refiere a leucocitos diferenciados terminalmente que realizan una o más funciones específicas en el sistema inmunitario. Las “células efectoras” de acuerdo con la presente invención son células NK, células T, granulocitos, macrófagos o monocitos. Se prefiere que las células efectoras sean células NK.

El término “células madre” de acuerdo con la presente invención, se refiere a células primarias halladas en todos los organismos multicelulares, que conservan la capacidad de auto-renovarse a través de la división celular mitótica y pueden diferenciarse en una serie diversa de tipos celulares especializados. Las células madre hematopoyéticas (HSC) son un subconjunto pequeño de células de la médula ósea, que representan aproximadamente  $1 : 10^5 - 1 : 10^6$  células, con la capacidad única de generar todos los otros tipos celulares maduros del sistema hematopoyético. Tienen la capacidad característica definitoria de dividirse tanto de manera simétrica como asimétrica, y generar células comprometidas con el linaje. Las HSCs se dividen en pocas ocasiones pero tienen una alta capacidad de autorrenovación. Las células de la progenie comprometidas con el linaje son “células progenitoras” y “células precursoras”, que proliferan de forma más activa (Spangrude *et al.*, 1988; Bryder *et al.*, 2006). La expresión “célula precursora o progenitora” se refiere a células inmaduras o indiferenciadas, típicamente halladas en animales postnatales. La expresión “células precursoras o progenitoras tumorales” de acuerdo con la presente invención, se refiere a células con propiedades alteradas, por ejemplo, respecto a su comportamiento de proliferación o su patrón de expresión génica, que dan lugar a células tumorales. Son ejemplos de dichas células precursoras o progenitoras tumorales, por ejemplo, las células precursoras o progenitoras leucémicas. Las células progenitoras comparten muchas características comunes con las células madre. Como las células madre, las células progenitoras tienen una capacidad de autorrenovación y diferenciación, aunque estas propiedades pueden ser limitadas en comparación con las de las células madre. Las células progenitoras o precursoras pueden verse como progenie intermedia de las células madre todavía capaces de proliferar.

La relación de dominios de inmunoglobulina que se unen a antígenos expresados en células tumorales y los que se unen a antígenos de células efectoras es un elemento esencial de la presente invención. Como se ha analizado anteriormente, los derivados de anticuerpos previamente conocidos comprenden derivados bi- o trispecíficos de inmunoglobulinas multicaténarias o derivados biespecíficos de Fv de cadena sencilla. Hasta donde alcanza el conocimiento del solicitante, no se ha publicado hasta la fecha la optimización de la relación de los sitios de unión para antígenos tumorales y antígenos de células efectoras y su efecto en la calidad de la respuesta inmune frente a las células tumorales. La presente invención desvela por primera vez una relación de dominios de inmunoglobulina de 2:1 que se unen a antígenos de células tumorales y a antígenos de células efectoras. La mayor fracción de dominios de inmunoglobulina que se unen a antígenos expresados en células tumorales tiene el efecto de incrementar la afinidad por las células tumorales. Por lo tanto, el mayor número de restos de unión a antígeno dirigidos a antígeno expresado en células tumorales aumenta la probabilidad de que el polipéptido de la invención se una con una célula tumoral antes de que se una con una célula efectora. El reclutamiento de células tumorales antes que las células efectoras es ventajoso por la siguiente razón: hasta ahora, en un contexto terapéutico, las respuestas inmunes se inducen tras la unión de una inmunoglobulina con una o dos especificidades, o de una molécula natural desencadenante, con un antígeno respectivo expresado en la superficie de las células efectoras que median en una respuesta inmune. Por lo tanto, las células efectoras no pueden distinguir si una molécula de anticuerpo está unida a una célula tumoral o no conduce a una respuesta inmune inespecífica en el caso de que el derivado del anticuerpo no esté unido a una célula tumoral. Por el contrario, la relación 2:1 de sitios de unión a antígeno específicos para antígenos tumorales y los específicos para células efectoras potencia la probabilidad de que el derivado del anticuerpo de la presente invención se una con una célula tumoral antes de que se una con un antígeno de una célula efectora. Como consecuencia de la avidéz potenciada para las células tumorales, el tiempo de retención en la superficie celular de las células tumorales se prolonga dando como resultado un potencial de dirección mejorado, como se ha descrito anteriormente. Esto reduce en gran medida la cantidad de respuestas inmunes inespecíficas y puede por lo tanto reducir los efectos secundarios adversos de moléculas previamente conocidas.

Aparte de los efectos descritos anteriormente, la presente invención demuestra por primera vez que un polipéptido de cadena sencilla que comprende tres especificidades de unión a antígeno en el formato de scFv, puede expresarse de forma recombinante y soluble y ejerce los efectos deseados. Como se ha descrito anteriormente, los anticuerpos biespecíficos Fv de cadena sencilla se conocían en el estado anterior de la técnica. Sin embargo, no se creía en general que se pudiera obtener una molécula de cadena sencilla biespecífica, la cual se supone que es estructuralmente compleja, que esté correctamente plegada, sea estable y aún tenga la función deseada, es decir, se una con sus antígenos diana, por lo que la avidéz para antígenos de células tumorales es mayor que la de para los de las células efectoras. Con frecuencia, los scFv que se habían fusionado con otros dominios proteicos, por ejemplo, con otros fragmentos derivados de anticuerpo, tenían una menor afinidad que los scFv solos (Lu *et al.*, 2002; Mc Call *et al.*, 2001; Schwenkert *et al.*, 2008). Por lo tanto estaba anticipado que el scFv central, que interacciona en ambos extremos N- y C-terminal con otra proteína en el formato de un triple cuerpo scFv, tendría

una afinidad o funcionalidad drásticamente alterada.

Una ventaja adicional del formato del polipéptido de la presente invención es que la combinación de tres scFv en un polipéptido reduce la superficie de la molécula. Esto y la falta de dominios constantes de anticuerpos reduce la inmunogenicidad potencial en el caso de anticuerpos derivados de otros organismos distintos del que va a curarse de un tumor.

Además, los derivados del anticuerpo biespecífico en su formato más sencillo, que consiste en dos scFv conectados por un enlazador flexible de aproximadamente 10-20 aminoácidos, tienen una masa molecular relativa (Mr) de solamente 50-60 kDa aproximadamente, y las proteínas con Mr 65 kDa se eliminan rápidamente del torrente sanguíneo por los riñones (Kipriyanov *et al.*, 1999; Huhlov y Chester, 2004). La eliminación rápida de la sangre da como resultado escasa retención en el sitio tumoral (Hu *et al.*, 1996). En consecuencia, el tamaño de las proteínas biespecíficas se ha aumentado por diversas modificaciones, incluyendo PEGilación (Kubetzko *et al.*, 2006), N-glicosilación o la adición de más dominios proteicos (Huhlov y Chester, 2004; Muller *et al.*, 2007; Schoonjans *et al.*, 2000; Stork *et al.*, 2008). Estas modificaciones dieron como resultado tiempos de retención en plasma mejorados y tiempos de retención en cuerpo *in vivo* (Kontermann, 2005) que, sin embargo, no mejoraron las propiedades de unión de la molécula a las células tumorales como podría conseguirse con las moléculas de la presente invención.

En una realización preferida, el dominio de inmunoglobulina de los puntos (a) y (b) se unen con el mismo antígeno expresado en células tumorales. Por ejemplo, ambos dominios de inmunoglobulina pueden unirse con CD7, CD19, CD33, CD13, CD44var, CD123, la molécula tipo lectina de tipo C-1 (CLL-1), CD96, estando esta última presente en células madre de leucemia (LSC) en AML, o Proteoglicano de Condroitín Sulfato asociado a Melanoma (MCSP).

En otra realización preferida, el dominio de inmunoglobulina de los puntos (a) y (b) se une con diferentes antígenos expresados en células tumorales.

En una realización preferida adicional, el al menos un antígeno expresado en células madre tumorales o células precursoras o progenitoras tumorales es CD19, CD33, CD13, CD44var, CD123, CLL-1 o CD96.

En una realización preferida adicional de la presente invención, los antígenos expresados en células tumorales, preferentemente en células madre tumorales o células precursoras o progenitoras tumorales, y con los que se unen los dominios de inmunoglobulina de (a) y (b) son CD19 y CD33, CD19 y CD13, CD19 y CD123, CD19 y CD44var, CD19 y MCSP, CD33 y CD13, CD33 y CD123, CD33 y CD44var, CD33 y CLL-1, CD33 y CD96, CD13 y CD123, CD13 y CD44var, CD13 y CLL-1, CD13 y CD96, CD123 y CD44var, CD123 y CLL-1, CD123 y CD96, CD44var y CD96, o CLL-1 y CD96.

En general, en las células sanas solamente se expresa a la vez un tipo de los antígenos anteriores. Sin embargo, en ciertos tumores, particularmente en ciertas leucemias, pueden expresarse a la vez más de uno de los antígenos específicos anteriores u otros. Son ejemplos prominentes descritos en el estado del arte CD13 y CD19, CD33 y CD19, así como CD19 y MCSP (Proteoglicano de Condroitín Sulfato asociado a Melanoma), que se co-expresan en leucemias de linaje mixto o bi-fenotípico (Greil *et al.*, 1994; Hrusak y Porwit-MacDonald, 2002; Casasnovas *et al.*, 2003; Haagen *et al.*, 1992). El polipéptido codificado por la molécula de ácido nucleico de la presente invención y que tiene una especificidad por dos antígenos diferentes, habitualmente no expresados simultáneamente en células sanas, tiene una afinidad aumentada por las células aberrantes, es decir por células tumorales que expresan simultáneamente dos de los antígenos anteriores. Esto potencia la selectividad de la molécula por las células tumorales.

En otra realización preferida, el antígeno de la célula efectora con el que se une el dominio de inmunoglobulina de (c) es CD16 (Fc $\gamma$ RIIIa) o CD64 (Fc $\gamma$ RI). Son antígenos adicionales adecuados en el contexto de la presente invención CD89, NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46, CD3, CD28 o CD2.

En una realización preferida adicional, al menos un dominio de inmunoglobulina comprende al menos un resto de cisteína capaz de formar enlaces disulfuro intramoleculares.

Se sabe que los enlaces de cisteína intramoleculares estabilizan un fragmento de anticuerpo e influyen positivamente en su estabilidad en suero y/o en algunos casos, en su afinidad de unión al epítopo diana, etc. Se encuentran en general enlaces disulfuro en anticuerpos de origen natural, en los que están presentes en las regiones variables y constantes. Se ha descubierto que muchos anticuerpos scFv tienen una afinidad menor por el antígeno que el homólogo de la Fab lo que se atribuyó al hecho de que el enlazador peptídico del scFv interfiere con la unión (Batra *et al.*, 1992; Pantoliano *et al.*, 1991; Stemmer *et al.*, 1993). Para mejorar el rendimiento de los anticuerpos scFv con diferente cantidad de sitios de unión, se ha intentado introducir cisteínas capaces de formar enlaces disulfuro en posiciones en la molécula en las que no aparecen de forma natural. Deben cumplirse los siguientes prerrequisitos cuando se diseñe un anticuerpo modificado con enlaces de cisteína artificiales. En primer lugar, el enlace disulfuro debe conectar aminoácidos en regiones conservadas estructuralmente de la Fv, es decir, en las regiones V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub>. Además, la distancia entre el dominio V<sub>H</sub> y el V<sub>L</sub> debería ser suficientemente pequeña para permitir la formación de un enlace disulfuro sin la generación de una tensión adversa en la molécula de Fv. Finalmente, el enlace disulfuro debe estar suficientemente distante de las CDR para no interferir con la unión al

antígeno. Como consecuencia, las cisteínas introducidas para formar el enlace disulfuro están en las regiones estructurales conservadas de la Fv que conectan las CDR de las regiones V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> en posiciones que están estructuralmente conservadas en la mayoría de los anticuerpos. Glockshuber *et al.* (1990), Brinkmann *et al.* (1993) y Reiter *et al.* (1994) expusieron estos criterios y establecieron con éxito los primeros anticuerpos con Fv estabilizadas por disulfuro.

Sin embargo, la mayoría de los ensayos realizados para estabilizar anticuerpos que comprenden solamente regiones variables de esta manera, como en scFv, se han encontrado con diversas dificultades, es decir se plantearon con problemas similares durante la expresión de los anticuerpos modificados en comparación con la expresión de anticuerpos completos recombinantes. Por ejemplo, las moléculas resultantes resultaron ser insolubles cuando se expresaron de forma recombinante, lo que probablemente se deba a formación incontrolada del enlace disulfuro y la agregación resultante de la misma. Aparte de esto, los scFv estabilizados con disulfuro también presentaron con frecuencia una afinidad reducida por el antígeno en comparación con sus homólogos no estabilizados con disulfuro. La presente invención podría superar este problema. Aunque se predice que tenga como resultado dificultades similares a las descritas anteriormente por diversos expertos en el campo, los dominios de inmunoglobulina del derivado de anticuerpo de la presente invención podrían estabilizarse por enlaces cisteína intradominio y a la vez sin volver insoluble a la molécula completa. Pueden introducirse mutaciones en la secuencia de aminoácidos del polinucleótido de la invención, por ejemplo, según Reiter *et al.* (1994) en la base de los tripletes en la posición 100 en el dominio V<sub>L</sub> o en la posición 44 en el dominio V<sub>H</sub>, de modo que codifiquen un resto de cisteína. Todas las posiciones son de acuerdo con la numeración de Kabat (Kabat *et al.* 1991). En el contexto de la presente invención, se estabilizan dominios de inmunoglobulina que se unen con ciertos antígenos mutando dos aminoácidos apropiados como se ha descrito anteriormente para cisteínas. Se ha mostrado que la introducción de enlaces disulfuro en dominios de inmunoglobulina de scFv específicos para CD19 y CD16 potencian en gran medida la estabilidad de las moléculas, sin afectar a su especificidad o reducir su afinidad y funcionalidad, lo cual se ha observado por los presentes inventores para otros scFv específicos para MCSP o CD7.

Los medios para introducir mutaciones en una molécula de ácido nucleico son conocidos por un experto en la materia y pueden recuperarse, por ejemplo, de Sambrook, 2001 y Ausubel, 2001.

De acuerdo con la presente invención, la molécula de ácido nucleico de la invención codifica al menos un enlazador que separa al menos un dominio V<sub>H</sub> de uno V<sub>L</sub> o al menos un dominio V<sub>L</sub> de uno V<sub>H</sub>.

El término "enlazador" tal como se usa de acuerdo con la presente invención, se refiere a una secuela de aminoácidos que une los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de un dominio de inmunoglobulina o dos dominios de inmunoglobulina. Por lo tanto, el enlazador puede separar al menos una región V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> que forma un dominio de inmunoglobulina y/o el enlazador puede separar al menos una región V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> de dominios de inmunoglobulina adyacentes.

Los enlazadores concebidos en la presente invención son enlazadores (poli)peptídicos de 1 a 40 aminoácidos de longitud. Preferentemente, los enlazadores son de 5 a 25 aminoácidos de longitud. Aún más preferentemente, los enlazadores son de 10 a 20 aminoácidos de longitud. Los enlazadores que separan los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de un dominio de inmunoglobulina y los que separan los diferentes dominios de inmunoglobulina pueden tener las mismas o diferentes longitudes y pueden comprender la misma secuencia de aminoácidos o una diferente. Preferentemente, los enlazadores tienen la misma longitud y la misma secuencia de aminoácidos.

En otra realización preferida, los enlazadores que separan los dominios de inmunoglobulina difieren en longitud y/o secuencia de aminoácidos de los que separan las regiones V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> dentro de un dominio de inmunoglobulina. Por ejemplo, el primero podría ser más largo y diseñarse para promover la flexibilidad de los dominios de inmunoglobulina entre sí o para facilitar el plegamiento correcto de la molécula y/o potenciar la afinidad de un dominio de inmunoglobulina por su antígeno diana. Además, la naturaleza, es decir, la longitud y/o secuencia de aminoácidos del enlazador podría modificar o potenciar la estabilidad y/o la solubilidad de la molécula.

La longitud y secuencia de un enlazador depende de la composición de los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> que forman un dominio de inmunoglobulina. Por ejemplo, comenzando desde el extremo N-terminal del polipéptido de la invención o desde el extremo 5' de la molécula de ácido nucleico de la invención, si el dominio V<sub>L</sub> está seguido por el dominio V<sub>H</sub>, los enlazadores de 20 aminoácidos que separan las regiones V de un dominio de inmunoglobulina pueden ser óptimos. Por el contrario, si el dominio V<sub>H</sub> está seguido por el dominio V<sub>L</sub>, en enlazador respectivo puede tener una longitud óptima de 15 aminoácidos. Sin desear quedar ligado a una teoría científica, se cree que estas diferencias pueden deberse a razones estéricas que conducen a los enlazadores de diferentes longitudes a promover el plegamiento correcto de los dominios de inmunoglobulina que tienen una disposición diferente de dominios V.

Un experto en la materia es bien consciente de métodos para ensayar la idoneidad de diferentes enlazadores dentro de o entre dominios de inmunoglobulina. Por ejemplo, las propiedades de la molécula pueden ensayarse fácilmente comparando la afinidad de unión del dominio de inmunoglobulina. En el caso de las moléculas trispecíficas de la invención, pueden llevarse a cabo las mediciones respectivas para cada dominio de inmunoglobulina. La estabilidad de la molécula resultante puede medirse usando un método basado en citometría de flujo para determinar la capacidad de unión residual de la molécula después de incubarse en suero humano a 37°C durante varios periodos de tiempo. Otros ensayos adecuados pueden encontrarse, por ejemplo, en Bruenke *et al.* (2005). En una realización preferida, al menos dos dominios variables se fusionan por un enlazador flexible usando, por ejemplo, los aminoácidos alanina y serina o glicina y serina. Preferentemente las secuencias enlazadoras son (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>4</sub> o (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>. En otra realización preferida no está presente ningún enlazador entre al menos un dominio V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> o

dominio V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> dentro del o entre dominios de inmunoglobulina.

En otra realización preferida, la molécula de ácido nucleico de la invención codifica dos dominios de inmunoglobulina que se unen específicamente con CD19 y un dominio de inmunoglobulina que se une específicamente con CD16 (FcγRIIIa).

En otra realización preferida, la molécula de ácido nucleico de la invención codifica dos dominios de inmunoglobulina que se unen específicamente con CD33 y un dominio de inmunoglobulina que se une específicamente con CD16 (FcγRIIIa).

Un anticuerpo codificado por la molécula de ácido nucleico de la invención que comprende dos sitios de unión para un antígeno tumoral y uno para el antígeno efector, ejerce mejores propiedades en comparación con el derivado de anticuerpo scFv biespecífico. El nuevo derivado de anticuerpo de la presente invención muestra en ensayos de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) una mayor eficacia en comparación con el derivado scFv biespecífico. Además, el triple cuerpo Fv de cadena sencilla (triacuerpo) tiene propiedades farmacocinéticas más favorables. En ratones, la semivida de retención en suero *in vivo* es mayor que en la semivida presentada por el anticuerpo scFv biespecífico en tándem. Además, se ha mostrado previamente que un anticuerpo estabilizado con disulfuro que tiene enlaces disulfuro en todos los dominios de inmunoglobulina, es más estable en comparación con una variante del anticuerpo scFv biespecífico no estabilizada con disulfuro (Brüenke *et al.*, 2005).

Como se muestra en los ejemplos, el fragmento de anticuerpo recombinante [CD33xCD16xCD33] tiene una mayor avidéz por el antígeno tumoral mieloide CD33 que el bsscFv [33xds16], usado como una proteína control monovalente de CD33. Resulta importante que la mayor avidéz por CD33 se tradujo en un incremento del potencial de ADCC: el triacuerpo Fv de cadena sencilla (sctb) [33xds16x33] necesitaba concentraciones 8 veces menores para inducir la lisis semi-máxima, como el bsscFv [33xds16].

En otra realización todavía más preferida, el polipéptido comprende además al menos un (poli)péptido no relacionado con dominios de inmunoglobulina que puede ser, por ejemplo, una etiqueta o un (poli)péptido funcional adecuado para mejorar el rendimiento del polipéptido de la invención. La etiqueta puede ser, por ejemplo, una etiqueta Strep, una etiqueta His, una etiqueta Myc o una etiqueta Flag. Los polipéptidos funcionales son, por ejemplo, una secuencia señal de secreción kappa, albúmina de suero humano (hsa) o fragmentos de los mismos, péptidos capaces de unirse con hsa u otras proteínas del suero; péptidos capaces de unirse con el receptor de Fc neonatal (FcRn), la aldolasa de músculo humano (hma) o fragmentos de la misma, la región bisagra de CD8, regiones constantes de inmunoglobulina, la Interleucina-2, Interleucina-15 e Interleucina-18, el Factor Estimulante de Colonias de Macrófagos y Granulocitos (GM-CSF), el Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos (G-CSF) o un péptido que proporcione al menos un sitio de N-glicosilación.

El término "(poli)péptido", tal como se usa en el presente documento, describe un grupo de moléculas que comprende el grupo de péptidos, que consiste en hasta 30 aminoácidos, así como el grupo de polipéptidos, que consiste en más de 30 aminoácidos, como se ha definido anteriormente.

La expresión "fragmentos del mismo" en relación con la presente invención, se refiere a fragmentos de proteínas que aún tienen una o más de las funciones biológicas del (poli)péptido de longitud completa. En particular, los fragmentos de (poli)péptidos como se prevén en la presente invención son capaces de aumentar la estabilidad y/o la semivida en suero del derivado de anticuerpo de la presente invención.

Se conoce bien en el estado del arte que los polipéptidos funcionales pueden escindirse para producir fragmentos con la función inalterada o sustancialmente inalterada. Dicha escisión puede incluir la retirada de un número dado de aminoácidos N- y/o C-terminales. Adicionalmente o como alternativa, pueden retirarse varios aminoácidos internos (no terminales), siempre que el polipéptido obtenido tenga la función del (poli)péptido de longitud completa. Dicho número de aminoácidos para retirar de las regiones terminales y/o internas puede ser uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, 15, 20, 25, 30, 40, 50 o más de 50. También se prevé deliberadamente cualquier otro número entre uno y 50 de acuerdo con la presente invención.

Los medios y métodos para determinar dichos dominios funcionales de polipéptidos son bien conocidos en estado del arte e incluyen medios experimentales y bioinformáticos. Los medios experimentales incluyen la generación sistemática de mutantes de delección y su evaluación en ensayos en relación a las funciones deseadas descritas anteriormente conocidas en el estado del arte. Los medios bioinformáticos incluyen búsquedas en bases de datos. Las bases de datos adecuadas incluyeron bases de datos de secuencias proteicas. En este caso, un alineamiento múltiple de secuencias de aciertos significativos es indicativo de límites del dominio, en el que el dominio o los dominios comprende(n) la(s) subsecuencia(s) que muestran un nivel elevado de conservación de la secuencia en comparación con el resto de la secuencia. Otras bases adicionales de datos adecuadas incluyen bases de datos de modelos estadísticos de dominios proteicos conservados tales como Pfam, mantenida por el Instituto Sanger, Reino Unido ([www.sanger.ac.uk/Software/Pfam](http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam)).

Algunos de los (poli)péptidos codificados adicionalmente por la molécula de ácido nucleico de la presente invención pueden facilitar la purificación del polipéptido expresado de forma recombinante, por ejemplo, diversas etiquetas. Los métodos para añadir etiquetas y/u otros polipéptidos al polipéptido codificado por la molécula de ácido nucleico

de la presente invención, son bien conocidos por el experto en la materia y se describen, por ejemplo, en Sambrook, 2001.

En una realización preferida, las células tumorales de la invención son preferentemente células de leucemia o de linfoma. Dependiendo del origen y el estadio de las células linfoides o mieloides de las que se origina la leucemia, se expresan diferentes patrones de antígenos en su superficie. Antígenos expresados en la superficie de las células derivadas del linaje de linfocitos B, son, por ejemplo CD19, CD20 o CD22, mientras que antígenos típicos de células derivadas de células mieloides son, por ejemplo, CD13, CD33 o CD123. Estos antígenos no se expresan exclusivamente en células de leucemia sino también en células sanas (Taussig *et al.*, 2005). La expresión de CD19 en células madre leucémicas y/o células progenitoras de ciertos tipos de B-ALL ha sido descrita (Castor *et al.*, 2005). CD44v6 se expresa en un subconjunto de células precursoras tanto linfoides como mieloides y se sobreexpresa fuertemente en células de AML y en células madre de leucemia AML (LSC) (Jin *et al.*, 2006; Legras *et al.*, 1998). CD13, CD33, CD96, CD 123 y CLL-1 se expresan en células de AML y en LSC de origen mieloides (Taussig *et al.*, 2005; van Rhenen *et al.*, 2007, Hosen *et al.*, 2007).

En otra realización preferida, las células madre tumorales son células madre leucémicas. Las “células madre leucémicas” (LSC) de acuerdo con la presente invención son una población de células transformadas de forma maligna, que conducen al desarrollo de leucemias de una manera similar a como las HSC dan lugar a la generación de células hematopoyéticas normales. Representan una pequeña minoría de todas las células leucémicas (aproximadamente 1: 50.000 - 1: 10<sup>6</sup>). Sus propiedades definitorias son la capacidad para autorrenovarse indefinidamente y la capacidad para dividirse de una manera tanto asimétrica como simétrica. La suma de todas las células leucémicas en un paciente no es, por lo tanto, una población homogénea de células, sino una mezcla heterogénea que consiste en células madre leucémicas, progenitores intermedios y el grueso de células blásticas leucémicas más diferenciadas. Las LSC tienen una composición diferente de marcadores de superficie celular que el grueso de células de leucemia y son altamente resistentes a quimioterapia. Con frecuencia sobreviven a la quimioterapia, que elimina la mayoría de las células tumorales y genera una remisión. Las pocas LSC restantes están entre las células de enfermedad residual mínima (MRD) que estimulan la repoblación de la masa leucémica (“recaída”) (Tan *et al.*, 2006; Bonnet y Dick, 1997; Lapidot *et al.*, 1994; Passegue *et al.*, 2003).

En otra realización preferida, las células precursoras o progenitoras tumorales son células precursoras o progenitoras leucémicas.

En una realización preferida adicional, el tumor es una leucemia o un linfoma. Como se ha descrito anteriormente, las leucemias son cánceres de la sangre o de la médula ósea y se caracterizan por una proliferación anómala de células sanguíneas, habitualmente leucocitos. Las leucemias pueden desarrollarse en diferentes fases durante el desarrollo, incluyendo el estadio de células madre (Castor *et al.*, 20005).

En un aspecto diferente, la presente invención se refiere a un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de la presente invención.

Preferentemente, el vector es un plásmido, cósmido, virus, bacteriófago u otro vector usado, por ejemplo, convencionalmente en ingeniería genética.

La molécula de ácido nucleico de la presente invención puede insertarse en varios vectores comercialmente disponibles. Ejemplos no limitantes incluyen vectores plasmídicos procariontes, tales como los de la serie pUC, pBluescript (Stratagene), vectores de expresión de la serie pET de (Novagen) o pCRTPOPO (Invitrogen) y vectores compatibles con la expresión en células de mamífero como pREP (Invitrogen), pcDNA3 (Invitrogen), pCEP4 (Invitrogen), pMC1neo (Stratagene), pXT1 (Stratagene), pSG5 (Stratagene), EBO-pSV2neo, pBPV-1, pDBPVMNTneo, pRSVgpt, pRSVneo, pSV2-dhfr, pZD35, pLXIN, pSIR (Clontech), pIRES-EGFP (Clontech), pEAK-10 (Edge Biosystems) pTriEx-Hygro (Novagen) y pCINeo (Promega). Ejemplos de vectores plasmídicos adecuados para *Pichia pastoris* comprenden, por ejemplo, los plásmidos pAO815, pPIC9K y pPIC3.5K (todos de Invitrogen).

La molécula de ácido nucleico de la presente invención indicada anteriormente también puede insertarse en vectores de modo que se genere una fusión de traducción con la otra molécula de ácido nucleico. Las otras moléculas de ácido nucleico pueden codificar una proteína que puede, por ejemplo, aumentar la solubilidad y/o facilitar la purificación de la proteína codificada por la molécula de ácido nucleico de la invención. Ejemplos no limitantes incluyen pET32, pET41, pET43 (Novagen). Los vectores también pueden contener adicionalmente un polinucleótido que se exprese y codifique una o más chaperonas para facilitar el plegamiento proteico correcto. Los hospedadores adecuados para la expresión bacteriana comprenden, por ejemplo, cepas derivadas de BL21 (tales como BL21(DE3), BL21(DE3)PlysS, BL21(DE3)RIL, BL21(DE3)PRARE) o Rosetta®.

Para técnicas de modificación de vectores, véase Sambrook y Russel, 2001. En general, los vectores pueden contener uno o más orígenes de replicación (ori) y sistemas de herencia para donación o expresión, uno o más marcadores de selección en el hospedador, por ejemplo, resistencia a antibióticos, y uno o más casetes de expresión. Los orígenes de replicación (ori) adecuados incluyen, por ejemplo, los orígenes de replicación Col E1, SV40 viral y M13.

Un vector de expresión de mamífero típico contiene el elemento promotor que media en el inicio de la transcripción del ARNm, la secuencia codificante de la proteína, y las señales requeridas para la terminación de la transcripción y poliadenilación del transcrito. Además, también pueden incluirse elementos tales como el origen de replicación, gen de resistencia a fármacos, reguladores (como parte de un promotor inducible). El promotor *lac* es un promotor inducible típico, útil en células procariotas, que puede inducirse usando el análogo de lactosa *isopropilβ-D-galactósido* ("IPTG"). Para la expresión recombinante, el fragmento de anticuerpo puede estar ligado, por ejemplo, entre la secuencia señal PeIB, que dirige la proteína recombinante en el periplasma y el gen III en un fagémido llamado pHEN4 (descrito en Ghahroudi *et al.*, 1997). Los elementos adicionales podrían incluir potenciadores, secuencias de Kozak y secuencias intermedias flanqueadas por sitios donantes y aceptores para corte y empalme de ARN. Puede conseguirse una transcripción altamente eficaz con los promotores temprano y tardío de SV40, las repeticiones terminales largas (LTR) de retrovirus, por ejemplo, VSR, HTLV1, VIH1, y el promotor temprano del citomegalovirus (CMV). Sin embargo, también pueden usarse elementos celulares (por ejemplo, el promotor de actina humano). Los vectores de expresión adecuados para su uso en la práctica de la presente invención incluyen, por ejemplo, vectores tales como pSVL y pMSG (Farmacia, Uppsala, Suecia), pRSVcat (ATCC 37152), pSV2dhfr (ATCC 37146) y pBC12MI (ATCC 67109). La co-transfección con un marcador de selección como los genes dhfr, gpt, neomicina, higromicina para células eucariotas o genes de resistencia a tetraciclina, kanamicina o ampicilina para cultivo en *E. coli* y otras bacterias, permite la identificación y aislamiento de las células transfectadas. El ácido nucleico transfectado también puede amplificarse para expresar grandes cantidades del (poli) péptido codificado. El marcador de DHFR (dihidrofolato reductasa) es útil para desarrollar líneas celulares que portan varios cientos e incluso varios miles de copias del gen de interés. Otro marcador de selección útil es la enzima glutamina sintasa (GS) (Murphy *et al.* 1991; Bebbington *et al.* 1992). Usando estos marcadores, las células de mamífero se cultivan en medio selectivo y se seleccionan las células con la mayor resistencia.

Los posibles elementos reguladores que permiten la expresión en células hospedadoras procariotas comprenden, por ejemplo, el promotor *lac*, *trp* o *tac*, el promotor lacUV5 o el *trp* en *E. coli*, y son ejemplos de elementos reguladores que permiten la expresión en células hospedadoras eucariotas (la realización más preferida) el promotor *AOX1* o *GAL1* en levadura o el promotor de CMV (Citomegalovirus), SV40, VSR (virus de sarcoma de Rous), el promotor gai10, el promotor de factor de elongación humano 1 $\alpha$ , potenciador de CMV, promotor de CaM-quinasa, el promotor polihédrico del virus de la polihedrosis nuclear múltiple de *Autographa californica* (AcMNPV) o un intrón de globina en células de un mamífero y otros animales. Son promotores preferidos los promotores de inmunoglobulina naturales. Además de los elementos que son responsables del inicio de la transcripción, dichos elementos reguladores también pueden comprender señales de terminación de la transcripción, tales como el sitio SV40-poli-A o el sitio tk-poli-A o las señales de poliadenilación polihédrica de SV40, lacZ y AcMNPV, aguas abajo del polinucleótido.

Las secuencias codificantes insertadas en el vector pueden, por ejemplo, sintetizarse por métodos convencionales, o aislarse de fuentes naturales o producirse de forma semi-sintética, es decir, combinando síntesis química y técnicas recombinantes. El ligamiento de las secuencias codificantes con los elementos reguladores de la transcripción y/o con otras secuencias codificantes de aminoácidos, puede llevarse a cabo usando métodos conocidos. Los elementos reguladores de la transcripción (partes de un casete de expresión) que aseguran la expresión en células procariotas o eucariotas, son bien conocidos por los expertos en la materia. Estos elementos comprenden secuencias reguladoras que aseguran el inicio de la transcripción (por ejemplo, el codón de inicio de la traducción, el promotor, potenciadores y/o aislantes), sitios internos de entrada de ribosomas (IRES) (Owens *et al.*, 2001) y opcionalmente señales de poli-A que aseguran la terminación de la transcripción y estabilización del transcrito. Los elementos reguladores adicionales pueden incluir potenciadores de la transcripción así como de la traducción, y/o regiones promotoras heterólogas o asociadas de forma natural. Preferentemente, la molécula de ácido nucleico de la invención está unida operativamente con dichas secuencias de control de la expresión que permiten la expresión en células procariotas o eucariotas. El vector puede comprender además, secuencias de nucleótidos que codifican señales de secreción como elementos reguladores adicionales. Dichas secuencias se conocen bien por los expertos en la materia. Además, dependiendo del sistema de expresión usado, pueden añadirse secuencias señal a la secuencia codificante del polipéptido de la invención capaces de dirigir al polipéptido expresado a un compartimento celular. Dichas secuencias señal se conocen bien en el estado del arte.

Los vectores diseñados específicamente permiten el transporte de ADN entre diferentes hospedadores, tales como bacterias-células fúngicas o bacterias-células animales.

Un vector de expresión de acuerdo con la presente invención es capaz de dirigir la replicación, y la expresión, del polinucleótido y la enzima codificada de la presente invención. Se conocen en el estado del arte vectores de expresión adecuados que comprenden los elementos reguladores descritos, tales como el vector de expresión de ADNc Okayama-Berg pcDV1 (Farmacia), pRc/CMV, pcDNA1, pcDNA3 (In-Vitrogene, su uso, entre otros, está en los ejemplos adjuntos), pSPORT1 (GIBCO BRL) o pGEMHE (Promega), o vectores de expresión de procariotas, tales como lambda gt11, pJOE, la serie pBBR1-MCS, pJB861, pBSMuL, pBC2, pUCPKS, pTACT1 o, preferentemente, el vector pET (Novagen).

Las moléculas de ácido nucleico de la invención, tal como se han descrito anteriormente en el presente documento pueden diseñarse para su introducción directa o para su introducción mediante liposomas, vectores de fagos o vectores virales (por ejemplo, adenovirales, retrovirales) en la célula. Adicionalmente, pueden usarse sistemas

5 baculovirales o sistemas basados en Virus Vaccinia o Virus del Bosque de Semliki como sistema de expresión eucariota para las moléculas de ácido nucleico de la invención. Pueden usarse vectores de expresión derivados de virus tales como retrovirus, virus vaccinia, virus adeno-asociados, herpesvirus, o virus del papiloma bovino, para el suministro de los polinucleótidos o vector en la población celular diana. Pueden usarse métodos que se conocen bien por los expertos en la materia para la construcción de los vectores recombinantes virales; véase, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook, 2001 y Ausubel, 2001.

10 En otro aspecto más, la presente invención se refiere a un hospedador no humano transformado con el vector de la invención.

15 Los hospedadores procariotas adecuados comprenden, por ejemplo, bacterias de las especies *Escherichia*, *Bacillus*, *Streptomyces* y *Salmonella typhimurium*. Son células hospedadoras eucariotas adecuadas, por ejemplo, células fúngicas, entre otras, de levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia pastoris* o células de insecto tales como las células S2 de *Drosophila* y Sf9 de *Spodoptera* y células vegetales. Los medios de cultivo y las condiciones apropiadas para las células hospedadoras anteriormente descritas son bien conocidas en el estado del arte.

20 Las células hospedadoras de mamífero que podrían usarse incluyen células humanas Hela, HEK293, H9 y Jurkat, células NIH3T3 y C127 de ratón, células COS 1, COS 7 y CV1, QC1-3 de codorniz, células L de ratón, células de ovario de hámster chino (CHO) y células de melanoma de Bowes. También dentro del alcance de la presente invención hay células primarias de mamífero tales como fibroblastos embrionarios de ratón (MEF). Como alternativa, la proteína recombinante de la invención puede expresarse en líneas celulares estables que contienen la construcción génica integrada en un cromosoma.

25 En una realización más preferida, dicha célula es una célula primara o línea celular primaria. Las células primarias son células que se obtienen directamente de un organismo. Las células primarias adecuadas son, por ejemplo, fibroblastos embrionarios de ratón, hepatocitos primarios de ratón, cardiomiocitos y células neuronales así como células madre del músculo del ratón (células satélite) y líneas celulares inmortalizadas estables, derivadas de las mismas.

30 Los animales transgénicos no humanos como hospedadores, transfectados con y/o que expresan la molécula de ácido nucleico de la presente invención también quedan dentro del alcance de la invención. En una realización preferida, el animal transgénico es un mamífero, por ejemplo, un hámster, vaca, gato, cerdo, perro o caballo.

35 Además, la presente invención se refiere a un método para la producción de un polipéptido que comprende el cultivo de la célula hospedadora de la invención en condiciones adecuadas y el aislamiento del polipéptido recombinante producido.

40 Se conocen bien por los expertos en la materia condiciones adecuadas para cultivar un hospedador procariota o eucariota. Por ejemplo, las condiciones adecuadas para cultivar bacterias son cultivarlas con aireación en medio Luria Bertani (LB). Para aumentar el rendimiento y la solubilidad del producto de expresión, el medio puede tamponarse o complementarse con aditivos adecuados que se sabe que potencian o facilitan ambos. *E. coli* puede cultivarse desde 4 a aproximadamente 37°C, la temperatura exacta o la secuencia de temperaturas depende de la molécula que se va a sobreexpresar. En general, el experto en la materia también es consciente de que estas condiciones pueden tener que adaptarse a las necesidades del hospedador y a los requisitos del polipéptido expresado. En caso de que un promotor inducible controle el ácido nucleico de la invención en el vector presente en la célula hospedadora, la expresión del polipéptido puede inducirse mediante la adición de un agente inductor apropiado. Los protocolos y las estrategias de expresión adecuadas son conocidos por los expertos en la materia.

50 Dependiendo del tipo celular y sus requisitos específicos, puede llevarse a cabo el cultivo de células de mamífero, por ejemplo, en medio RPMI o DMEM que contiene FCS 10% (v/v), L-glutamina 2 mM y penicilina/estreptomicina 100 U/ml. Las células pueden mantenerse a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%, saturada de agua.

El medio adecuado para el cultivo de células de insecto es, por ejemplo, TNM + FCS 10% o medio SF900. Se cultivan habitualmente células de insecto a 27 °C como cultivos de adhesión o suspensión.

55 Los protocolos de expresión adecuados para las células eucariotas por los expertos en la materia y pueden recuperarse, por ejemplo, de Sambrook, 2001.

60 Los métodos para aislar el polipéptido producido son bien conocidos en el estado del arte y comprenden, sin limitación, etapas de método tales como cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel (cromatografía de exclusión por tamaño), cromatografía de afinidad, cromatografía líquida de alta presión (HPLC), HPLC de fase inversa, electroforesis en gel de disco o inmunoprecipitación, véase, por ejemplo, en Sambrook, 2001.

65 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un polipéptido codificado en la molécula de ácido nucleico de la invención o producido por el método de la invención.

Además, la presente invención se refiere a una composición de diagnóstico que comprende al menos uno de: la molécula de ácido nucleico de la invención, el vector de la invención o el polipéptido de la invención.

La afinidad y/o avidéz potenciada del polipéptido de la invención permite su uso en ensayos de diagnóstico. Por ejemplo, estas moléculas pueden usarse como agentes de detección sensibles para células malignas, que expresan los antígenos respectivos en la superficie celular. Por lo tanto, pueden generarse variantes monoespecíficas de alta avidéz, que están equipadas con tres restos de unión dirigidos contra un antígeno de superficie celular. Como otro

ejemplo, pueden ser útiles moléculas tri-específicas para la detección de células que expresan, al menos, uno de los tres antígenos a los que se dirige la molécula, con un único agente. Especialmente la alta estabilidad de los fragmentos scFv estabilizados con disulfuro los cuales son incorporados en este formato, permite un almacenamiento a largo plazo, que es deseable para agentes de diagnóstico.

Además, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende la molécula de ácido nucleico de la invención, el vector de la invención o el polipéptido de la invención.

De acuerdo con la presente invención, la expresión "composición farmacéutica" se refiere a una composición para administración a un paciente, preferentemente a un paciente humano. La composición farmacéutica de la invención comprende los compuestos enumerados anteriormente (en los que el término "compuesto" se refiere a la molécula de ácido nucleico, vector y el polipéptido mencionados, así como los fragmentos o derivados, o modificaciones de los mismos), solos o en combinación. Puede comprender, opcionalmente, moléculas adicionales capaces de alterar las características de los compuestos de la invención con ello, por ejemplo, estabilizando, modulando y/o activando su función. La composición puede estar en forma sólida, líquida o gaseosa y puede estar, entre otros, en forma de un polvo o polvos, un comprimido o comprimidos, una solución o soluciones o un aerosol o aerosoles. La composición farmacéutica de la presente invención puede comprender, opcional y adicionalmente, un vehículo farmacéuticamente aceptable. Por "vehículo farmacéuticamente aceptable" se entiende un sólido no tóxico, un filtro semisólido o líquido, diluyente, material encapsulante una formulación auxiliar de cualquier tipo. Se conocen bien en el estado del arte ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables e incluyen soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones de aceite/agua, diversos tipos de agentes humectantes, soluciones estériles, disolventes orgánicos incluyendo DMSO, etc. Las composiciones que comprenden dichos vehículos pueden formularse por métodos convencionales bien conocidos. El término "parenteral" tal como se usa en el presente documento se refiere a modos de administración, que incluyen inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intraesternal, subcutánea e intra-articular. Estas composiciones farmacéuticas pueden administrarse al sujeto a una dosis adecuada. El régimen de dosificación se determinará por el médico tratante y los factores clínicos. Como se conoce bien en las técnicas médicas, la dosificación para un paciente cualquiera depende de muchos factores, incluyendo la talla del paciente, el área de superficie corporal, la edad, el compuesto particular a administrar, el sexo, el momento y la vía de administración, la salud general y otros fármacos que se administren simultáneamente. La cantidad terapéuticamente eficaz para una situación dada se determinará fácilmente por experimentación rutinaria y está dentro de la experiencia y el criterio del especialista clínico o del médico habitual. En general, el régimen como administración regular de la composición farmacéutica debería estar en el intervalo de 1 µg a 5 g de unidades por día. Sin embargo, una dosificación más preferida podría estar en el intervalo de 0,01 mg a 100 mg, aún más preferida de 0,01 mg a 50 mg y todavía más preferida de 0,01 mg a 10 mg por día.

Como se ha mencionado anteriormente, la molécula de ácido nucleico de la invención puede formularse en una composición farmacéutica. La molécula de ácido nucleico va a introducirse finalmente en las células deseadas. Las formulaciones apropiadas incluyen aquellas en las que se administran  $10^6$  a  $10^{12}$  copias de la molécula de ADN, comprendida de forma ventajosa en un vector apropiado por dosis. El vector puede ser, por ejemplo, un fago, plásmido, vector viral o retroviral. Los vectores retrovirales pueden ser competentes en replicación o defectuosos en replicación. En este último caso, la propagación viral se producirá en general solamente en hospedadores/células complementarios.

La molécula de ácido nucleico de la invención, el vector de la invención o el polipéptido de la invención pueden usarse para el tratamiento de tumores.

El efecto deseado en relación con el uso en el tratamiento es la inducción de una respuesta inmune contra células que expresen el antígeno o los antígenos tumorales diana, especialmente células de leucemia.

En una realización preferida, los tumores para tratar son leucemias o linfomas.

Son leucemias o linfomas a los que se dirige la presente invención por ejemplo, AML, CML, ALL, CLL o linfoma no Hodgkin tal como se ha definido anteriormente.

Las figuras muestran:

Figura 1. Construcción de un triple cuerpo Fv de cadena sencilla en tándem recombinante (o triacuerpo; sctb). Los dos scFv distales son específicos para los antígenos tumorales y el scFv central se dirige contra una molécula desencadenante activadora de las células efectoras. CMV, *promotor temprano inmediato de citomegalovirus*, Igκ, secuencia señal de secreción de la cadena L kappa de Ig murina; V<sub>L</sub>, V<sub>H</sub>, secuencia de ADNc que codifica las regiones V de cadenas L o H de Ig; Strep, c-myc, 6xHis, ADNc que codifica un marcador de strep, c-myc o hexahistidina.

Figura 2. Construcción y expresión del sctb estabilizado por disulfuro (ds) [19x16x19]. (A) Diseño del sctb ds[19x16x19]. Los dos scFv distales son específicos para el antígeno tumoral CD19 y el scFv central se dirige contra la molécula desencadenante activadora CD16 en células NK y macrófagos. CMV, *promotor temprano inmediato de citomegalovirus*; I $\kappa$ , secuencia líder de secreción de la cadena L kappa de Ig murina; V<sub>L</sub>, V<sub>H</sub>, secuencias de ADNc que codifican las regiones V de cadenas L o H de Ig; L, ADNc que codifica un enlazador flexible de 20 aminoácidos, por ejemplo, (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>4</sub>; Strep, c-myc, 6xHis, ADNc que codifica un marcador de strep, c-myc o hexahistidina; S-S, enlace disulfuro estabilizador. La integridad y pureza del sctb [19x16x19] después de la cromatografía de afinidad con perlas de agarosa Ni-NTA se evalúa por SDS-PAGE reductora y tinción con azul de Coomassie (B) y análisis de transferencia por Western blot usando anticuerpos anti-his o anti-Strep para detección, respectivamente (C).

Figura 3. Unión del antígeno específica y simultánea del sctb ds[19x16x19]. (A) Análisis mediante FACS de la unión específica del sctb ds[19x16x19] con las células SEM CD19 positivas (i), células CEM CD19 negativas (ii), células CHO transfectadas con CD16 (iii), y células CHO no transfectadas (iv). (pico blanco: señal del control de isotipo; pico negro; señal de sctb ds[19x16x19]). (B) Unión simultánea con CD19 y CD16. Las células SEM se incubaron con el sctb ds[19x16x19] y se mostró la unión simultánea mediante la adición de una proteína de fusión consistente en el dominio extracelular de CD16 y GFP (CD16ex-GFP) (i). La señal de fluorescencia producida por CD16ex-GFP se bloqueó por pre-incubación de las células SEM con un exceso molar de 50 veces del mAb de CD19 4G7 (ii) o pre-incubando la proteína de fusión CD16ex-GFP con el mAb CD16 3G8 (iii). No se produjo bloqueo por adición de un isotipo de IgG1 no relevante. (pico blanco: señal de sctb control; pico negro; señal de sctb ds[19x16x19]; pico gris oscuro; señal obtenida después de la adición del mAb parental; pico gris claro: señal después de la adición del isotipo de IgG1).

Figura 4. Comparación de las actividades de unión del sctb ds[19x16x19] y el scFv biespecífico (bs) ds[19x16]. (A) Curvas de unión en equilibrio para el sctb ds[19x16x19]; (izquierda) y el bsscFv ds[19x16] (derecha) obtenido mediante citometría de flujo. Se añadieron concentraciones crecientes del sctb y del bsscFv a células SEM CD19 positivas (cuadrado negro lleno) o a células CHO transfectadas con CD16 (triángulo gris abierto) y se detectaron con un anticuerpo anti-His. Se calcularon los valores de K<sub>D</sub> mediante el algoritmo de Langmuir/Scatchard. (B) Inhibición competitiva dependiente de la concentración, de la unión del mAb de CD19 4G7 con células SEM. Se controló mediante citometría de flujo la reducción de la unión del mAb 4G7 con concentraciones crecientes de los inhibidores sctb ds[19x16x19] (cuadrado negro lleno) o bsscFv ds[19x16] (triángulo gris abierto). Para cada concentración de los inhibidores se calculó el porcentaje resultante de inhibición. (C) Retención en la superficie celular *in Vitro*. Las células SEM se decoraron con el sctb ds[19x16x19] (cuadrado negro lleno) o el bsscFv ds[19x16] (triángulo gris abierto), respectivamente, y se incubaron a 37°C. Después de eliminar mediante lavado las moléculas en exceso, se retiraron alícuotas y se analizaron en los puntos temporales indicados, las moléculas retenidas en la superficie celular mediante citometría de flujo. \*Diferencia estadísticamente significativa entre el sctb ds[19x16x19]; y el bsscFv ds[19x16].

Figura 5. El sctb ds[19x16x19] media en la lisis potente de células diana SEM CD19 positivas a través de MNC recién aisladas como células efectoras. (A) La inducción de ADCC es específica de CD19 y dependiente de CD16. El sctb ds[19x16x19] indujo lisis específica a la concentración 1 nM a una relación de células efectoras y diana (E:T) de 40:1. Ni el sctb control no relevante, ni los mAb parentales 4G7 (CD19) y 3G8 (CD16) solos fueron capaces de inducir lisis significativa a concentración equimolar. La ADCC se inhibió de forma competitiva mediante la adición de un exceso molar de 125 veces de los mAb parentales 4G7 o 3G8, pero no por el exceso correspondiente de un isotipo de IgG1. (B) A la concentración 1 nM el sctb ds[19x16x19] indujo ADCC significativa sobre un amplio intervalo de relaciones E:T y el alcance de la lisis específica aumentó con relaciones E:T crecientes (barras negras: sctb ds[19x16x19]; barras grises; sctb de control, barras blancas: sin anticuerpo). Los datos se presentan como el porcentaje medio de la lisis  $\pm$  error típico de la media (ETM) obtenido con MNC aisladas de al menos tres donantes sanos diferentes. \*Diferencias estadísticamente significativas en ADCC en comparación con el control sin anticuerpo añadido. #Diferencias estadísticamente significativas en ADCC en comparación con el sctb ds[19x16x19] añadido solo.

Figura 6. Inducción dependiente de dosis de ADCC de diferentes líneas celulares tumorales por el sctb ds[19x16x19] y el bsscFv ds[19x16]. Las líneas celulares tumorales CD19 positivas SEM (A), BV-173 (B) y ARH-77 (C) se usaron como dianas para comparar la eficacia tanto del sctb como del bsscFv a una relación de células E:T constante de 40:1. El sctb ds[19x16x19] (cuadrado negro lleno) y el bsscFv ds[19x16] (triángulo gris abierto) desencadenaron ADCC de una manera dosis-dependiente. Ni el control no relevante sctb (círculo negro lleno) ni el control no relevante bsscFv (círculo gris abierto) indujeron muerte significativa. Los puntos de datos representan porcentaje medio de la lisis  $\pm$  ETM obtenido con MNC aisladas de al menos seis donantes sanos diferentes. \*Diferencias estadísticamente significativas en ADCC en comparación con el control sin anticuerpo añadido. #Diferencias estadísticamente significativas entre muerte inducida por sctb ds[19x16x19] y bsscFv ds[19x16].

Figura 7. Lisis potente de células primarias de linfoma CD19positivas y blastos de leucemia por el sctb ds[19x16x19] y el bsscFv ds[19x16]. (A) Células malignas de sangre periférica (PB) o médula ósea (BM) de nueve pacientes con B-CLL, y de un paciente con MCL y uno con B-ALL, se lisaron por el sctb ds[19x16x19]

(barras negras) y el bsscFv ds[19x16] (barras blancas) a la concentración de 1 nM, usando MNC de un donante sano a una relación E:T de 40:1. No se indujo lisis por un sctb no relevante (barras grises oscuras) o por MNC solas (barras grises claras). Los puntos de datos se presentan como valores medios de las determinaciones por triplicado, las barras de error representan el ETM. (B) Curvas de dosis-respuesta usando células de pacientes 1-4 con B-CLL como dianas a una relación E:T de 40:1. El sctb ds[19x16x19] (cuadrado negro lleno) indujo lisis con valores de  $CE_{50}$  de 10 a 20 veces menores que el bsscFv ds[19x16] (triángulo gris abierto). No se observó lisis significativa con un sctb de control no relevante (círculo abierto). Los puntos de datos representan el porcentaje medio de lisis  $\pm$  ETM obtenido con MNC aisladas de al menos tres donantes sanos diferentes. \*Diferencias estadísticamente significativas en ADCC en comparación con el control sin anticuerpo añadido. #Diferencias estadísticamente significativas entre destrucción inducida por el sctb ds[19x16x19] y el bsscFv ds[19x16].

Figura 8. Tiempos de retención en plasma *in vivo*. El sctb ds[19x16x19] (cuadrado negro lleno) y el bsscFv ds[19x16] (triángulo gris abierto) se inyectaron por separado *i.v.* en ratones NOD-SCID. Se tomaron muestras sanguíneas de los ratones en varios puntos temporales y se analizó la presencia de sctb inmunorreactivo y bsscFv en el suero por citometría de flujo usando células SEM CD19 positivas (A) y células CHO transfectadas con CD16 (B). \*Diferencias estadísticamente significativas entre la unión residual del sctb ds[19x16x19] y el bsscFv ds[19x16].

Figura 9. Estabilidad en suero *in vitro* a 37°C. El sctb ds[19x16x19] (cuadrado negro lleno) se incubó durante varios periodos de tiempo en suero humano a 37°C. Se determinaron las capacidades de unión residual de los restos de unión a CD19 y CD16 mediante citometría de flujo. (A) Unión residual a células SEM CD19 positivas. (B) Unión residual a las células CHO transfectadas con CD16.

Figura 10. Construcción y expresión del sctb [33xds16x33]. (A) Diseño del sctb [33xds16x33]. Los dos scFv distales son específicos para el antígeno tumoral mielóide CD33 y el scFv central se dirige contra la molécula desencadenante activadora CD16 en células NK y macrófagos. CMV, *promotor temprano inmediato de citomegalovirus*; Ig $\kappa$ , secuencia señal de secreción de la cadena L kappa de Ig murina; V<sub>L</sub>, V<sub>H</sub>, secuencias de ADNc que codifican las regiones V de las cadenas L o H de Ig; L, ADNc que codifica un enlazador flexible de 20 aminoácidos (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>4</sub>; Strep, c-myc, 6xHis, ADNc que codifica un marcador de strep, c-myc o hexahistidina; S-S, enlace disulfuro estabilizador. La integridad y la pureza del sctb [33xds16x33] después de la cromatografía de afinidad con perlas de agarosa Ni-NTA se evaluó mediante SDS-PAGE reductora y tinción con azul de Coomassie (B) y análisis de transferencia por Western blot usando un anticuerpo anti-his para la detección (C).

Figura 11. Construcción y expresión del bsscFv [33xds16]. (A) Diseño del bsscFv [33xds16]. El scFv N-terminal es específico para el antígeno tumoral CD33 y el scFv C-terminal se dirige contra la molécula desencadenante activadora CD16 en células NK y macrófagos. CMV, *promotor temprano inmediato de citomegalovirus*; Ig $\kappa$ , secuencia señal de secreción de la cadena L kappa de Ig murina; V<sub>L</sub>, V<sub>H</sub>, secuencias de ADNc que codifican las regiones V de las cadenas L o H de Ig; L, ADNc que codifica un enlazador flexible de 20 aminoácidos (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>4</sub>; Strep, c-myc, 6xHis, ADNc que codifica un marcador de strep, c-myc o hexahistidina; S-S, enlace disulfuro estabilizador. La integridad y la pureza del bsscFv [33xds16] después de la cromatografía de afinidad con perlas de agarosa Ni-NTA se evaluó mediante SDS-PAGE reductora y tinción con azul de Coomassie (B) y análisis de transferencia por Western blot usando un anticuerpo anti-his para su detección (C).

Figura 12. El sctb [33xds16x33] se une específicamente y simultáneamente con los antígenos respectivos. (A) Unión específica del sctb [33xds16x33] con células HL-60 CD33-positivas (i), células CHO transfectadas con CD16 (ii) y células SEM antígeno CD33 y CD16 negativas (iii) se examinaron mediante análisis de fluorescencia. (pico gris: señal del control sctb; pico blanco; señal de sctb [33xds16x33]). (B) Unión simultánea con CD16 y CD33. Se incubaron las células CHO transfectadas con CD16 con el sctb [33xds16x33] y se reveló la unión simultánea por adición de una proteína de fusión consistente en el dominio extracelular de CD33 y DsRed (CD33ex-DsRed) (pico gris: señal de sctb de control; pico blanco: señal de sctb [33xds16x33]).

Figura 13. La proteína de control bsscFv [33xds16] se une específicamente y simultáneamente con los antígenos diana respectivos. (A) Unión específica del bsscFv [33xds16] con células HL-60 positivas para CD33 (i), células CHO transfectadas con CD16 (ii) y células SEM negativas para antígeno CD33 y CD16 (iii) se examinaron mediante análisis de fluorescencia. (pico gris: señal de bsscFv de control; pico blanco; señal de sctb [33xds16]). (B) Unión simultánea con CD16 y CD33. Se incubaron células CHO transfectadas con CD16 con el bsscFv [33xds16] y se mostró la unión simultánea por la adición de una proteína de fusión consistente en el dominio extracelular de CD33 y DsRed (CD33ex-DsRed) (pico gris: control de la señal de bsscFv; pico blanco: señal de bsscFv [33xds16]).

Figura 14. Curvas de unión en equilibrio del sctb [33xds16x33] y el bsscFv [33xds16]. Se obtuvieron curvas de unión en equilibrio mediante citometría de flujo. Se incubaron las células HL-60 CD33-positivas (izquierda) o las células CHO transfectadas con CD16 (CHO 16-10) (derecha) con concentraciones crecientes de los fragmentos de anticuerpo y se detectaron con un anticuerpo anti-His. Los valores de  $K_D$  se calcularon por el algoritmo de Langmuir/Scatchard (Benedict *et al.*, 1997). (A) sctb [33xds16x33], (B) bsscFv [33xds16].

Figura 15. Inducción dependiente de dosis de ADCC por el sctb [33xds16x33] y el bsscFv [33xds16]. La línea celular tumoral positiva para CD33-HL-60 se usó como diana para comparar la eficacia tanto del sctb y como del bsscFv a una relación de células E:T constante de 40:1. El sctb [33xds16x33] (cuadrado lleno) y el bsscFv [33xds16] (cuadrado abierto) desencadenaron ADCC de una manera dosis-dependiente. Ni el control no relevante sctb (círculo lleno) ni el control no relevante bsscFv de (círculo abierto) indujeron una muerte significativa. Los puntos de datos representan el porcentaje medio de la lisis  $\pm$  ETM obtenido con MNC aisladas de ocho donantes sanos diferentes. \*Diferencias estadísticamente significativas en ADCC en comparación con el anticuerpo de isotipo respectivo. #Diferencias estadísticamente significativas entre destrucción inducida por sctb [33xds16x33] y bsscFv [33xds16].

#### Ejemplo 1: Construcción de un triple cuerpo de scFv en tándem (triacuerpo)

Un triple cuerpo de Fv de cadena sencilla (triacuerpo; sctb) consiste en una única cadena polipeptídica con tres scFv conectados en tándem (Fig. 1). Preferentemente los scFv distales pueden ser específicos para cualquier antígeno tumoral, y el scFv central específico para cualquier molécula desencadenante en células efectoras, tales como CD16 (Fc $\gamma$ RIII) en células NK y macrófagos. También son posibles otras disposiciones de modo que pueda dirigirse uno de los scFv terminales frente a un antígeno en las células efectoras, mientras que los otros dos scFv son específicos para un antígeno expresado en las células tumorales.

Para generar el formato de un triple cuerpo recombinante de Fv de cadena sencilla en tándem (sctb) tres scFv, comprendiendo cada uno una cadena ligera variable y una cadena pesada variable conectada mediante un enlazador de 20 aa (Kreber *et al.*, 1997), tienen que fusionarse entre sí con un enlazador flexible (por ejemplo 20 aa (G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub>). Para la construcción de un triple cuerpo de Fv de cadena sencilla en tándem (triacuerpos) tiene que ligarse un sitio de clonación múltiple (MCS) en un vector de expresión adecuado, por ejemplo, en el vector de expresión eucariota pSecTag2HygroC (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania), usando sitios de restricción apropiados. Este sitio de clonación múltiple y el vector resultante tienen que proporcionar los sitios de restricción para la inserción de tres scFv, las secuencias enlazadoras, etiquetas para purificación y detección (por ejemplo 6xHis, Strep; c-myc), una secuencia señal de secreción (por ejemplo la secuencia señal de la cadena kappa de Ig) así como los elementos necesarios para su expresión en el sistema seleccionado: para la expresión en eucariotas por ejemplo, un promotor de citomegalovirus (CMV) y una señal de poliadenilación. Un casete de resistencia (por ejemplo higromicina C) será útil para la generación de una línea celular de producción transformada de forma estable. El vector anterior puede modificarse por ingeniería genética de modo que pueda insertarse un primer scFv como un casete Sfil, un segundo scFv como un casete NotI/XhoI y un tercer scFv como un casete KasI/EcoRV. También es posible el uso de otras enzimas de restricción. Cada scFv puede después reemplazarse con otros scFv, lo que proporciona un sistema de recombinación rápida de scFv de diferentes especificidades (Figura 1). Si fuera necesario, deberían usarse variantes de scFv estabilizadas por disulfuro para conseguir alta estabilidad en suero a 37°C.

En este formato pueden combinarse dos scFv dirigidos frente a un antígeno tumoral, por ejemplo CD19 combinado con un scFv dirigido frente a un antígeno efector de, por ejemplo, CD16, generando sctb [19x16x19]. Si es necesario, pueden amplificarse scFv respectivos usando la Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR), introduciendo de este modo los sitios de restricción necesarios para su clonaje en el vector mediante procedimientos de clonación convencionales (Sambrook y Russel, 2001).

#### Ejemplo 2: Expresión y purificación de un triple cuerpo de scFv en tándem (triacuerpo)

El triple cuerpo de scFv en tándem respectivo puede expresarse en células eucariotas, por ejemplo células 293T, después de una transfección transitoria usando la técnica del fosfato cálcico incluyendo cloroquina (Sambrook y Russel, 2001). Preferentemente, se genera una línea celular de producción por transfección estable con el vector linealizado (por ejemplo con la enzima FspI para derivados del vector pSecTag2HygroC) que codifica este triple cuerpo de scFv en tándem. Pueden seleccionarse clones positivos mediante, por ejemplo, higromicina C 200  $\mu$ g/ml (Carl Roth, Karlsruhe, Alemania) y posteriormente pueden pasar a ser de cadena sencilla. Para expresarse, pueden cultivarse células eucariotas monoclonales transfectadas de forma estable y seleccionarse de forma permanente en un biorreactor mini-PERM (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Alemania) con una membrana de diálisis de 12,5 kDa de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El medio que contiene la proteína recombinante tiene que recogerse habitualmente 4 veces en un periodo de dos semanas y dializarse a 4°C frente a un exceso de 4000 veces de un tampón que contiene NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 10 mM, pH 8,0. Las proteínas recombinantes etiquetadas pueden purificarse, por ejemplo, mediante cromatografía de afinidad con perlas de agarosa de níquel-ácido nitrilotriacético (Ni-NTA) (Qiagen) y finalmente dializarse frente a PBS.

La proteína eluida (por ejemplo sctb[19x16x19]) puede analizarse mediante electroforesis reductora en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) usando procedimientos convencionales (Laemmli, 1970). Los genes se tiñen con azul brillante de Coomassie R250 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Alemania) que mostrará una proteína de aproximadamente M<sub>r</sub> = 80-95 kDa. En un análisis por transferencia de Western blot, pueden detectarse los triple cuerpos de scFv en tándem (triacuerpos) usando anticuerpos dirigidos frente a las etiquetas respectivas, por ejemplo, con un anticuerpo penta-His no conjugado (Qiagen, Hilden, Alemania) y un anticuerpo secundario de oveja anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano rústico (HRP) (Dianova, Hamburgo, Alemania) o con

un anticuerpo Marcado con Strep conjugado con HRP (IBA, Goettingen, Alemania). La transferencia mediante Western blot se realiza usando reactivos de quimioluminiscencia potenciados (Amersham Pharmacia Biotech, Friburgo, Alemania).

5 Este scfb purificado puede usarse por ejemplo para los siguientes experimentos:

**Ejemplo 3:** Determinación de las constantes de equilibrio del anticuerpo (valores de  $K_D$ ).

10 Para evaluar si la incorporación de un segundo scFv de célula diana da como resultado un aumento de la afinidad/avidez, pueden determinarse las constantes de equilibrio del anticuerpo (valores de  $K_D$ ; concentración de anticuerpo a la que se consigue la unión semi-máxima). Las constantes pueden medirse por citometría de flujo tal y como se ha descrito previamente (Benedict *et al.*, 1997; Bruenke *et al.*, 2004). Se debe realizar una tinción de inmunofluorescencia en un instrumento FACSCalibur usando el software CellQuest (Becton Dickinson, Heidelberg, Alemania). Brevemente, se incuban las células positivas para el antígeno tumoral, por ejemplo, células SEM CD19  
15 positivas (Greil *et al.*, 1994) con concentraciones crecientes de fragmentos de anticuerpo recombinante en hielo. Después de lavar, los fragmentos de anticuerpo pueden detectarse mediante anticuerpos apropiados, por ejemplo con un anticuerpo penta-His y un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado con ficoeritrina (PE) (DAKO Diagnostica GmbH, Hamburgo, Alemania). Se recogen  $1 \times 10^4$  eventos de cada muestra y se analizan las células totales usando ventanas de dispersión apropiadas para excluir residuos celulares y agregados. Los experimentos se repiten 6 veces y se generan valores y análisis gráficos con el software GraphPad (Graph Pad software Inc., San Diego, CA, Estados Unidos) usando un ajuste de curva de regresión no lineal después de normalizar la intensidad de fluorescencia máxima al 100%. Los datos de los grupos deben presentarse como las medias  $\pm$  error típico de la media (ETM). Se analizan las diferencias entre los valores de  $K_D$  usando el test t de Student para muestras desapareadas. Los valores  $P < 0,05$  se consideran significativos. De forma similar, puede medirse la afinidad por el  
20 antígeno de células efectoras, por ejemplo, de CD16. En estos experimentos se compara el triple cuerpo de scFv en tándem con un bsscFv monovalente convencional (Bruenke *et al.*, 2004), que consiste en los mismos scFv usados para construcción del triple cuerpo de scFv en tándem, por ejemplo, un scFv dirigido a CD19 y uno dirigido a CD16, derivados de los mismos hibridomas. Si ambos restos de unión dirigidos a células tumorales son funcionales y contribuyen a la unión con el antígeno, el triple cuerpo de scFv en tándem debería tener una afinidad/avidez mayor  
25 para las células tumorales en comparación con su homólogo monovalente y debería mostrar un valor de  $K_D$  en intervalos nanomolares bajos. Preferentemente, la afinidad por el antígeno de las células efectoras, por ejemplo, de CD16, no debería alterarse por la fusión adicional en N- o C- terminal de otro scFv adicional. Para el antígeno de la célula efectora, el triple cuerpo de scFv en tándem debería mostrar un valor de  $K_D$  de 4 a 6 veces mayor en comparación con el antígeno de células tumorales. Por lo tanto, la afinidad/avidez de esta molécula se desplazará de forma esperada hacia las células de leucemia, según se desee.  
30  
35

**Ejemplo 4:** Eficacia del triple cuerpo de scFv en tándem (triacuerpo) en comparación con el correspondiente anticuerpo biespecífico bsscFv.

40 El triple cuerpo de scFv en tándem puede compararse en paralelo con el bsscFv respecto a la inducción de citotoxicidad dependiente de anticuerpo (ADCC) por células efectoras, por ejemplo, de células mononucleares (MNC). Se realizaron ensayos de ADCC con MNC de donantes sanos y con líneas celulares derivadas de tumores positivas para el antígeno por triplicado en un ensayo de liberación de  $^{51}\text{Cr}$  durante 3 horas tal y como se ha descrito (Elsasser *et al.* 1996). A una relación constante de efector y diana (E:T) de 40:1, se añaden los derivados  
45 del anticuerpo a las muestras 5 veces en varias diluciones seriadas equimolares y se calculan los valores de  $\text{CE}_{50}$  (concentración de derivado del anticuerpo que produce un 50 % de la lisis máxima obtenida en las células tumorales) después de restar la lisis de fondo con el software Graph-Pad Prism mediante el ajuste a la curva por regresión no lineal. Los datos de los grupos se presentan como las medias  $\pm$  ETM de al menos 4 experimentos diferentes. Las diferencias entre grupos se analizan mediante el test t de Student para muestras apareadas. Los valores  $P < 0,05$  se consideran significativos.  
50 El triple cuerpo de scFv en tándem debería ser capaz de inducir ADCC y lisar al menos tres líneas celulares derivadas de tumor diferentes, por ejemplo SEM de una manera dependiente de dosis con valores de  $\text{CE}_{50}$  en el intervalo picomolar. En condiciones idénticas el anticuerpo bsscFv también debe mediar en la lisis celular, pero se supone que su eficacia es considerablemente menor. Se espera que los valores de  $\text{CE}_{50}$  calculados son  
55 significativamente mayores y pueden ser de 30 a 40 veces mayores. Si los datos correspondientes se confirman experimentalmente, esto ilustrará claramente que en condiciones experimentales idénticas el triple cuerpo con scFv en tándem muestra una actividad lítica superior en comparación con bsscFv.

60 **Ejemplo 5: Materiales y métodos**

*Líneas celulares e hibridomas*

65 Las células de ovario de hámster chino (CHO), transfectadas de forma estable con un vector de expresión de ADNc de CD16A humano, fueron obtenidas del Dr. J. van de Winkel (Centro Médico Universitario, Utrecht, Países Bajos). El hibridoma 4G7 (CD19, mlgG1; Meeker *et al.*, 1984) fue obtenido del Dr. R. Levy (Universidad de Stanford, Palo

Alto, CA, Estados Unidos). El hibridoma 3G8 (Fc $\gamma$ RIII, CD16, mIgG1; Fleit *et al.*, 1982) fue obtenido de la Colección Americana de Cultivos Celulares Tipo (ATCC, Manassas, VA, Estados Unidos). Las células CHO, los hibridomas y la línea celular SEM derivada de precursores células B de ALL (Greil *et al.*, 1994), la línea celular ARH-77 (ATCC), la línea celular CEM (ATCC) derivada de células T de ALL, y la línea celular BV-173 con fenotipo de células pre-B (Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares, DSMZ, Braunschweig, Alemania) y la línea celular HL-60 (ATCC) derivada de AML se cultivaron en Medio Glutamax-I 1640 Roswell Park Memorial Institute (RPMI) (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) que contiene suero bovino fetal al 10% (FCS; Invitrogen), penicilina 100 unidades/ml (Invitrogen) y estreptomycin 100  $\mu$ g/ml (Invitrogen). Las células embrionarias humanas de riñón 293T(ATCC) se mantuvieron en Medio DMEM Glutamax-I (Invitrogen) suplementado con FCS al 10%, penicilina y estreptomycin a 100 unidades/ml y 100  $\mu$ g/ml, respectivamente.

*Construcción de triple cuerpos recombinantes de scFv en tándem (triple cuerpos de scFv o triacuerpos; sctb) y proteínas de fusión*

Se usó la cepa de *Escherichia coli* XL-1 blue (Stratagene, Ámsterdam, Países Bajos) como hospedador para la amplificación de los plásmidos y clonaje. Para generar el vector de expresión para el sctb ds[19x16x19], el ADNc que codifica la variante del scFv CD19 estabilizada por disulfuro (ds), fue escindido del vector pSecTag2HygroC-Strep-dsCD19 4G7xdsCD16 (Bruenke *et al.*, 2005) y se clonó como un casete de Sfil en un derivado del vector pSecTag2HygroC (Invitrogen), generando el vector pSecTag2HygroC-Strep-ds19. Para construir pSecTag2HygroC-Strep-ds19xds16xds19, las secuencias que codifican scFv dsCD16 y scFv dsCD19 se amplificaron mediante PCR a partir de pSecTag2HygroC-Step-dsCD19 4G7xdsCD16 y se ligaron en pSecTag2HygroC-Strep-ds19, usando los sitios de restricción NotI/XhoI y XhoI/Agel, respectivamente. El vector de expresión pSecTag2HygroC-Strep-7xds16x7 se construyó por intercambio de las secuencias codificantes para scFv de CD19 con las que codificaban el scFv de CD7 TH69 (Peipp *et al.*, 2002) usando sitios de restricción equivalentes. El vector de expresión para el control bsscFv [7xds16], pSecTag2HygroC-Strep 7xds16, se generó reemplazando la secuencia codificante del scFv de CD19 de pSecTag2HygroC-Strep ds CD19 4G7xdsCD16 con la que codifica para scFv TH69 como un fragmento Sfil.

Para construir el vector de expresión para el sctb [33xds16x33], se escindieron las secuencias codificantes para scFv CD33 del vector pet27b(+)-Strep-His-CD33-ETA-KDEL (Schwemmlein *et al.*, 2006) y se clonaron como un casete Sfi en el vector pSecTag2HygroCStrep-ds19xds16xds19, reemplazando las secuencias codificantes del extremo N-terminal de scFv CD19 y generando pSecTag2HygroCStrep 33xds16xds19. Para generar el vector pSecTag2HygroC-Strep 33xds16x33, la secuencia codificante de scFv CD33 se amplificó mediante PCR a partir de pet27b(+)-Strep-His-CD33-ETA-KDEL y se ligó en pSecTag2HygroCStrep 33xds16xds19, usando los sitios de restricción XhoI/EcoRV, se reemplazaron las secuencias codificantes en el extremo C-terminal de scFv CD19.

El vector de expresión para el control bsscFv [33xds16], pSecTag2HygroC-Strep 33xds16, se generó reemplazando la secuencia codificante de scFv dsCD19 en pSecTag2HygroC-Strep dsCD19 4G7xdsCD16 con el que codificaba para scFv CD33 como un fragmento Sfil.

Para construir el vector de expresión para la proteína de fusión CD33ex-DsRed, se amplificó el ADNc que codificaba el dominio extracelular de CD33 por PCR a partir del vector pSecTag-ChCD33-Fc (Schwemmlein *et al.*, 2006) y se ligó como un casete Sfil en el vector pSEC-Tag Hygro-DsRed (Peipp *et al.*, 2003).

Para confirmar la construcción correcta, se secuenciaron las construcciones finales (Sambrook y Russel, 2001) en un secuenciador de ADN automático de Applied Biosystems (Analizador Genético ABI Prism 310; Perkin-Elmer, Ueberlingen, Alemania).

#### *Expresión y purificación de fragmentos de anticuerpo recombinante y proteínas de fusión*

Para la expresión de los triple cuerpos de Fv de cadena sencilla recombinantes sctb ds[19x16x19], sctb [33xds16x33] y sctb [7xds16x7], se transfectaron células 293T con los vectores de expresión respectivos usando la técnica de fosfato cálcico incluyendo cloroquina (Sambrook y Russel, 2001). Se obtuvieron líneas celulares de producción estable para cada construcción después de la transfección con los vectores respectivos linealizados con la enzima de restricción FspI. Se seleccionaron clones positivos en presencia de Higromicina B 200  $\mu$ g/ml (Roth, Karlsruhe, Alemania) y se aislaron clones de células individuales por dilución limitante. Se analizaron los sobrenadantes con respecto a la presencia de fragmentos de anticuerpo mediante citometría de flujo. Para la expresión de alto grado, se cultivaron clones celulares bajo selección permanente en un biorreactor mini-PERM (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Alemania) usando una membrana con un tamaño de poro correspondiente a proteínas  $\leq$  12,5 kDa, de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y el medio que contenía la proteína recombinante se recogió 4 veces durante un periodo de 2 semanas. Las proteínas recombinantes etiquetadas con His se purificaron mediante cromatografía de afinidad con perlas de agarosa de níquel-ácido nitrilotriacético (Ni-NTA) (Qiagen) como se ha descrito (Bruenke *et al.*, 2005) y finalmente se dializaron frente a solución salina tamponada con fosfato (PBS).

Los fragmentos scFv biespecíficos correspondientes usados como controles, bsscFv ds[19x16], bsscFv [33xds16] y bsscFv [7xds16], se produjeron y purificaron en paralelo en condiciones idénticas. Se expresaron proteínas de fusión con la proteína verde fluorescente (GFP) y la proteína roja fluorescente DsRed en células 293T y se purificaron como se ha descrito previamente (Bruenke *et al.*, 2004).

*SDS-PAGE y análisis de transferencia por Western blot*

Se realizó SDS-PAGE mediante procedimientos convencionales (Sambrook y Russel, 2001). En experimentos de transferencia por Western, se detectaron las proteínas recombinantes bien con un anticuerpo conjugado con peroxidasa de rábano rusticano (HRP) específico para la etiqueta Strep (IBA, Goettingen, Alemania), o bien con un anticuerpo penta-His no conjugado (Qiagen, Hilden, Alemania) y un anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de ratón conjugado con HRP (Dianova, Hamburgo, Alemania). En los análisis de transferencias por Western blot se utilizaron reactivos quimioluminiscentes potenciados (Amersham Pharmacia Biotech, Friburgo, Alemania).

10 *Análisis citométrico de flujo*

Se analizó mediante inmunofluorescencia en un instrumento FACSCalibur usando el software CellQuest (Becton Dickinson, Heidelberg, Alemania) tal como se ha descrito (Bruenke *et al*, 2004). Brevemente, se recogieron  $1 \times 10^4$  eventos para cada muestra, y se analizaron células totales usando ventanas de dispersión apropiadas para excluir residuos y agregados celulares. Los fragmentos de anticuerpo recombinante se detectaron usando un anticuerpo penta-His y un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado con ficoeritrina (PE) (DAKO Diagnostica GmbH, Hamburgo, Alemania), a no ser que se indique de otro modo.

20 *Determinación de las constantes de equilibrio ( $K_D$ )*

Se determinaron los valores de  $K_D$  usando métodos basados en citometría de flujo, como se ha descrito (Bruenke *et al*, 2004; Benedict *et al*, 1997). El valor de fluorescencia medio mayor se estableció en 100% y se normalizaron los puntos de todos los datos. Los experimentos se repitieron de 4 a 7 veces y se indicaron los valores medios. Los valores  $K_D$  se calcularon usando un ajuste de curva de regresión no lineal.

25 *Ensayo de retención de superficie celular*

Se realizaron ensayos de retención en la superficie celular mediante procedimientos ya publicados, bajo condiciones que prevenían la internalización de antígenos (Adams, *et al*, 1998). Brevemente, se incubaron  $4 \times 10^6$  células SEM CD19 positivas o células CHO transfectadas con CD16 durante 1 hora en hielo, con  $10 \mu\text{g/ml}$  de sctb ds[19x16x19] o bsscFv ds[19x16]. Las células se lavaron dos veces con 12 ml de tampón de FACS frío (cloruro sódico 0,154 M, fosfato sódico 10 mM, seroalbúmina bovina 1%, azida sódica 0,1%, pH 7,2) y después se recogieron por centrifugación. Las células se resuspendieron en 4 ml de tampón FACS y se incubaron a 37°C. En varios puntos temporales las células se lavaron de nuevo para retirar moléculas disociadas y se resuspendieron en tampón de FACS. Se retiraron alícuotas de  $0,5 \times 10^6$  células, se colocaron en hielo durante 5 min, y se lavaron de nuevo. A continuación se detectaron las moléculas retenidas en la superficie celular mediante FACS, usando un anticuerpo anti-penta His conjugado con Alexa Fluor 555 (Qiagen). Todos los datos de los puntos se normalizaron para el punto temporal = 100 %. El experimento se realizó 3 veces y se indicaron los valores medios. Después se obtuvieron valores de vida media de retención de superficie celular ajustando los datos a una decaimiento exponencial de fase única.

40 *Ensayo de inhibición competitiva*

Se incubaron células SEM en hielo con el anticuerpo monoclonal (mAb) 4G7 a una concentración subsaturante de  $0,5 \mu\text{g/ml}$  bien solo o bien en presencia de diversas concentraciones de sctb ds[19x16x19] o bsscFv ds[19x16] como inhibidores. Después de lavar, el mAb 4G7 se detectó en las células con un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón marcado con PE (DAKO Diagnostica) mediante citometría de flujo. La inhibición relativa de la unión del mAb 4G7 se calculó de la siguiente manera: % de inhibición =  $[(\% \text{ de IF sin inhibidor} - \% \text{ de IF con inhibidor}) / (\% \text{ de IF sin inhibidor})] \times 100$  (IF, intensidad de fluorescencia). El experimento se realizó 5 veces y se indicaron los valores medios. Se calcularon los valores de  $CI_{50}$  (concentración del inhibidor que produce el 50 % de inhibición de la unión del mAb 4G7) usando un ajuste de curva dosis-respuesta sigmoidea .

45 *Aislamiento de MNC y células malignas de leucemia y linfoma de donantes humanos*

Se obtuvieron muestras de sangre periférica (PB) y médula ósea (BM) tamponadas con citrato o heparinizadas, tanto de voluntarios sanos como de pacientes con leucemia o linfoma, después de recibir el consentimiento informado, y con la aprobación del Comité de Ética de la Universidad de Erlangen-Nuremberg. Las MNC se enriquecieron por centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll con Lymphoflot (Biotest, Dreieich, Alemania) en tubos Leukosep (Greiner, Frickenhausen, Alemania) de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes, y se resuspendieron en medio Glutamax-I RPMI 1640 con FCS al 10% y penicilina y estreptomycin a 100 unidades/ml y  $100 \mu\text{g/ml}$ , respectivamente. La viabilidad se verificó mediante exclusión con azul de Ttrapano y superaba el 95%. Se analizaron muestras derivadas de pacientes con respecto a la expresión de CD19 mediante tinción con un anticuerpo CD19 conjugado con PE (BD Biosciences, Heidelberg, Alemania). La expresión de CD33 en blastos de AML se evaluó con un anticuerpo CD33 monoclonal de ratón de (Dako Cytomation, Glostrup, Dinamarca) que se detectó con un anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG de ratón conjugado con PE (Dako Cytomation, Glostrup, Dinamarca) y citometría de flujo.

*Reacciones de ADCC*

Se realizaron ensayos de ADCC, usando MNC de donantes sanos como células efectoras por triplicado, usando un ensayo de liberación de  $^{51}\text{Cr}$  de 3 horas como se ha descrito (Elsasser *et al*, 1996). Para experimentos de bloqueo, se añadieron los anticuerpos parentales 4G7 y 3G8 a un exceso molar de 125 veces. Se registraron curvas de dosis respuesta usando varias diluciones seriadas equimolares 5 veces de los respectivos fragmentos de anticuerpo a una relación de células efectoras y diana (E:T) constante de 40:1. Se restó la lisis de fondo inducida por MNC solas de cada punto de datos, y se calcularon los valores de  $\text{CE}_{50}$  (concentración de un fragmento de anticuerpo que produce 50 % de lisis específica máxima) usando un ajuste de curva dosis-respuesta sigmoidea. Los experimentos se repitieron de 4 a 7 veces y se indicaron los valores medios.

*Medición de la estabilidad en suero in vitro*

Se incubó el sctb ds[19x16x19] en suero humano a concentraciones subsaturantes de 2,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en un volumen total de 220  $\mu\text{l}$  a 37°C. Se determinó la actividad de unión residual en diversos puntos temporales por citometría de flujo. El punto temporal se estableció en 100%, y todos los datos se normalizaron frente a este valor. El experimento se realizó 7 veces y se indicaron los valores medios. Se calcularon los valores de vida media para cada uno de los sitios de unión de un ajuste de curva de decaimiento exponencial de una fase.

*Determinación de la vida media del plasma in vivo en ratones*

El cuidado animal y todos los experimentos se realizaron de acuerdo con las directrices federales y europeas y han sido aprobadas por las autoridades universitarias y estatales. Ratones NOD-SCID (macho, 12 semanas, peso entre 20 y 25 g, 4 ratones/grupo) recibieron inyecciones i.v. de 0,7 nmoles de sctb ds[19x16x19] (60  $\mu\text{g}$ ) o bsscFv ds[19x16] (40  $\mu\text{g}$ ) en un volumen total de 200  $\mu\text{l}$  de PBS o sólo PBS. En diversos puntos temporales, se tomaron muestras de sangre (50-100  $\mu\text{l}$ ). El suero se preparó en tubos BD Microtainer SST™ (Becton Dickinson) y se almacenó a -20°C. Se detectaron los niveles inmunorreactivos residuales de los fragmentos de anticuerpo retenidos en el suero con un anticuerpo anti-penta-His conjugado con Alexa Fluor 555 (Qiagen) por citometría de flujo usando células SEM CD19 positivas y células CHO transfectadas con CD-16. El valor obtenido en el primer punto temporal (1 min) se estableció como el 100 %. Se usó un ajuste de curva de decaimiento exponencial de una fase para calcular la vida media del plasma.

*Análisis gráfico y estadístico.*

Se realizaron los análisis gráficos y estadísticos usando el software Graph Pad Prism (Graph Pad Software Inc., San Diego, CA, Estados Unidos). Los grupos de datos se presentan como las medias  $\pm$  error típico de la media (ETM). Se analizaron las diferencias entre grupos usando el test t de Student para muestras desapareadas o, cuando sea apropiado, apareadas. Los valores  $P < 0,05$  se consideraron significativos.

**Ejemplo 6:** Construcción, expresión y purificación del triple cuerpo de scFv en tándem (triacuerpo) sctb ds[19x16x19]

El sctb ds[19x16x19] se construyó a partir de componentes de scFv estabilizados por disulfuro previamente publicados con especificidad por CD19 y CD16 (Bruenke *et al*, 2005, Fig. 2A). Los dos scFv distales fueron específicos para el antígeno tumoral linfoide CD19 y el scFv central fue específico para la molécula activadora CD16 en células NK y macrófagos. Tanto el sctb ds[19x16x19] como, para comparación, el bsscFv ds[19x16] se produjeron en células 293T humanas transfectadas de forma estable, cultivadas en un biorreactor mini-PERM y se purificaron del medio de cultivo mediante cromatografía de afinidad. Los rendimientos de cada proteína purificada variaban entre 3-10 mg por litro de medio de cultivo en ciclos de producción diferentes. El sctb ds[19x16x19] tenía una movilidad electroforética en experimentos de SDS-PAGE correspondientes a una  $M_r$  de aproximadamente 90 kDa, perfectamente de acuerdo con el valor de 88,6 kDa predicho a partir de su secuencia (Fig. 2B). No se observaron productos de degradación inmunorreactivos (Fig. 3C) y no se detectaron agregados proteicos covalentes en experimentos de SDS-PAGE no reductora (datos no mostrados).

Este sctb ds[19x16x19] purificado se usó para los siguientes experimentos:

**Ejemplo 7:** Unión de antígenos específica y simultánea del sctb ds[19x16x19]

El sctb ds[19x16x19] reaccionó tanto con CD19 como con CD16 en células intactas, como se demuestra por su capacidad para unirse específicamente con células que expresan por separado cada uno de estos antígenos (Fig. 3A). Para excluir la posibilidad de que la preparación proteica consistiera en dos subpoblaciones de moléculas cada una de ellas capaz de unirse solamente a uno de estos antígenos, se analizó la capacidad para unirse simultáneamente a ambos antígenos (Fig. 3B). Para ello, se usaron una proteína de fusión recombinante entre el dominio extracelular de CD16 y GFP, denominada CD16ex-GFP y, para comparar, una proteína de fusión similar consistente en el dominio extracelular CD64 y GFP, denominada CD64ex-GFP (Bruenke *et al*, 2005). Se incubaron

células SEM derivadas de leucemia CD19 positivas primero con el sctb ds[19x16x19] y después se las hizo reaccionar con CD16ex-GFP. Como resultado, se observó una fuerte señal de fluorescencia unida a célula que indicaba que la proteína recombinante era capaz de unirse simultáneamente tanto a CD19 asociada a célula como a CD16ex-GFP en fase fluida. No se obtuvo ninguna señal de fluorescencia cuando las células SEM CD7 negativas se incubaron de forma similar con el control producido sctb [7xds16x7] o con la proteína control CD64ex-GFP (datos no mostrados). Se estableció la especificidad de unión en experimentos de unión competitiva. La intensidad de la señal de fluorescencia se redujo a niveles basales cuando se añadió exceso del anticuerpo parental de CD19 mAb 4G7 o el anticuerpo parental de CD16 mAb 3G8, mientras que la señal no se redujo después de la adición de un control de isotipo de IgG1 no relevante (Fig. 3B).

#### Ejemplo 8: Comparación de las capacidades de unión del sctb ds[19x16x19] y del bsscFv ds[19x16]

Para evaluar si la incorporación de un segundo componente scFv para el antígeno de la célula diana en el sctb daba como resultado un aumento de la avidéz por CD19, se realizaron tres experimentos independientes. En primer lugar, se determinaron las constantes en equilibrio ( $K_D$ ) del sctb ds[19x16x19] y del bsscFv ds[19x16]. Se registraron las curvas de unión en equilibrio para ambas moléculas por citometría de flujo calibrada, y se establecieron los valores de  $K_D$  (Fig. 4A). El sctb ds[19x16x19] tuvo una  $K_D$  general de  $13,0 \pm 1,2$  nM para CD19, mientras que la afinidad del bsscFv ds[19x16] fue aproximadamente 3 veces menor:  $K_D = 42,4 \pm 5,7$  nM ( $P = 0,0048$ ). Por lo tanto, la avidéz del sctb ds[19x16x19] por CD19 fue aproximadamente 3 veces mayor que la afinidad del scFv específico de CD19 monovalente contenido en el bsscFv ds[19x16], lo que indica que ambos componentes de scFv específicos de CD19 eran funcionales y contribuían a la avidéz general del sctb ds[19x16x19] por CD19 en células intactas. Por el contrario, la afinidad del scFv específico de CD16 permaneció sin cambios, independientemente de si este componente era transportado en el bsscFv ds[19x16], cuando solamente está ocupado su extremo N-terminal, o en el sctb ds[19x16x19], en el que se une a mediante scFv de CD19. Los valores de  $K_D$  para el CD16 del sctb ds[19x16x19] y el bsscFv ds[19x16] fueron de  $58,6 \pm 4,0$  nM y  $57,6 \pm 8,9$  nM, respectivamente ( $P = 0,772$ ). Por lo tanto, el aumento 3 veces de la unión a CD19 fue un efecto de avidéz genuino, y ambos scFv específicos de CD19 localizados distalmente en este formato deben haber contribuido a la avidéz general del sctb ds[19x16x19] por el antígeno de superficie de la célula diana.

Un segundo experimento independiente proporcionó apoyo adicional para la reivindicación de que el sctb ds[19x16x19], tenía una mayor avidéz por CD19 que el bsscFv ds[19x16]. En un experimento de unión competitiva, células SEM CD19 positivas se incubaron en primer lugar con el anticuerpo de CD19 parental mAb 4G7, después cantidades crecientes del sctb ds[19x16x19] o el bsscFv ds[19x16] se añadieron como competidores, y se determinó la unión residual del mAb 4G7 a las células (Fig. 4B). Tanto el sctb ds[19x16x19] como el bsscFv ds[19x16] inhibieron de forma competitiva la unión del mAb 4G7 de una manera dependiente de la concentración, y la unión era inhibida hasta  $> 95$  % por la adición de un exceso molar de 450 veces del sctb ds[19x16x19]. Para comparar ambas construcciones, se determinaron los valores de  $CI_{50}$ , es decir la concentración a la que se alcanzó la inhibición semi-máxima. Los valores de  $CI_{50}$  para el sctb ds[19x16x19] y el bsscFv ds[19x16] fueron de  $81,3 \pm 1,2$  nM y  $287,5 \pm 1,3$  nM ( $P = 0,013$ ), respectivamente. Por lo tanto, eran necesarias concentraciones aproximadamente 3,5 veces mayores del bsscFv ds[19x16] que del sctb ds[19x16x19] para conseguir la inhibición semi-máxima. Este valor es muy cercano a la diferencia de 3 veces en avidéz, y por lo tanto, ambas mediciones independientes se confirman mutuamente entre sí y apoyan la reivindicación de un aumento aproximadamente de 3 veces en avidéz general por el sctb ds[19x16x19].

En un tercer experimento independiente, se midió la retención en la superficie celular tanto del sctb ds[19x16x19] como del bsscFv ds[19x16] en células SEM CD19 positivas a 37°C. En este experimento, las células SEM se decoraron por separado con el sctb ds[19x16x19] o el bsscFv ds[19x16], en presencia de azida sódica para evitar la internalización. Se eliminó el exceso de moléculas no unidas por centrifugación y después se incubaron las células a 37°C. En diferentes puntos temporales, las células se sedimentaron de nuevo para retirar moléculas liberadas y las moléculas unidas a células restantes se determinaron mediante citometría de flujo. En esas condiciones, el bsscFv ds[19x16] se liberó de la superficie con  $t_{1/2}$  de retención de  $7,7 \pm 0,5$  min y el sctb ds[19x16x19] con un  $t_{1/2}$  de  $51,5 \pm 2,9$  min ( $P = 0,006$ ; Fig. 4C). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la retención en la superficie celular de ninguna de las construcciones por CD16 en células CD16 positivas (datos no mostrados). Los valores de  $t_{1/2}$  para retención por CD16 fueron  $14,5 \pm 1,9$  min y  $15,5 \pm 1,2$  min para el bsscFv y el sctb ds[19x16x19], respectivamente ( $P = 0,848$ ). Tomados juntos, estos tres experimentos independientes proporcionan un fuerte apoyo para la conclusión de que ambos componentes de scFv específicos para CD19 contribuyen a la avidéz general del sctb ds[19x16x19].

#### Ejemplo 9: ADCC de líneas celulares derivadas de leucemia mediada por el sctb ds[19x16x19]

La capacidad del sctb ds[19x16x19] para mediar en la ADCC de células leucémicas humanas en combinación con células efectoras de donantes humanos sanos se midió, en primer lugar, con la línea celular SEM derivada de pro-B ALL. Se realizaron reacciones de ADCC con MNC no estimuladas recién preparadas a partir de donantes sanos no relacionados. Como resultado, el sctb ds[19x16x19] medió en la lisis de células tumorales eficaz, mientras que un sctb control específico para CD7 y CD16 fue ineficaz (Fig. 5A; las células SEM son CD7 negativas). Además, los

anticuerpos parentales mAb 4G7 (CD19) y mAb 3G8 (CD16) fueron incapaces de inducir ADCC. Para probar la especificidad de antígeno de la lisis, se realizaron experimentos de competición. La adición de los mAb parentales 4G7 o 3G8 en un exceso 125 veces redujo significativamente el grado de lisis de célula diana ( $P = 0,011$  y  $0,004$ , respectivamente), mientras que la adición de un anticuerpo de isotipo IgG1 no relevante no tuvo ningún efecto ( $P = 0,45$ ; Fig. 5A). Por lo tanto, la lisis de la célula tumoral fue específica de antígeno, y el sctb ds[19x16x19] para mediar en su efecto lítico requería la interacción específica tanto con el antígeno diana en las células tumorales como con la molécula desencadenante en las células efectoras. Además, el sctb ds[19x16x19] indujo lisis de células diana por ADCC sobre un amplio rango de relaciones entre células efectoras y células diana (E:T), que variaba de 80:1 a 2,5:1 (Fig. 5B). El alcance de la lisis aumentó con la relación E:T de una manera saturable, demostrando una clara dependencia en las células efectoras para lisis de células tumorales. El efecto fue específico de antígeno, debido a que el sctb del control, construido de forma similar con especificidad para CD7, no produjo lisis significativa, ni siquiera a relaciones E:T altas.

**Ejemplo 10:** Eficacia del triple cuerpo de scFv en tándem (triacuerpo) sctb ds[19x16x19] en comparación con el anticuerpo biespecífico correspondiente bsscFv ds[19x16].

Para investigar si el incremento de avidéz del sctb ds[19x16x19] sobre el bsscFv ds[19x16] para CD19 se asocia con un potencial citotóxico potenciado, se midió la capacidad de ambas moléculas para mediar en la ADCC en paralelo en tres líneas celulares derivadas de tumor CD19 positivas diferentes. Las líneas celulares SEM, BV-173 y ARH-77 se seleccionaron porque representaban diferentes tumores malignos linfoides B y diferentes estadios de maduración linfocitoide B. Las células SEM representaban ALL un pro-B- de alto riesgo. BV-173 representaba una leucemia precursora de linfocitos B con fenotipo de linaje mixto (doble positivo CD19 y CD33), que con frecuencia tiene un mal pronóstico. ARH-77 representaba una línea celular linfoblástide B VEB positiva. Las tres líneas se eliminaron eficazmente con el sctb ds[19x16x19] y el bsscFv ds[19x16] de una manera dependiente de concentración (Fig. 6). En los tres casos el sctb ds[19x16x19] fue más eficaz que el bsscFv ds[19x16], mientras que el control específico de CD7 sctb y bsscFv permanecieron ineficaces, incluso a altas concentraciones (Fig. 6, A-C). Se muestran los valores de  $CE_{50}$  en la Tabla I; los valores de  $CE_{50}$  para células SEM para el sctb ds[19x16x19] y el bsscFv ds[19x16] fueron de 4,1 pM y 113,6 pM, respectivamente. Los valores de  $CE_{50}$  obtenidos para el sctb estuvieron en un intervalo picomolar bajo, lo que indica una potencia muy alta. Resulta importante que para la misma línea celular diana, el sctb ds[19x16x19] consiguió un nivel igual de ADCC a concentraciones 27,7 veces menores que el bsscFv ds[19x16]. De forma similar, para las líneas celulares BV-173 y ARH-77, el sctb ds[19x16x19] produjo lisis semi-máxima a concentraciones 26,3 y 44,0 veces menores que el bsscFv ds[19x16], lo que indica que el aumento de avidéz del sctb sobre el bsscFv se tradujo en un aumento significativo en potencial de ADCC.

Tabla I: Valores de  $CE_{50}$  de ADCC por sctb ds[19x16x19] y bsscFv ds[19x16] con MNCs<sup>a</sup>

células diana	sctb [pM] (IC 95 %)	bsscFv [pM] (IC 95 %)	factor de diferencia	P-valor para diferencia de log $CE_{50}$
<b>líneas celulares</b>				
SEM	4,1 (2,8-6,0)	113,6 (24,5-526,3)	27,7	0,004
BV-173	28,6 (18,0-45,3)	753,3 (445,4-1,274)	26,3	0,001
ARH-77	29,0 (17,7-47,6)	1,277 (587,2-2,777)	44,0	0,006
<b>células malignas primarias</b>				
paciente 1	20,4 (9,2-44,9)	416,4 (277,1-625,8)	20,4	0,028
paciente 2	104,5 (31,2-350,2)	2,117 (964,9-4,646)	20,3	0,009
paciente 3	37,2 (18,2-77,6)	425,4 (202,4-894,4)	11,4	0,014
paciente 4	13,7 (6,4-26,6)	294,3 (154,3-561,3)	21,5	< 0,001

<sup>a</sup>Los valores de  $CE_{50}$  se dedujeron a partir de las curvas de dosis-respuesta mostradas en las Fig. 6A-C y 7B (IC: intervalo de confianza)

Finalmente, también se midió en reacciones de ADCC en paralelo la capacidad de ambas proteínas para mediar en la eliminación de células malignas nuevas de pacientes (Fig. 7). A este efecto, se aislaron MNC de sangre periférica (PB) o de médula ósea (BM) de once pacientes. De estos pacientes a nueve se les diagnosticó B-CLL, a uno linfoma de células del manto (MCL) y a uno B-ALL. Se usaron como células efectoras MNC de donantes sanos no relacionados, un donante para cada muestra de paciente. No se realizó un intento deliberado de emparejar el tipo de histocompatibilidad y los patrones de receptor de células killer de tipo Ig (receptores KIR) de células tumorales y donantes. Se usaron MNC en una relación E:T de 40:1 y tanto el sctb ds[19x16x19] como el bsscFv ds[19x16] a una concentración 1 nM. Para los once pacientes, el sctb ds[19x16x19] mediada por una medida claramente mejorada de la lisis de células tumorales específica, en relación con reacciones control que no contienen ni un agente derivado de anticuerpo añadido, ni un sctb control no relevante (Fig. 7A). Para las once muestras, el sctb ds[19x16x19] produjo consecuentemente, una lisis específica de la célula diana mayor que el bsscFv ds[19x16]. Se registraron las curvas de dosis-respuesta para cuatro pacientes con B-CLL (pacientes 1-4) en al menos tres experimentos separados usando MNC de al menos tres donantes sanos diferentes para cada muestra de paciente, con una relación E:T de 40:1. Para los cuatro pacientes, el sctb ds[19x16x19] medió uniformemente significativamente más en ADCC que el bsscFv ds[19x16] a concentraciones equimolares (Fig. 7B). Los valores de  $CE_{50}$  para los cuatro

pacientes tanto para el sctb ds[19x16x19] como para el bsscFv ds[19x16] se resumen en la Tabla I. En todos los casos el sctb ds[19x16x19] produjo lisis semi-máxima a concentraciones aproximadamente de 11 a 21 veces menores que el bsscFv ds[19x16], similar a los efectos observados con líneas diana derivadas de leucemia (Fig. 6). Los valores de  $CE_{50}$  para el sctb ds[19x16x19] estuvieron de nuevo en un rango picomolar bajo. En todos los casos, las diferencias de capacidad lítica entre el sctb ds[19x16x19] y el bsscFv ds[19x16] fueron estadísticamente significativas, con valores  $P < 0,05$ . Estos resultados demuestran claramente que el formato de un sctb tiene un potencial superior para inducir lisis de células tumorales, que el respectivo bsscFv.

**Ejemplo 11:** Retención de plasma *in vivo* prolongada del sctb ds[19x16x19] en ratones

Otro parámetro importante que influye en el valor terapéutico de las proteínas derivadas de anticuerpo es su tiempo de retención en plasma *in vivo* o semivida en plasma. Para medir este parámetro, se inyectaron dosis equimolares de sctb ds[19x16x19] y bsscFv ds[19x16] por separado i.v. en ratones NOD-SCID. Se obtuvieron muestras de plasma en diversos puntos temporales después de la inyección, y se midió por citometría de flujo la capacidad de unión residual para CD19 en células SEM CD19 positivas (Fig. 8A) y para CD16 en células transfectantes de CHO CD16 positivas (Fig. 8B). El sctb ds[19x16x19] y el bsscFv ds[19x16] tuvieron tiempos de retención en plasma ( $t_{1/2}$ ) de 4 h y 2 h respectivamente, lo que indica que la incorporación de un segundo scFv específico de CD19 en el sctb provoca una duplicación del tiempo de retención en plasma *in vivo*.

**Ejemplo 12:** Medida de la estabilidad en suero *in vitro* a 37°C

Un factor importante que afecta a la eficacia terapéutica de las proteínas derivadas de anticuerpo es su estabilidad en suero humano. Para medir esta propiedad, se incubó el sctb ds[19x16x19] purificado en suero humano a 37°C *in vitro*, y se midió la unión residual con CD19 (Fig. 9A) y CD16 (Fig. 9B) respectivamente, en células enteras mediante análisis por FACS. Se determinaron los valores para  $t_{1/2}$ . El sctb ds[19x16x19] fue altamente estable bajo estas condiciones con un  $t_{1/2}$  de  $94,0 \pm 3,1$  h y  $153,1 \pm 4,6$  h para unión con CD19 y CD16, respectivamente. Por lo tanto, el sctb ds[19x16x19] tuvo una estabilidad mayor que el bsscFv ds[19x16] no estabilizado, para el que se obtuvo un  $t_{1/2}$  de 18 h y 40 h para unión con CD19 y CD16, respectivamente, tal y como se indica en Bruenke *et al.*, 2005.

**Ejemplo 13:** Construcción y expresión de sctb ds[33xds16x33] y bsscFv [33xds16].

El sctb [33xds16x33] (Fig. 10) y el bsscFv [33xds16] (Fig. 11) se construyeron a partir de componentes de scFv con especificidad por CD33 publicados previamente (Schwemmler *et al.*, 2005). Tanto el sctb ds[33xds16x33] como, para su comparación, el bsscFv [33xds16], se produjeron en células 293T humanas transfectadas de forma estable cultivadas en un biorreactor mini-PERM. Las proteínas recombinantes se purificaron a partir del medio de cultivo mediante cromatografía de afinidad. Los rendimientos de cada proteína purificada variaron entre 2-6 mg por litro de medio de cultivo. El sctb [33xds16x33] y el bsscFv [33xds16] tuvieron una movilidad electroforética en experimentos de SDS-PAGE correspondiente a una  $M_r$  de aproximadamente 90 kDa y 60 kDa, respectivamente, relacionado estrechamente con el valor de 86,5 kDa para el sctb [33xds16x33] (Fig. 10) y 59,8 kDa para el bsscFv [33xds16] (Fig. 11) calculado a partir de sus secuencias.

**Ejemplo 14:** Unión del antígeno específica y simultánea del sctb [33xds16x33] y bsscFv [33xds16].

Tanto el sctb [33xds16x33] (Fig. 12A) como el bsscFv [33xds16] (Fig. 13A), reaccionaron tanto con el antígeno de tumor mieloide CD33 como con la molécula activadora CD16 en células intactas, ya que fue capaz de unirse específicamente con las células que expresaban por separado cada uno de estos antígenos. Para determinar que la proteína era capaz de unirse con ambos antígenos simultáneamente, se incubaron las células CD16 positivas primero con el sctb [33xds16x33] (Fig. 12B) o el bsscFv [33xds16] (Fig. 13B), y después se hicieron reaccionar con una proteína de fusión que consiste en el dominio extracelular de CD33 y DsRed CD33ex-DsRed. Como resultado, se observó una fuerte señal roja de fluorescencia unida a célula, que indicaba que la proteína recombinante era capaz de reaccionar simultáneamente tanto con CD16 asociada a la célula como con CD33ex de fase fluida.

**Ejemplo 15:** Determinación de las constantes de equilibrio

Para evaluar si la incorporación de un segundo componente de scFv para el antígeno de la célula diana en el sctb daba como resultado un aumento de la avidéz por CD33, se determinaron las constantes de equilibrio ( $K_D$ ) del sctb [33xds16x33] y del bsscFv [33xds16]. Los valores de  $K_D$  para ambas proteínas se obtuvieron a partir de curvas de unión en equilibrio que fueron obtenidas para ambos antígenos mediante citometría de flujo calibrada (Fig. 14). Los valores de  $K_D$  se resumen en la Tabla II. El sctb [33xds16x33] y el bsscFv [33xds16] reaccionaron con CD33 con valores de  $K_D$   $28,9 \pm 1,9$  nM y  $7,9 \pm 1,1$  nM, respectivamente. Por lo tanto, la avidéz de sctb [33xds16x33] por CD33 fue aproximadamente 3-4 veces mayor que la afinidad del scFv específico de CD33 contenido en el bsscFv [33xds16]. Esto sugiere que ambos restos de scFv específicos de CD33 eran funcionales y contribuían a la unión con CD33 en células intactas. Por el contrario, las afinidades del scFv específico de CD16 estaban en el mismo intervalo. Los valores de  $K_D$  para CD16 del sctb [33xds16x33] y el bsscFv [33xds16] fueron de  $45,1 \pm 4,3$  nM y  $34,2 \pm 2,3$  nM, respectivamente. Por lo tanto, ambos scFv específicos de CD33 localizados distalmente en este formato, contribuyeron a la avidéz general del sctb [33xds16x33] por el antígeno de superficie celular en las células

tumorales.

Tabla II: Constantes de equilibrio para el bsscFv [33xds16] y el sctb [33xds16x33]

antígeno (línea celular)	K <sub>D</sub> de bsscFv [33xds16] [nM] (ETM)	K <sub>D</sub> de sctb [33xds16x33] [nM] (ETM)
CD33 (HL-60)	28,9 (± 1,9)	7,9 (± 1,1)
CD16 (CHO 16-10)	35,3 (± 2,2)	45,1 (± 4,3)

5 **Ejemplo 16:** Eficacia del triple cuerpo de scFv en tándem (triacuerpo) sctb ds [33xds16x33] en comparación con el anticuerpo biespecífico bsscFv [33xds16]

10 Para analizar si la avidéz potenciada del sctb [33xds16x33] sobre el bsscFv [33xds16] por CD33 da como resultado un aumento del potencial citolítico, se midió la eficacia de ambos fragmentos de anticuerpo para inducir ADCC en paralelo. La línea celular tumoral derivada de leucemia promielocítica HL-60 CD33 positiva se usó como diana para comparar el sctb y el bsscFv. Se usaron MNC de donantes sanos como células efectoras con una relación de células E:T constante de 40:1. El sctb [33xds16x33] y el bsscFv [33xds16] desencadenaron ADCC de una manera dosis-dependiente, mientras que los controles específicos de CD7 sctb y bsscFv permanecieron ineficaces, incluso a 15 concentraciones altas. Sin embargo, el sctb [33xds16x33] fue más eficaz que el bsscFv [33xds16] (Fig. 15). Los valores de CE<sub>50</sub> para las células HL-60 para el sctb [33xds16x33] y el bsscFv [33xds16] fueron de 21 pM y 174 pM respectivamente (p=0,018). Es importante destacar que para la misma línea celular diana, el sctb [33xds16x33] produce destrucción semi-máxima a concentraciones 8 veces menores que el bsscFv [33xds16], lo que sugiere que el aumento de avidéz del sctb sobre el bsscFv se traduce en un aumento significativo en el potencial citotóxico.

20

## Referencias:

- 5 Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (2001).
- Adams GP, Schier R, McCall AM, Crawford RS, Wolf EJ, Weiner LM, Marks JD. Prolonged *in vivo* tumour retention of a human diabody targeting the extracellular domain of human HER2/neu. Br J Cancer. 1998; 77: 1405-1412.
- 10 Barbin K, Stieglmaier J, Saul D, Stieglmaier K, Stockmeyer B, Pfeiffer M, Lang P, Fey GH. Influence of variable N-glycosylation on the cytolytic potential of chimeric CD19 antibodies. J Immunother (1997). 2006; 29: 122-133.
- Batra JK, Kasprzyk PG, Bird RE, Pastan I, King CR. Recombinant anti-erbB2 immunotoxins containing Pseudomonas exotoxin. Proc Natl Acad Sci USA. 1992; 89: 5867-5871.
- 15 Bebbington CR, Renner G, Thomson S, King D, Abrams D, Yarranton GT. High-level expression of a recombinant antibody from myeloma cells using a glutamine synthetase gene as an amplifiable selectable marker. Bio/Technology 1992; 10: 169-175.
- 20 Benedict CA, MacKrell AJ, Anderson WF. Determination of the binding affinity of an anti-CD34 single-chain antibody using a novel, flow cytometry based assay. J Immunol Methods. 1997; 201(2): 223-31.
- Bonnet D y Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. Nat Med. 1997; 3(7): 730-7.
- 25 Braasch DA y Corey DR. Locked nucleic acid (LNA): fine-tuning the recognition of DNA and RNA. Chem Biol. 2001; 8(1): 1-7.
- Brinkmann U, Lee BK y Pastan I. Recombinant Immunotoxins Containing the VH or VL Domain of Monoclonal Antibody B3 fused to Pseudomonas Exotoxin. J. Immunology. 1993; 150: 2774-2782.
- 30 Bruenke J, Barbin K, Kunert S, Lang P, Pfeiffer M, Stieglmaier K, Niethammer D, Stockmeyer B, Peipp M, Repp R, Valerius T y Fey GH. Effective lysis of lymphoma cells with a stabilised bispecific single-chain Fv antibody against CD19 and FcγRIII (CD16). British Journal of Haematology. 2005; 130: 218-228.
- 35 Bruenke J, Fischer B, Barbin K, Schreiter K, Wachter Y, Mahr K, Titgemeyer F, Niederweis M, Peipp M, Zunino SJ, Repp R, Valerius T, Fey GH. A recombinant bispecific single-chain Fv antibody against HLA class II and FcγRIII (CD16) triggers effective lysis of lymphoma cells. Brit J Haematol. 2004; 125(2): 167-79.
- 40 Bryder D, Rossi DJ, Weissman IL. Hematopoietic Stem Cells. Am J Pathol. 2006; 169 (2): 338-46.
- Carnahan J, Wang P, Kendall R, Chen C, Hu S, Boone T, Juan T, Talvenheimo J, Montestruque S, Sun J, Elliott G, Thomas J, Ferbas J, Kern B, Briddell R, Leonard JP, Cesano A. Epratuzumab, a humanized monoclonal antibody targeting CD22: characterization of *in vitro* properties. Clin Cancer Res. 2003; 9: 3982S-3990S.
- 45 Cartron G, Dacheux L, Salles G, Solal-Celigny P, Bardos P, Colombat P, Watier H. Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene. Blood. 2002; 99: 754-758.
- Casasnovas RO, Slimane FK, Garant R, Faure GC, Campos L, Deneys V, Bernier M, Falkenrodt A, Lecalvez G, Maynadie M y Dene MC. Immunological classification of acute myeloplasic leukaemias: relevance to patient outcome. Leukemia. 2003; 17: 515-527.
- 50 Castor A, Nilsson L, Astrand-Grundstrom I, Buitenhuis M, Ramirez C, Anderson K, Strombeck B, Garwicz S, Bekassy AN, Schmiegelow K, Lausen B, Hokland P, Lehmann S, Juliusson G, Johansson B, Jacobsen SE. Distinct patterns of hematopoietic stem cell involvement in acute lymphoblastic leukemia. Nat Med. 2005; 11: 630-637.
- Cheung MC, Haynes AE, Stevens A, Meyer RM, Imrie K. Yttrium 90 ibritumomab tiuxetan in lymphoma. Leuk Lymphoma. 2006; 47: 967-977.
- 60 Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV. Inhibitory Fc receptors modulate *in vivo* cytotoxicity against tumor targets. Nat Med. 2000; 6: 443-446.
- Davies AJ. Radioimmunotherapy for B-cell lymphoma: Y90 ibritumomab tiuxetan and I(131) tositumomab. Oncogene. 2007; 26: 3614-3628.
- 65

- de Palazzo IG, Kitson J, Gercel-Taylor C, Adams S, Weiner LM. Bispecific monoclonal antibody regulation of Fc gamma RIII-directed tumor cytotoxicity by large granular lymphocytes. *Cell Immunol.* 1992; 142: 338-347.
- 5 Elsassner D, Valerius T, Repp R, Weiner GJ, Deo Y, Kalden JR, van de Winkel JG, Stevenson GT, Glennie MJ, Gramatzki M. HLA class II as potential target antigen on malignant B cells for therapy with bispecific antibodies in combination with granulocyte colony-stimulating factor. *Blood.* 1996; 87: 3803-12.
- Ely P, Wallace PK, Givan AL, Graziano RF, Guyre PM, Fanger MW. Bispecific-armed, interferon gamma-primed macrophage-mediated phagocytosis of malignant non-Hodgkin's lymphoma. *Blood.* 1996; 87: 3813-3821.
- 10 Eyrich M, Lang P, Lal S, Bader P, Handgretinger R, Klingebiel T, Niethammer D, Schlegel PG. A prospective analysis of the pattern of immune reconstitution in a paediatric cohort following transplantation of positively selected human leucocyte antigen-disparate haematopoietic stem cells from parental donors. *Br J Haematol.* 2001; 114: 422-432.
- 15 Ghahroudi MA, Desmyter A, Wyns L, Hamers R y Muyldermans S. Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies. *FEBS Letters* 1997; 414: 521-526.
- Glockshuber R, Malia M, Pfitzinger I, Pluckthun A. A comparison of strategies to stabilize immunoglobulin Fv fragments. *Biochemistry.* 1990; 29: 1362-1367.
- 20 Greil J, Gramatzki M, Burger R, Marschalek R, Peltner M, Trautmann U, Hansen-Hagge TE, Bartram CR, Fey GH, Stehr K, *et al.* The acute lymphoblastic leukaemia cell line SEM with t(4;11) chromosomal rearrangement is biphenotypic and responsive to interleukin-7. *Br J Haematol.* 1994; 86(2): 275-83.
- 25 Grossbard ML, Press OW, Appelbaum FR, Bernstein ID, Nadler LM. Monoclonal antibody-based therapies of leukemia and lymphoma. *Blood.* 1992; 80: 863-878.
- Haagen IA, van deGriend R, Clark M, Geerars A, Bast B, deGast B. Killing of human leukaemia/lymphoma B cells by activated cytotoxic T lymphocytes in the presence of a bispecific monoclonal antibody ( $\alpha$ -CD3/ $\alpha$ -CD19). *Clin. Exp. Immunol.* 1992; 90: 368-375.
- 30 Hale G, Dyer MJ, Clark MR, Phillips JM, Marcus R, Riechmann L, Winter G, Waldmann H. Remission induction in non-Hodgkin lymphoma with reshaped human monoclonal antibody CAMPATH-1H. *Lancet.* 1988; 2: 1394-1399.
- 35 Hamann PR, Hinman LM, Beyer CF, Lindh D, Upeslaci J, Flowers DA, Bernstein I. An anti-CD33 antibody-calicheamicin conjugate for treatment of acute myeloid leukemia. Choice of linker. *Bioconjug Chem.* 2002; 13: 40-46.
- 40 Harlow y Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988.
- Harlow y Lane "Using Antibodies: A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999.
- 45 Hartmann F, Renner C, Jung W, Deisting C, Juwana M, Eichentopf B, Kloft M, Pfreundschuh M. Treatment of refractory Hodgkin's disease with an anti-CD16/CD30 bispecific antibody. *Blood.* 1997; 89: 2042-2047.
- Hekman A, Honselaar A, Vuist WM, Sein JJ, Rodenhuis S, ten Bokkel Huinink WW, Somers R, Rumke P, Melief CJ. Initial experience with treatment of human B cell lymphoma with anti-CD19 monoclonal antibody. *Cancer Immunol Immunother.* 1991; 32: 364-372.
- 50 Hombach A, Jung W, Pohl C, Renner C, Sahin U, Schmits R, Wolf J, Kapp U, Diehl V, Pfreundschuh M. A CD16/CD30 bispecific monoclonal antibody induces lysis of Hodgkin's cells by unstimulated natural killer cells *in vitro* and *in vivo*. *Int J Cancer.* 1993; 55: 830-836.
- 55 Hosen N, Park CY, Tatsumi N, Oji Y, Sugiyama H, Gramatzki M, Krensky AM, Weissman IL. CD96 is a leukemic stem cell-specific marker in human acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007, 104(26): 11008-13.
- Hrusak O y Porwit-MacDonald A. Antigen expression patterns reflecting genotype of acute leukaemias. *Leukemia.* 2002; 16(7): 1233-1258.
- 60 Jin L, Hope KJ, Zhai Q, Smadja-Joffe F, Dick JE. Targeting of CD44 eradicates human myeloid leukemic stem cells. *Nat. Med.* 2006; 12(10): 1167-74.
- 65 Kabat EA, Wu TT. Identical V region amino acid sequences and segments of sequences in antibodies of different specificities. Relative contributions of VH and VL genes, minigenes, and complementarity-determining regions to binding of antibody-combining sites. *J Immunol.* 1991; 147: 1709-1719.

- 5 Kaminski MS, Zasadny KR, Francis IR, Milik AW, Ross CW, Moon SD, Crawford SM, Burgess JM, Petry NA, Butchko GM, *et al.* Radioimmunotherapy of B-cell lymphoma with [131I]anti-B1 (anti-CD20) antibody. *N Engl J Med.* 1993; 329: 459-465.
- 10 Kipriyanov SM, Moldenhauer G, Strauss G y Little M. Bispecific CD3XCD19 diabody for T cell-mediated lysis of malignant human B cells. *Int. J. Cancer.* 1998; 77: 763-772.
- 15 Kipriyanov SM, Cochlovius B, Schafer HJ, Moldenhauer G, Bahre A, Le Gall F, Knackmuss S, Little M. Synergistic antitumor effect of bispecific CD19 x CD3 and CD19 x CD16 diabodies in a preclinical model of non-Hodgkin's lymphoma. *J Immunol.* 2002; 169: 137-144.
- 20 Kребber A, Bornhauser S, Burmester J, Honegger A, Willuda J, Bosshard HR, Pluckthun A. Reliable cloning of functional antibody variable domains from hybridomas and spleen cell repertoires employing a reengineered phage display system. *J Immunol Methods.* 1997; 201(1): 35-55.
- 25 Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227(5259): 680-5.
- 30 Lang P, Handgretinger R, Niethammer D, Schlegel PG, Schumm M, Greil J, Bader P, Engel C, Scheel-Walter H, Eyrich M, Klingebiel T. Transplantation of highly purified CD34+ progenitor cells from unrelated donors in pediatric leukemia. *Blood.* 2003; 101: 1630-1636.
- 35 Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA, Dick JE. *Nature.* 1994; 367 (6464): 645-8.
- 40 Lazar GA, Dang W, Karki S, Vafa O, Peng JS, Hyun L, Chan C, Chung HS, Eivazi A, Yoder SC, Vielmetter J, Carmichael DF, Hayes RJ, Dahiyat BI. Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006; 103: 4005-4010.
- 45 Legras S, Gunthert U, Stauder R, Curt F, Oliferenko S, Kluin-Nelemans HC, Marie JP, Proctor S, Jasmin C, Smadja-Joffe F. A strong expression of CD44-6v correlates with shorter survival of patients with acute myeloid leukemia. *Blood.* 1998; 91: 3401-3413.
- 50 Leonard JP, Coleman M, Ketas JC, Chadburn A, Ely S, Furman RR, Wegener WA, Hansen HJ, Ziccardi H, Eschenberg M, Gayko U, Cesano A, Goldenberg DM. Phase I/II trial of epratuzumab (humanized anti-CD22 antibody) in indolent non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol.* 2003; 21: 3051-3059.
- 55 Loffler A, Kufer P, Lutterbuse R, Zettl F, Daniel PT, Schwenkenbecher JM, Riethmuller G, Dorken B, Bargou RC. A recombinant bispecific single-chain antibody, CD19 x CD3, induces rapid and high lymphoma-directed cytotoxicity by unstimulated T lymphocytes. *Blood.* 2000; 95: 2098-2103.
- 60 McCall, A.M., Shahied, L., Amoroso, A.R., Horak, E.M., Simmons, H.H., Nielson, U., Adams, G.P., Schier, R., Marks, J.D. y Weiner, L.M. (2001) Increasing the affinity for tumor antigen enhances bispecific antibody cytotoxicity. *J Immunol,* 166, 6112-6117.
- 65 Messinger Y, Yanishevski Y, Ek O, Zeren T, Waurzyniak B, Gunther R, Chelstrom L, Chandan-Langlie M, Schneider E, Myers DE, Evans W, Uckun FM. *In vivo* toxicity and pharmacokinetic features of B43 (anti-CD19)-genistein immunoconjugate in nonhuman primates. *Clin Cancer Res.* 1998; 4: 165-170.
- Murphy G, Cockett MI, Ward RV y Docherty AJ. Matrix metalloproteinase degradation of elastin, type IV collagen and proteoglycan. A quantitative comparison of the activities. *Biochem J.* 1991; 277: 277-279.
- Onrust SV, Lamb HM, Balfour JA. Rituximab. *Drugs.* 1999; 58: 79-88; discussion 89-90.
- Owens GC., Chappell SA., Mauro VP. y Edelman GM. Identification of two short internal ribosome entry sites selected from libraries of random oligonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001; 98(4): 1471-1476.
- Pantoliano MW, Bird RE, Johnson S, Asel ED, Dodd SW, Wood JF, Hardman KD. Conformational stability, folding, and ligand-binding affinity of single-chain Fv immunoglobulin fragments expressed in *Escherichia coli*. *Biochemistry.* 1991; 30: 10117-10125.
- Passegue E, Jamieson, CHM, Ailles LE, Weissman IL. Normal and leukemic hematopoiesis: Are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100 (supl.1) 11842-49.

- Peipp M, Valerius T. Bispecific antibodies targeting cancer cells. *Biochem Soc Trans.* 2002; 30: 507-511.
- Peipp M, Kupers H, Saul D, *et al.* A recombinant CD7-specific single-chain immunotoxin is a potent inducer of apoptosis in acute leukemic T cells. *Cancer Res.* 2002; 62: 2848-2855.
- 5 Pietersz GA, Wenjun L, Sutton VR, Burgess J, McKenzie IF, Zola H, Trapani JA. *In vitro* and *in vivo* antitumor activity of a chimeric anti-CD19 antibody. *Cancer Immunol Immunother.* 1995; 41: 53-60.
- Ravetch JV, Kinet JP. Fc receptors. *Annu Rev Immunol.* 1991; 9: 457-492.
- 10 Reff ME, Carner K, Chambers KS, Chinn PC, Leonard JE, Raab R, Newman RA, Hanna N, Anderson DR. Depletion of B cells *in vivo* by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood.* 1994; 83: 435-445.
- Reiter Y, Brinkmann U, Kreitman RJ, Jung SH, Lee B y Pastan I. Stabilization of the Fv Fragments in Recombinant Immunotoxins by Disulfide Bonds Engineered into Conserved Framework Regions. *Biochemistry.* 1994; 33: 5451-5459.
- 15 Riechmann L, Clark M, Waldmann H, Winter G. Reshaping human antibodies for therapy. *Nature.* 1988; 332: 323-327. Sambrook, *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (2001) N.Y.
- 20 Schwemmlin M, Stieglmaier J, Kellner C, Peipp M, Saul D, Oduncu F, Emmerich B, Stockmeyer B, Lang P, Beck JD, Fey GH. A CD19-specific single-chain immunotoxin mediates potent apoptosis of B-lineage leukemic cells. *Leukemia.* 2007; 21: 1405-1412.
- 25 Schwenkert M, Birkholz K, Schwemmlin M, Kellner C, Kügler M, Peipp M, Nettelbeck D M, Schuler-Thurner B, Schaft N, Dörrie J, Ferrone S, Kämpgen E, Fey GH. A single chain immunotoxin, targeting the melanoma associated chondroitin sulfate proteoglycan, is a potent inducer of apoptosis in cultured human melanoma cells. *Melanoma Res.* 2008; 18(2): 73-84.
- 30 Segal DM, Weiner GJ, Weiner LM. Bispecific antibodies in cancer therapy. *Curr Opin Immunol.* 1999; 11: 558-562.
- Sievers EL, Appelbaum FR, Spielberger RT, Forman SJ, Flowers D, Smith FO, Shannon-Dorcy K, Berger MS, Bernstein ID. Selective ablation of acute myeloid leukemia using antibody-targeted chemotherapy: a phase I study of an anti-CD33 calicheamicin immunoconjugate. *Blood.* 1999; 93: 3678-3684.
- 35 Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science.* 1988; 241: 58-62.
- 40 Stemmer WP, Morris SK, Wilson BS. Selection of an active single chain Fv antibody from a protein linker library prepared by enzymatic inverse PCR. *Biotechniques.* 1993; 14: 256-265.
- Stork R, Zettlitz KA, Müller D, Rether M, Hanisch FG, Kontermann RE. N-Glycosylation as Novel Strategy to Improve Pharmacokinetic Properties of Bispecific Single-chain Diabodies. *J Biol Chem.* 2008; 283(12): 7804-12.
- 45 Tan BT, Park CY, Ailles E, Weissman IL. The cancer stem cell hypothesis: a work in progress. *Lab Invest.* 2006; 86: 1203-7.
- 50 Taussig DC, Pearce DJ, Simpson C, Rohatiner AZ, Lister TA, Kelly G, Luongo JL, Danet-Desnoyers GH, Bonnet D. Hematopoietic stem cells express multiple myeloid markers: implications for the origin and targeted therapy of acute myeloid leukemia. *Blood.* 2005; 106(13): 4086-92.
- Vallera DA, Elson M, Brechbiel MW, Dusenbery KE, Burns LJ, Jaszcz WB, Ramsay NK, Panoskaltis-Mortar A, Kuroki DW, Wagner JE, Vitetta ES, Kersey JH. Radiotherapy of CD19 expressing Daudi tumors in nude mice with Yttrium-90-labeled anti-CD19 antibody. *Cancer Biother Radiopharm.* 2004; 19: 11-23.
- 55 van de Winkel JG, Anderson CL. Biology of human immunoglobulin G Fc receptors. *J Leukoc Biol.* 1991; 49: 511-524.
- 60 van Rhenen A, van Dongen GAM, Kelder A1, Rombouts EJ, Feller N, Moshaver B, Stigter-van Walsum M, Zweegman S, Ossenkoppele GJ, Gerrit, Schuurhuis GJ. The novel AML stem cell-associated antigen CLL-1 aids in discrimination between normal and leukemic stem cells. *Blood,* 2007; 110, 7: 2659-2666.
- 65 Vervoordeldonk SF, Merle PA, van Leeuwen EF, von dem Borne AE, Slaper-Cortenbach IC. Preclinical studies with radiolabeled monoclonal antibodies for treatment of patients with B-cell malignancies. *Cancer.* 1994; 73: 1006-1011.

Weiner GJ, De Gast GC. Bispecific monoclonal antibody therapy of B-cell malignancy. *Leuk Lymphoma*. 1995; 16: 199-207.

5 Weiner LM, Holmes M, Richeson A, Godwin A, Adams GP, Hsieh-Ma ST, Ring DB, Alpaugh RK. Binding and cytotoxicity characteristics of the bispecific murine monoclonal antibody 2B1. *J Immunol*. 1993; 151: 2877-2886.

Weng WK, Levy R. Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma. *J Clin Oncol*. 2003; 21: 3940-3947.

## REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido, en el que el polipéptido consiste en:
- 5 (a) un primer dominio de inmunoglobulina que consiste en un dominio VL unido a un dominio VH, en el que el dominio de inmunoglobulina se une específicamente a un antígeno expresado en células tumorales;
- (b) un segundo dominio de inmunoglobulina que consiste en un dominio VL unido a un dominio VH, en el que el dominio de inmunoglobulina se une específicamente a un antígeno expresado en células tumorales; y
- 10 (c) un tercer dominio de inmunoglobulina que consiste en un dominio VL ligado a un dominio VH, en el que el dominio de inmunoglobulina se une específicamente a un antígeno de célula efectora, en el que la célula efectora se selecciona del grupo que consiste en células NK, células T, granulocitos neutrófilos, monocitos y macrófagos, en el que al menos uno de los antígenos expresado en células tumorales unido por el dominio de inmunoglobulina de (a) o (b) es un antígeno expresado en células madre tumorales y/o en células precursoras o progenitoras tumorales; y
- 15 (d) opcionalmente, al menos un (poli) péptido no relacionado con los dominios de inmunoglobulina;
- y en el que la molécula de ácido nucleico codifica al menos un enlazador que separa al menos un dominio V<sub>H</sub> de uno V<sub>L</sub> o al menos un dominio V<sub>L</sub> de uno V<sub>H</sub>.
- 20 2. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1, en la que los dominios de inmunoglobulina de los elementos (a) y (b) se unen al mismo antígeno expresado en células tumorales.
3. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1, en la que los dominios de inmunoglobulina de los artículos (a) y (b) se unen a diferentes antígenos expresados en células tumorales.
- 25 4. La molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el al menos un antígeno expresado en células madre tumorales o en células precursoras o progenitoras tumorales es CD19, CD33, CD13, CD44var, CD123, CD96 o CLL-1.
- 30 5. La molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que los antígenos expresados en células tumorales y unidos mediante los dominios inmunoglobulina de (a) y (b) son CD19 y CD33, CD19 y CD13, CD19 y CD123, CD19 y CD44var, CD19 y MCSP, CD33 y CD13, CD33 y CD123, CD33 y CD44var, CD33 y CD96, CD33 y CLL-1, CD13 y CD123, CD13 y CD44var, CD13 y CD96, CD13 y CLL-1, CD123 y CD44var, CD123 y CD96, CD123 y CLL-1, CD44var y CD96, CD44var y CLL-1, o CD96 y CLL-1.
- 35 6. La molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el antígeno de célula efectora unido mediante el dominio de inmunoglobulina de (c) es CD16 (FcγRIIIa), CD64 (FcγRI), NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46, CD28, CD2 o CD3.
- 40 7. La molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que al menos un dominio de inmunoglobulina comprende al menos un resto de cisteína capaz de formar enlaces disulfuro intramoleculares.
8. La molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que el enlazador es un enlazador peptídico de al menos 5 aminoácidos.
- 45 9. El ácido nucleico de la reivindicación 8, en el que los enlazadores son de longitud uniforme si está presente más de un enlazador.
10. El ácido nucleico de la reivindicación 8, en el que los enlazadores son de diferente longitud si está presente más de un enlazador.
- 50 11. El ácido nucleico de la reivindicación 9, en el que las secuencias de aminoácidos de los enlazadores son idénticas.
- 55 12. El ácido nucleico de la reivindicación 9, en el que las secuencias de aminoácidos de los enlazadores son diferentes.
13. El ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que codifica dos dominios de inmunoglobulina que se unen específicamente a CD19 y un dominio de inmunoglobulina que se une específicamente a CD16 (FcγRIIIa).
- 60 14. El ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que codifica dos dominios de inmunoglobulina que se unen específicamente a CD33 y un dominio de inmunoglobulina que se une específicamente a CD16 (FcγRIIIa).
- 65 15. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1, en la que el (poli) péptido no relacionado con dominios de

- inmunoglobulina es una etiqueta Strep, una etiqueta His, una etiqueta Myc, una etiqueta Flag, una secuencia líder de secreción kappa, albúmina de suero de humano (hsa) o fragmentos de la misma, péptidos capaces de unirse a hsa o a otras proteínas del suero; un péptido capaz de unirse con el receptor de Fc neonatal (FcRn), aldolasa de músculo humano (hma) o un fragmento de la misma, región bisagra de CD8, Interleucina 2, Interleucina 15, Interleucina 18, Factor Estimulante de Colonias de Macrófagos y Granulocitos (GM-CSF), Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos (G-CSF) o un péptido que proporciona al menos un sitio de N-glicosilación.
- 5 16. La molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en la que las células tumorales son células de leucemia.
- 10 17. La molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en la que las células madre tumorales son células madre leucémicas.
- 15 18. La molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en la que las células precursoras o progenitoras tumorales son células precursoras o progenitoras leucémicas.
19. La molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en la que el tumor es una leucemia o un linfoma.
- 20 20. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19.
21. Un hospedador no humano transformado con el vector de la reivindicación 20.
- 25 22. El hospedador no humano de la reivindicación 21, en el que el hospedador es una célula.
23. Un método para la producción de un polipéptido que comprende el cultivo de la célula hospedadora de la reivindicación 22 en condiciones adecuadas y el aislamiento del polipéptido recombinante producido.
- 30 24. Un polipéptido codificado por la molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19 o producido por el método de la reivindicación 23.
25. Una composición de diagnóstico que comprende al menos uno de
- 35 (a) la molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19  
 (b) el vector de la reivindicación 20 o  
 (c) el polipéptido de la reivindicación 24.
26. Una composición farmacéutica que comprende:
- 40 (a) la molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19  
 (b) el vector de la reivindicación 20 o  
 (c) el polipéptido de la reivindicación 24.
- 45 27. La molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, el vector de la reivindicación 20 o el polipéptido de la reivindicación 24 para uso en el tratamiento de tumores.
28. La molécula de ácido nucleico o el vector o el polipéptido para uso de acuerdo con la reivindicación 27, en el que el tumor es una leucemia o linfoma.
- 50 29. La molécula de ácido nucleico o el vector o el polipéptido para uso de acuerdo con la reivindicación 28, en el que la leucemia es AML, CML, ALL, CLL o linfoma no Hodgkin.

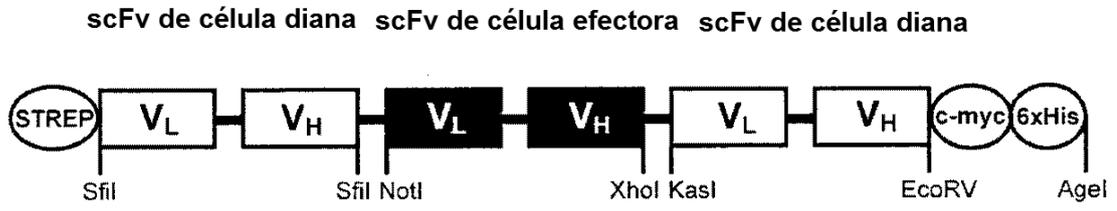


Figura 1

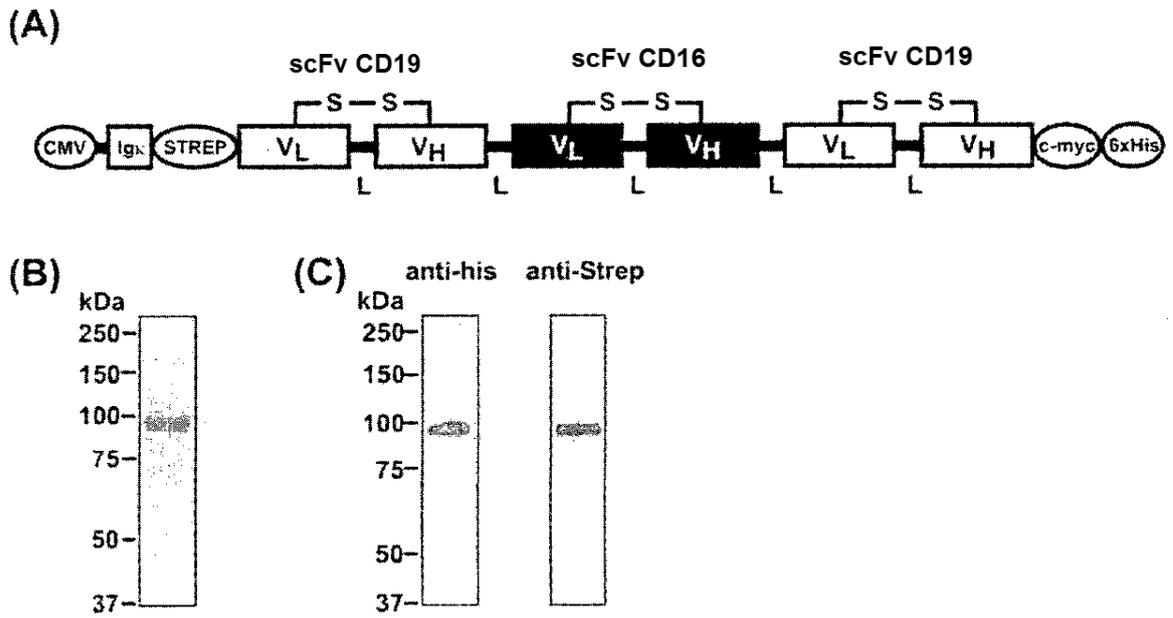


Figura 2

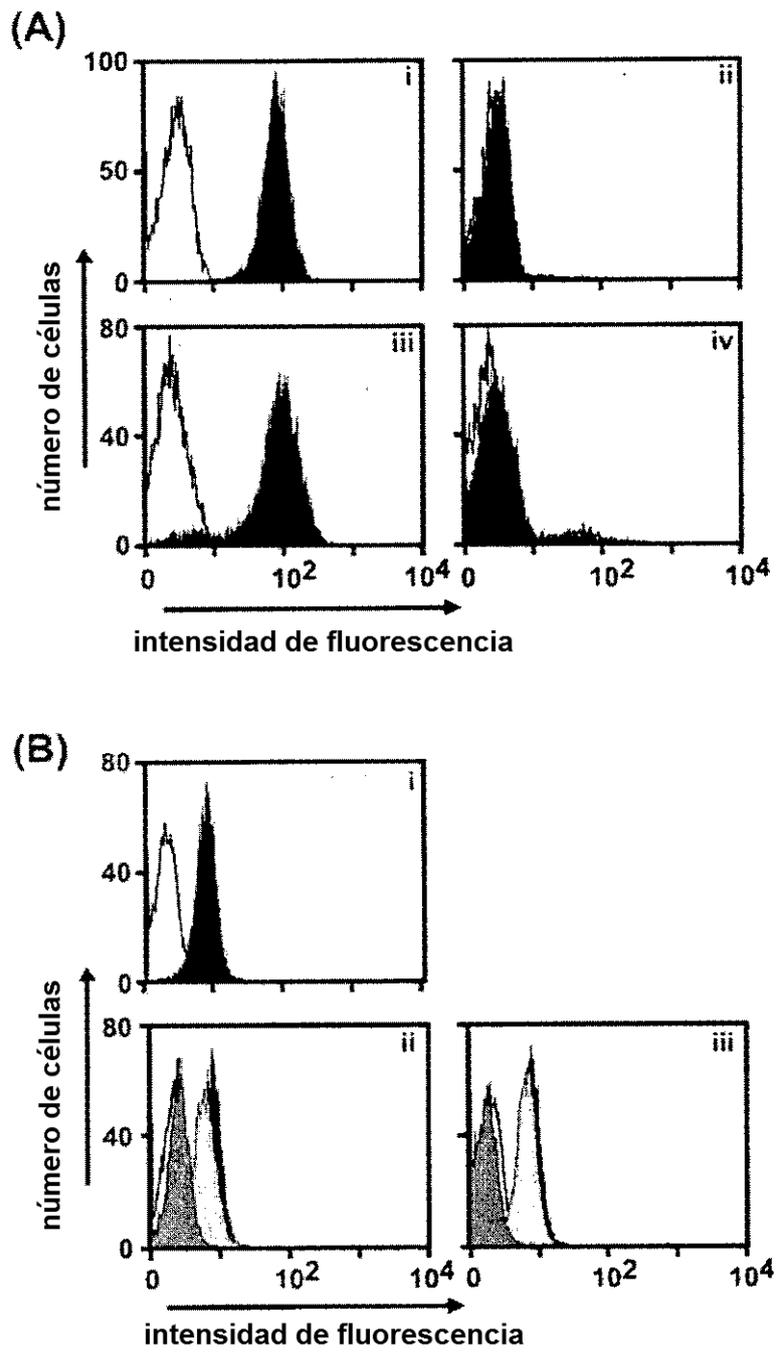


Figura 3

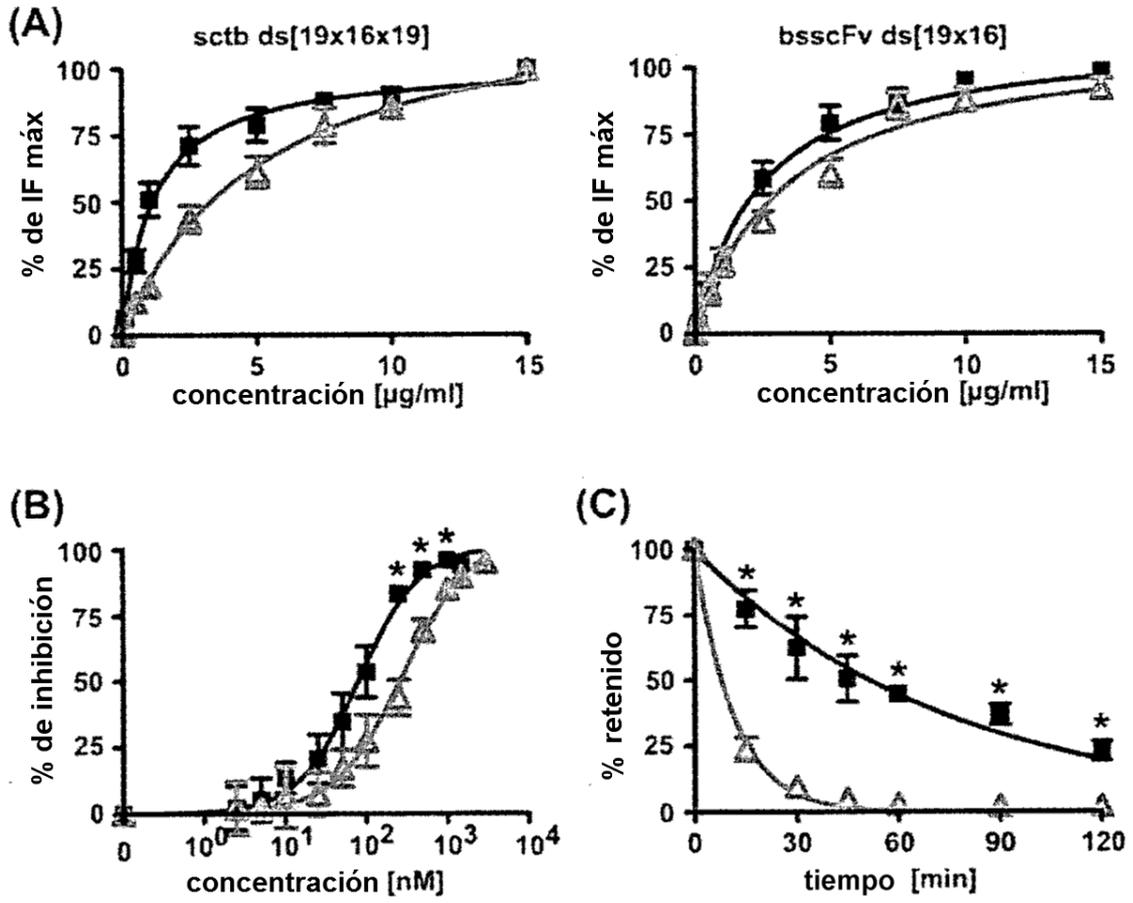


Figura 4

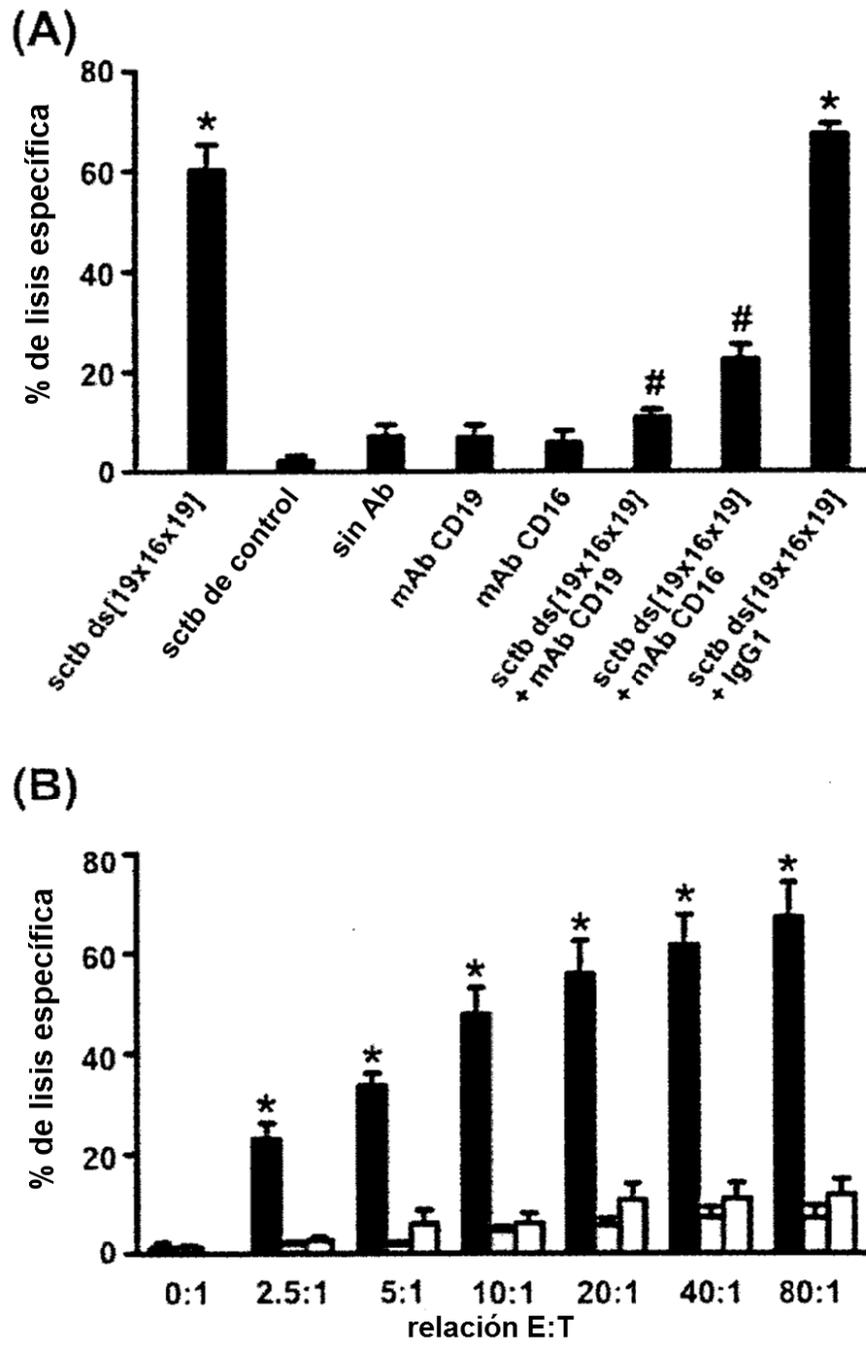


Figura 5

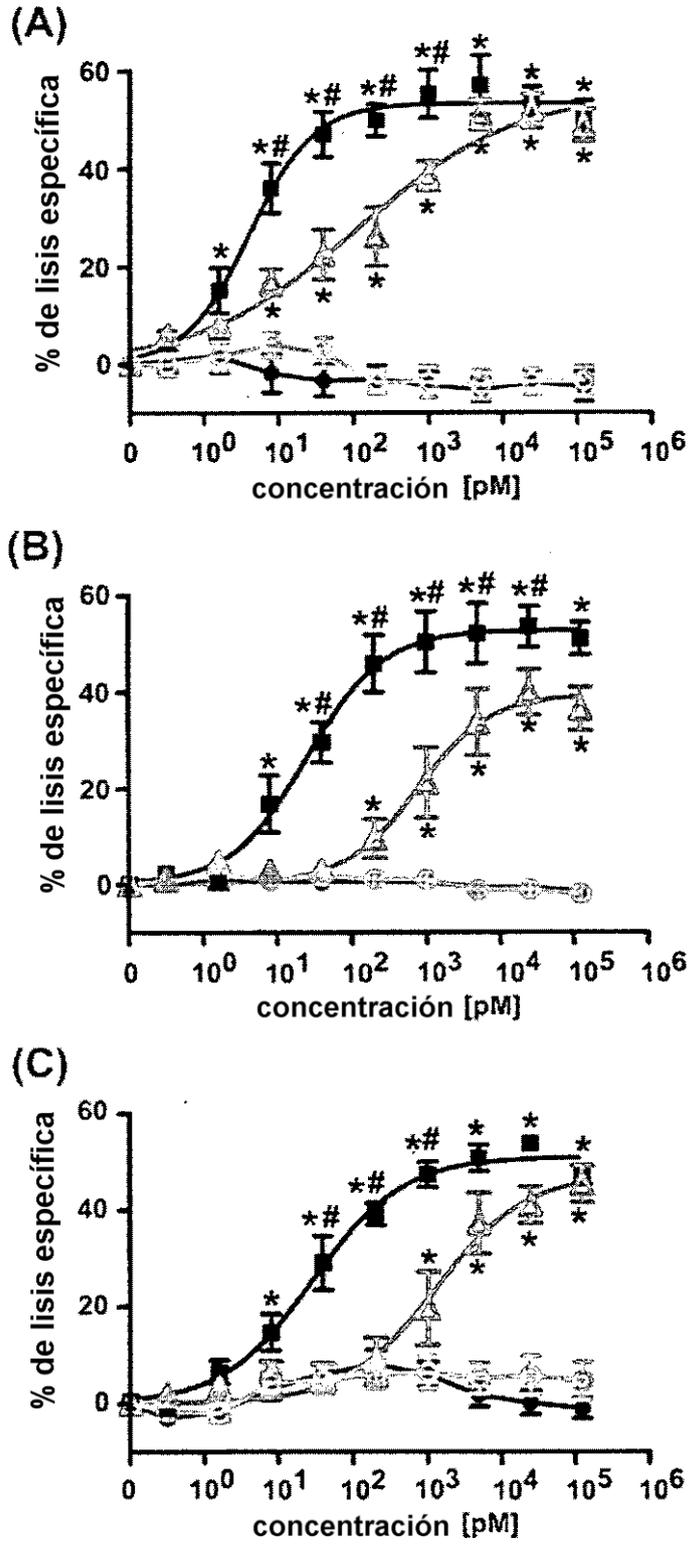


Figura 6

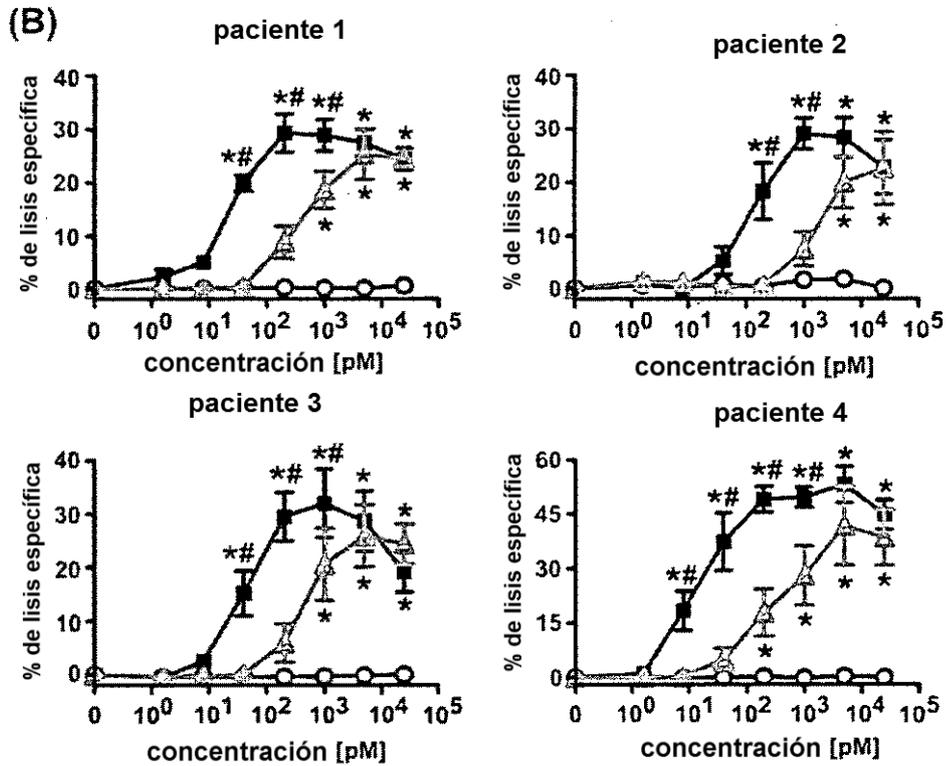
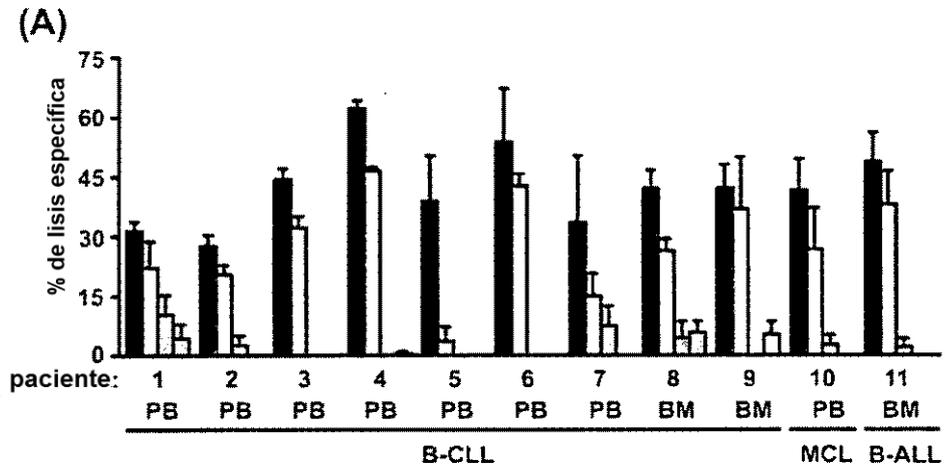


Figura 7

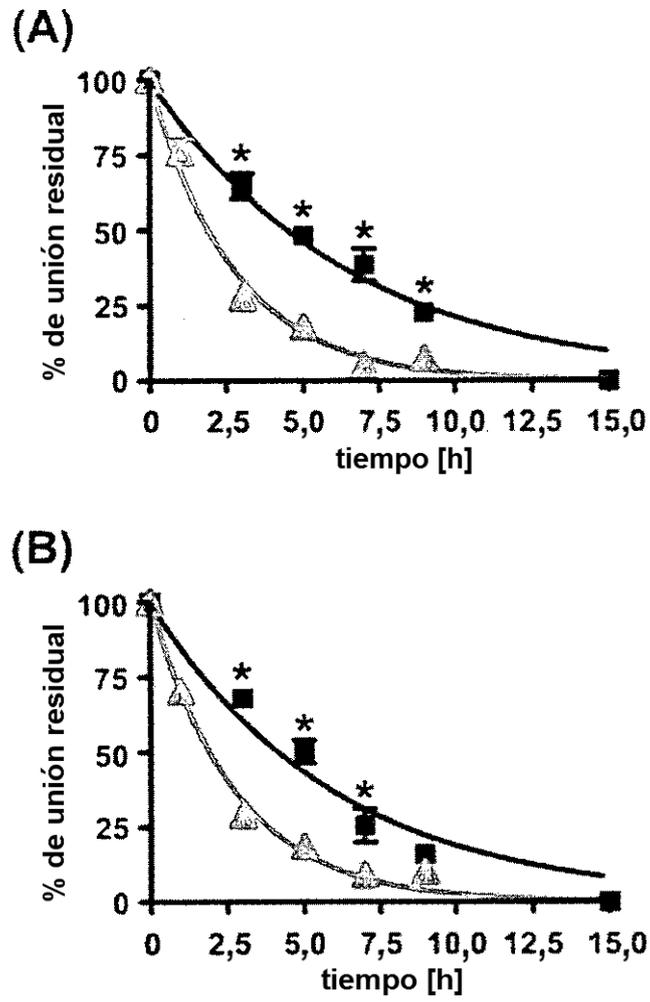


Figura 8

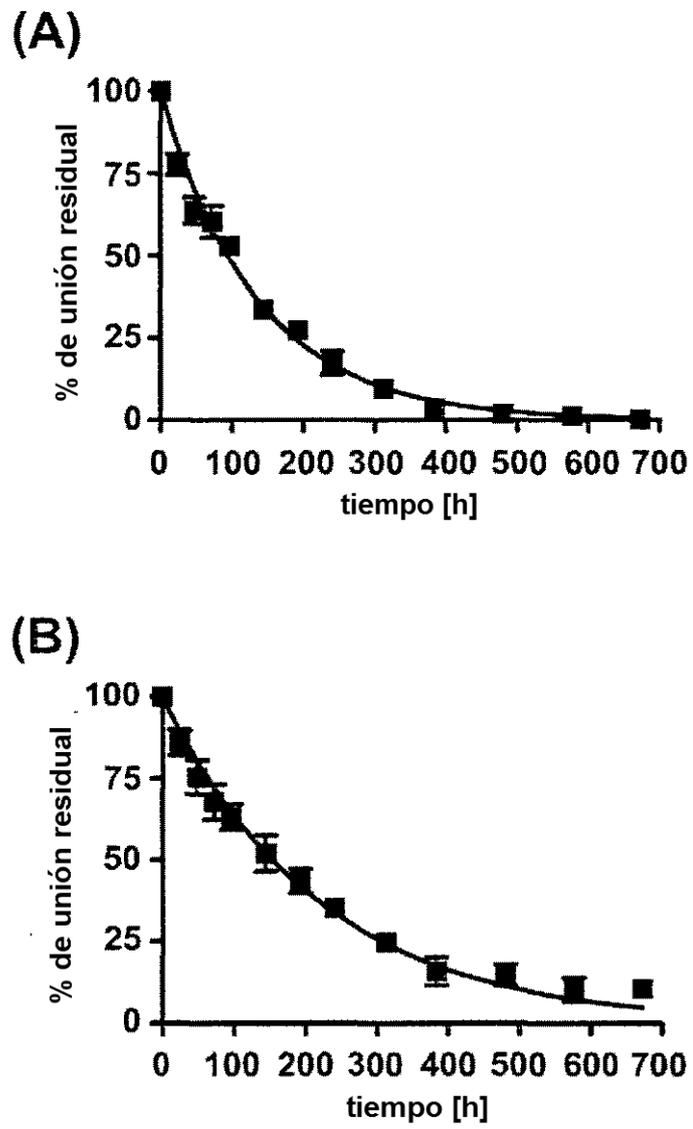


Figura 9

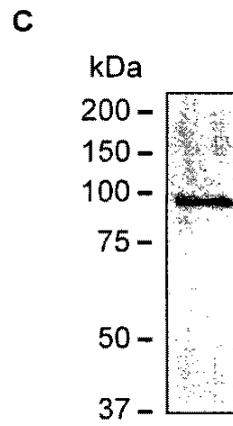
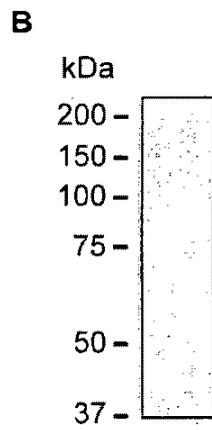
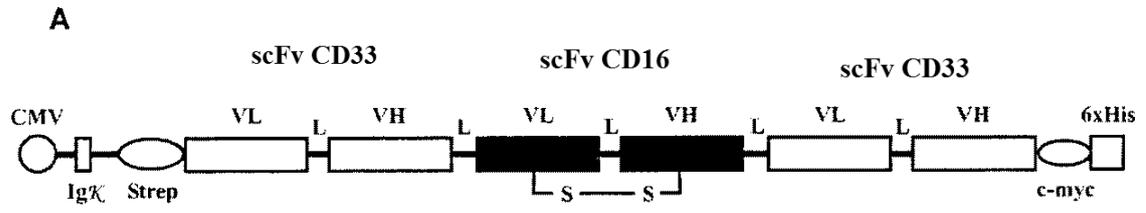


Figura 10

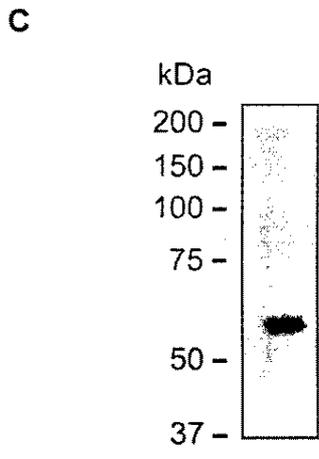
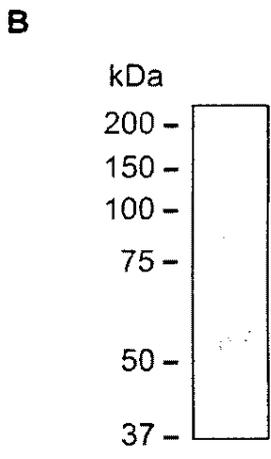
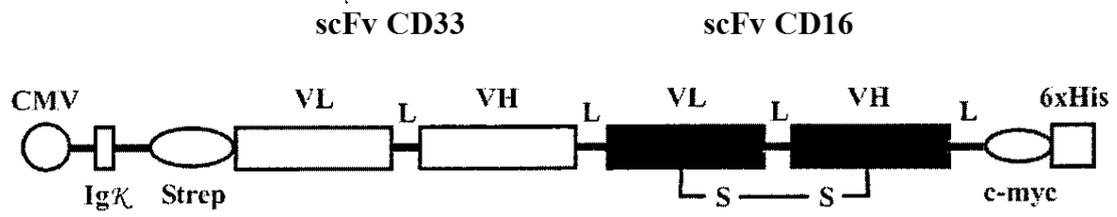


Figura 11

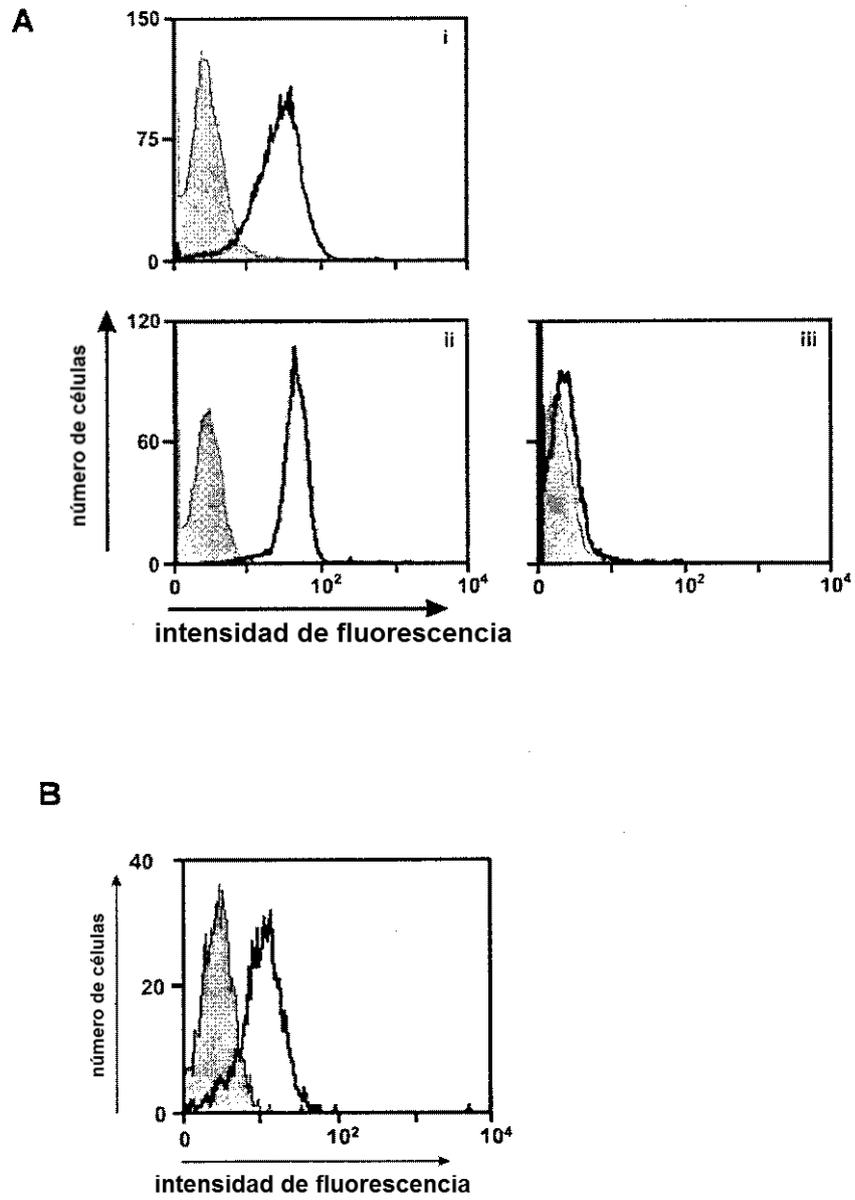


Figura 12

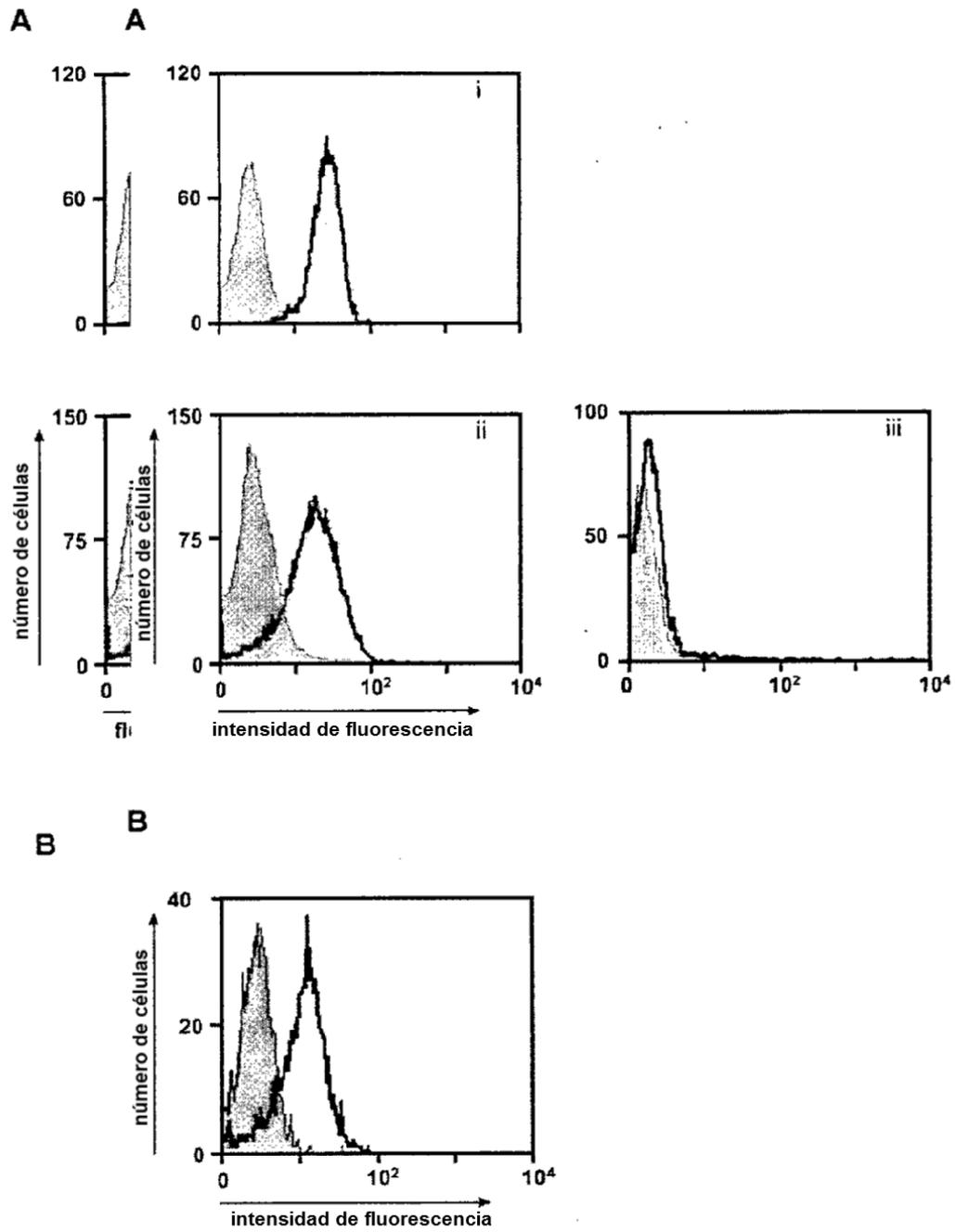


Figura 13

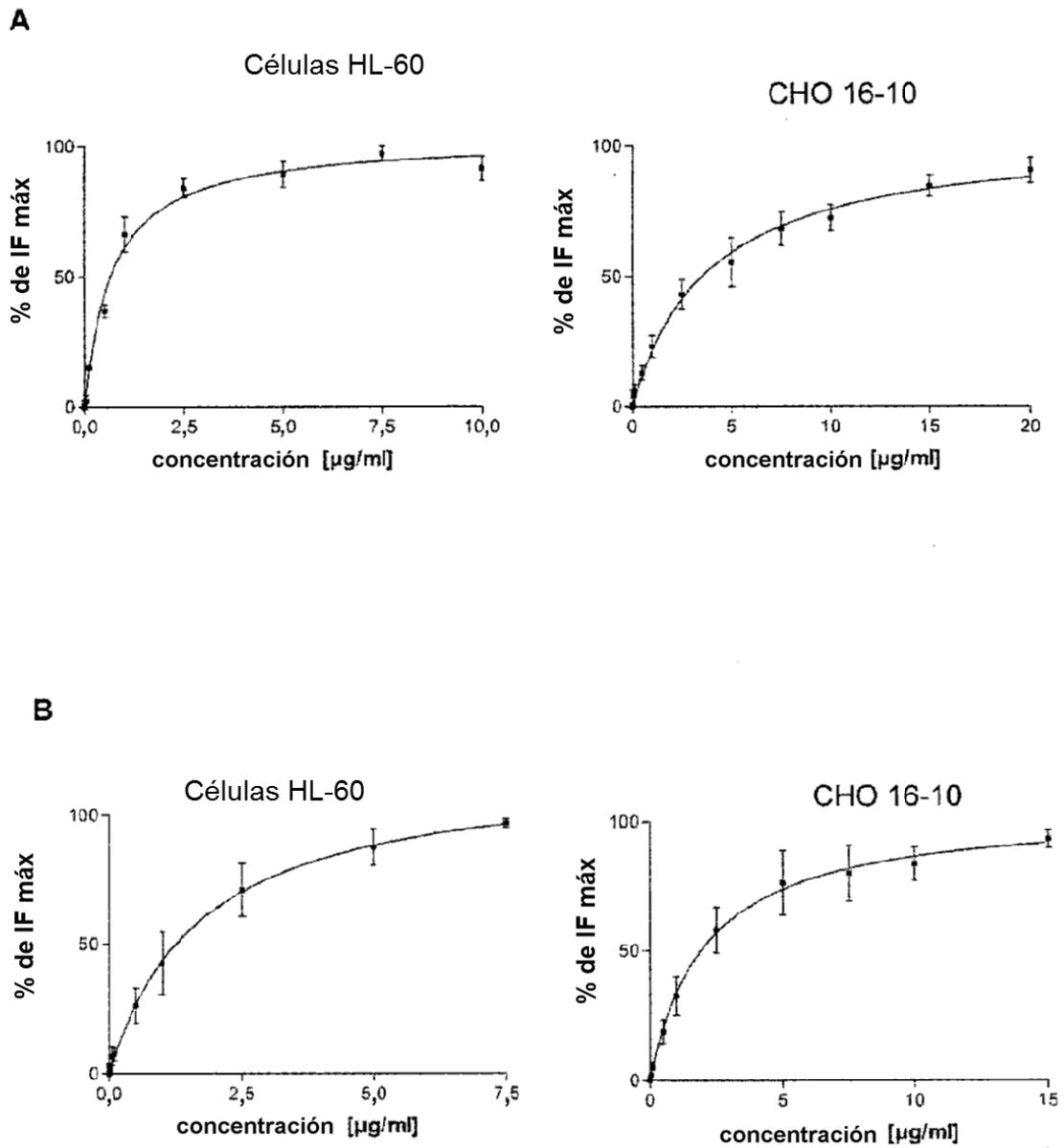


Figura 14

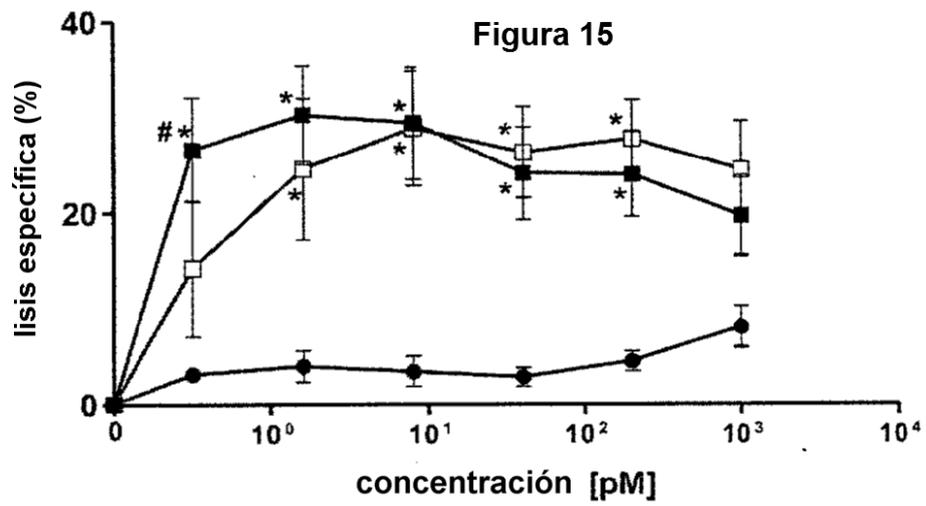
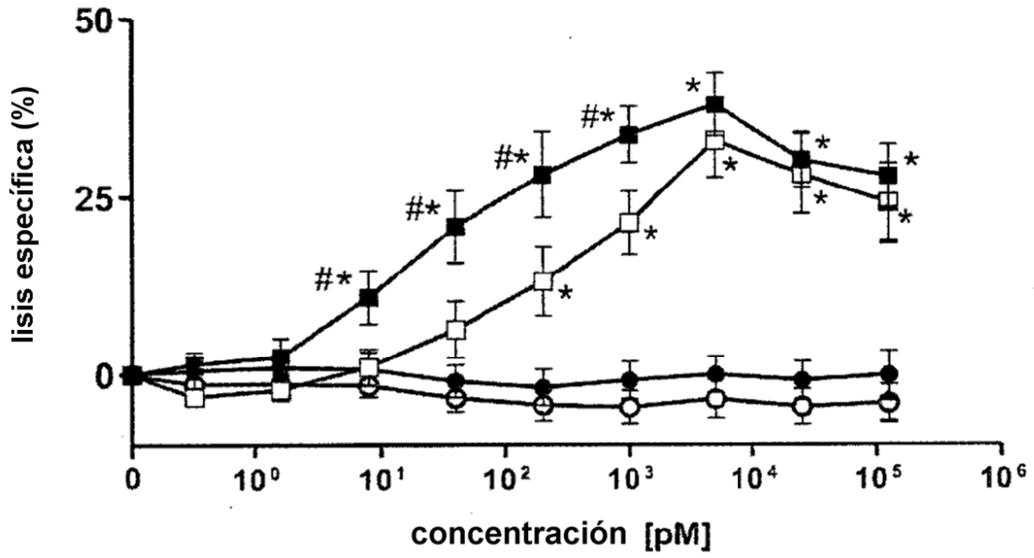


Figura 16

## REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

La lista de referencias citadas por el solicitante es, únicamente, para conveniencia del lector. No forma parte del documento de patente europea. Si bien se ha tenido gran cuidado al compilar las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP declina toda responsabilidad a este respecto.

5

### Documentos de patente citados en la descripción

- EP 1314741 A [0005]

### Literatura no patente citada en la descripción

- **BRAASCH ; COREY.** *Chem Biol*, 2001, vol. 8, 1 [0009]
- **SAMBROOK ; RUSSELL.** *Molecular Cloning, A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, 2001 [0011]
- **AUSUBEL.** *Current Protocols in Molecular Biology.* Green Publishing Associates and Wiley Interscience, 1989 [0011]
- **Nucleic acid hybridization, a practical approach.** IRL Press, 1985 [0011]
- **AUSUBEL.** *Current Protocols in Molecular Biology.* Green Publishing Associates and Wiley Interscience, 2001 [0106]
- **ADAMS GP ; SCHIER R ; MCCALL AM ; CRAWFORD RS ; WOLF EJ ; WEINER LM ; MARKS JD.** Prolonged in vivo tumour retention of a human diabody targeting the extracellular domain of human HER2/neu. *Br J Cancer.*, 1998, vol. 77, 1405-1412 [0106]
- **BARBIN K ; STIEGLMAIER J ; SAUL D ; STIEGLMAIER K ; STOCKMEYER B ; PFEIFFER M ; LANG P ; FEY GH.** Influence of variable N-glycosylation on the cytolytic potential of chimeric CD19 antibodies. *J Immunother*, 1997, vol. 29, 122-133 [0106]
- **BATRA JK ; KASPRZYK PG ; BIRD RE ; PASTANI I ; KING CR.** Recombinant anti-erbB2 immunotoxins containing Pseudomonas exotoxin. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 1992, vol. 89, 5867-5871 [0106]
- **BEBBINGTON CR ; RENNER G ; THOMSON S ; KING D ; ABRAMSD ; YARRANTON GT.** High-level expression of a recombinant antibody from myeloma cells using a glutamine synthetase gene as an amplifiable selectable marker. *BioTechnology*, 1992, vol. 10, 169-175 [0106]
- **BENEDICT CA ; MACKRELL AJ ; ANDERSON WF.** Determination of the binding affinity of an anti-CD34 single-chain antibody using a novel, flow cytometry based assay. *J Immunol Methods*, 1997, vol. 201 (2), 223-31 [0106]
- **BONNET D ; DICK JE.** Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med.*, 1997, vol. 3 (7), 730-7 [0106]
- **BRAASCH DA ; COREY DR.** Locked nucleic acid (LNA): fine-tuning the recognition of DNA and RNA. *Chem Biol.*, 2001, vol. 8 (1), 1-7 [0106]
- **BRINKMANN U ; LEE BK ; PASTANI.** Recombinant Immunotoxins Containing the VH or VL Domain of Monoclonal Antibody B3 fused to Pseudomonas Exotoxin. *J. Immunology*, 1993, vol. 150, 2774-2782 [0106]
- **BRUENKE J ; BARBIN K ; KUNERT S ; LANG P ; PFEIFFER M ; STIEGLMAIER K ; NIETHAMMER D ; STOCKMEYER B ; PEIPP M ; REPP R.** Effective lysis of lymphoma cells with a stabilised bispecific single-chain Fv antibody against CD19 and FcγRIII (CD16). *British Journal of Haematology*, 2005, vol. 130, 218-228 [0106]
- **BRUENKE J ; FISCHER B ; BARBIN K ; SCHREITER K ; WACHTER Y ; MAHR K ; TITGEMEYER F ; NIEDERWEIS M ; PEIPP M ; ZUNINO SJ.** A recombinant bispecific single-chain Fv antibody against HLA class II and FcγRIII (CD16) triggers effective lysis of lymphoma cells. *Brit J Haematol.*, 2004, vol. 125 (2), 167-79 [0106]
- **BRYDER D ; ROSSI DJ ; WEISSMAN IL.** Hematopoietic Stem Cells. *Am J Pathol.*, 2006, vol. 169 (2), 338-46 [0106]
- **CARNAHAN J ; WANG P ; KENDALL R ; CHEN C ; HU S ; BOONE T ; JUAN T ; TALVENHEIMO J ; MONTESTRUQUE S ; SUN J.** Epratuzumab, a humanized monoclonal antibody targeting CD22: characterization of in vitro properties. *Clin Cancer Res.*, 2003, vol. 9, 3982S-3990S [0106]
- **CARTRON G ; DACHEUX L ; SALLES G ; SOLAL-CELIGNY P ; BARDOS P ; COLOMBAT P ; WATIER H.** Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene. *Blood*, 2002, vol. 99, 754-758 [0106]
- **CASASNOVAS RO ; SLIMANE FK ; GARANT R ; FAURE GC ; CAMPOS L ; DENEYS V ; BERNIER M ; FALKENRODT A ; LECALVEZ G ; MAYNADIE M.** Immunological classification of acute myeloplasic leukaemias: relevance to patient outcome. *Leukemia*, 2003, vol. 17, 515-527 [0106]

10

- **CASTOR A ; NILSSON L ; ASTRAND-GRUNDSTROM I ; BUITENHUIS M ; RAMIREZ C ; ANDERSON K ; STROMBECK B ; GARWICZ S ; BEKASSY AN ; SCHMIEGELOW K.** Distinct patterns of hematopoietic stem cell involvement in acute lymphoblastic leukemia. *Nat Med.*, 2005, vol. 11, 630-637 [0106]
- **CHEUNG MC ; HAYNES AE ; STEVENS A ; MEYER RM ; IMRIE K.** Yttrium 90 ibritumomab tiuxetan in lymphoma. *Leuk Lymphoma*, 2006, vol. 47, 967-977 [0106]
- **CLYNES RA ; TOWERS TL ; PRESTA LG ; RAVETCH JV.** Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med.*, 2000, vol. 6, 443-446 [0106]
- **DAVIES AJ.** Radioimmunotherapy for B-cell lymphoma: Y90 ibritumomab tiuxetan and I(131) tositumomab. *Oncogene*, 2007, vol. 26, 3614-3628 [0106]
- **DE PALAZZO IG ; KITSON J ; GERCEL-TAYLOR C ; ADAMS S ; WEINER LM.** Bispecific monoclonal antibody regulation of Fc gamma RIII-directed tumor cytotoxicity by large granular lymphocytes. *Cell Immunol.*, 1992, vol. 142, 338-347 [0106]
- **ELSASSER D ; VALERIUS T ; REPP R ; WEINER GJ ; DEO Y ; KALDEN JR ; VAN DE WINKEL JG ; STEVENSON GT ; GLENNIE MJ ; GRAMATZKI M.** HLA class II as potential target antigen on malignant B cells for therapy with bispecific antibodies in combination with granulocyte colony-stimulating factor. *Blood*, 1996, vol. 87, 3803-12 [0106]
- **ELY P ; WALLACE PK ; GIVAN AL ; GRAZIANO RF ; GUYRE PM ; FANGER MW.** Bispecific-armed, interferon gamma-primed macrophage-mediated phagocytosis of malignant non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*, 1996, vol. 87, 3813-3821 [0106]
- **EYRICH M ; LANG P ; LAL S ; BADER P ; HANDGRETINGER R ; KLINGEBIEL T ; NIETHAMMER D ; SCHLEGEL PG.** A prospective analysis of the pattern of immune reconstitution in a paediatric cohort following transplantation of positively selected human leucocyte antigen-disparate haematopoietic stem cells from parental donors. *Br J Haematol.*, 2001, vol. 114, 422-432 [0106]
- **GHAHROUDI MA ; DESMYTER A ; WYNSL ; HAMERS R ; MUYLDERMANS S.** Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies. *FEBS Letters*, 1997, vol. 414, 521-526 [0106]
- **GLOCKSHUBER R ; MALIA M ; PFITZINGER I ; PLUCKTHUN A.** A comparison of strategies to stabilize immunoglobulin Fv-fragments. *Biochemistry*, 1990, vol. 29, 1362-1367 [0106]
- **GREIL J ; GRAMATZKI M ; BURGER R ; MARSCHALEK R ; PELTNER M ; TRAUTMANN U ; HANSEN-HAGGE TE ; BARTRAM CR ; FEY GH ; STEHR K et al.** The acute lymphoblastic leukaemia cell line SEM with t(4;11) chromosomal rearrangement is biphenotypic and responsive to interleukin-7. *Br J Haematol.*, 1994, vol. 86 (2), 275-83 [0106]
- **GROSSBARD ML ; PRESS OW ; APPELBAUM FR ; BERNSTEIN ID ; NADLER LM.** Monoclonal antibody-based therapies of leukemia and lymphoma. *Blood*, 1992, vol. 80, 863-878 [0106]
- **HAAGEN IA ; VAN DEGRIEND R ; CLARK M ; GEERARS A ; BAST B ; DEGAST B.** Killing of human leukaemia/lymphoma B cells by activated cytotoxic T lymphocytes in the presence of a bispecific monoclonal antibody ( $\alpha$ -CD3/ $\alpha$ -CD19). *Clin. Exp. Immunol.*, 1992, vol. 90, 368-375 [0106]
- **HALE G ; DYER MJ ; CLARK MR ; PHILLIPS JM ; MARCUS R ; RIECHMANN L ; WINTER G ; WALDMANN H.** Remission induction in non-Hodgkin lymphoma with reshaped human monoclonal antibody CAMPATH-1H. *Lancet*, 1988, vol. 2, 1394-1399 [0106]
- **HAMANN PR ; HINMAN LM ; BEYER CF ; LINDH D ; UPESLACIS J ; FLOWERS DA ; BERNSTEIN I.** An anti-CD33 antibody-calicheamicin conjugate for treatment of acute myeloid leukemia. Choice of linker. *Bioconjug Chem.*, 2002, vol. 13, 40-46 [0106]
- **HARLOW ; LANE.** Antibodies, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988 [0106]
- **HARLOW ; LANE.** Using Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999 [0106]
- **HARTMANN F ; RENNER C ; JUNG W ; DEISTING C ; JUWANA M ; EICHENTOPF B ; KLOFT M ; PFREUNDSCHUH M.** Treatment of refractory Hodgkin's disease with an anti-CD16/CD30 bispecific antibody. *Blood*, 1997, vol. 89, 2042-2047 [0106]
- **HEKMAN A ; HONSELAAR A ; VUIST WM ; SEIN JJ ; RODENHUIS S ; TEN BOKKEL HUIJINK WW ; SOMERS R ; RUMKE P ; MELIEF CJ.** Initial experience with treatment of human B cell lymphoma with anti-CD19 monoclonal antibody. *Cancer Immunol Immunother*, 1991, vol. 32, 364-372 [0106]
- **HOMBACH A ; JUNG W ; POHL C ; RENNER C ; SAHIN U ; SCHMITS R ; WOLF J ; KAPP U ; DIEHL V ; PFREUNDSCHUH M.** A CD16/CD30 bispecific monoclonal antibody induces lysis of Hodgkin's cells by unstimulated natural killer cells in vitro and in vivo. *Int J Cancer.*, 1993, vol. 55, 830-836 [0106]
- **HOSEN N ; PARK CY ; TATSUMI N ; OJI Y ; SUGIYAMA H ; GRAMATZKI M ; KRENSKY AM ; WEISSMAN IL.** CD96 is a leukemic stem cell-specific marker in human acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 2007, vol. 104 (26), 11008-13 [0106]

- HRUSAK O ; PORWIT-MACDONALD A. Antigen expression patterns reflecting genotype of acute leukaemias. *Leukemia*, 2002, vol. 16 (7), 1233-1258 [0106]
- JIN L ; HOPE KJ ; ZHAI Q ; SMADJA-JOFFE F ; DICK JE. Targeting of CD44 eradicates human myeloid leukemic stem cells. *Nat. Med.*, 2006, vol. 12 (10), 1167-74 [0106]
- KABAT EA ; WU TT. Identical V region amino acid sequences and segments of sequences in antibodies of different specificities. Relative contributions of VH and VL genes, minigenes, and complementarity-determining regions to binding of antibody-combining sites. *J Immunol.*, 1991, vol. 147, 1709-1719 [0106]
- KAMINSKI MS ; ZASADNY KR ; FRANCIS IR ; MILIK AW ; ROSS CW ; MOON SD ; CRAWFORD SM ; BURGESS JM ; PETRY NA ; BUTCHKO GM et al. Radioimmunotherapy of B-cell lymphoma with [131I]anti-B1 (anti-CD20) antibody. *N Engl J Med.*, 1993, vol. 329, 459-465 [0106]
- KIPRIYANOV SM ; MOLDENHAUER G ; STRAUSS G ; LITTLE M. Bispecific CD3XCD19 diabody for T cell-mediated lysis of malignant human B cells. *Int. J. Cancer.*, 1998, vol. 77, 763-772 [0106]
- KIPRIYANOV SM ; COCHLOVIUS B ; SCHAFFER HJ ; MOLDENHAUER G ; BAHRE A ; LE GALL F ; KNACKMUSS S ; LITTLE M. Synergistic antitumor effect of bispecific CD19 x CD3 and CD19 x CD16 diabodies in a preclinical model of non-Hodgkin's lymphoma. *J Immunol.*, 2002, vol. 169, 137-144 [0106]
- KREBBERA A ; BORNHAUSER S ; BURMESTER J ; HONEGGER A ; WILLUDA J ; BOSSHARD HR ; PLUCKTHUN A. Reliable cloning of functional antibody variable domains from hybridomas and spleen cell repertoires employing a reengineered phage display system. *J Immunol Methods*, 1997, vol. 201 (1), 35-55 [0106]
- LAEMMLI UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, vol. 227 (5259), 680-5 [0106]
- LANG P ; HANDGRETINGER R ; NIETHAMMER D ; SCHLEGEL PG ; SCHUMM M ; GREIL J ; BADER P ; ENGEL C ; SCHEEL-WALTER H ; EYRICH M. Transplantation of highly purified CD34+ progenitor cells from unrelated donors in pediatric leukemia. *Blood*, 2003, vol. 101, 1630-1636 [0106]
- LAPIDOT T ; SIRARD C ; VORMOOR J ; MURDOCH B ; HOANG T ; CACERES-CORTES J ; MINDEN M ; PATERSON B ; CALIGIURI MA ; DICK JE. *Nature*, 1994, vol. 367 (6464), 645-8 [0106]
- LAZAR GA ; DANG W ; KARKI S ; VAFA O ; PENG JS ; HYUN L ; CHAN C ; CHUNG HS ; EIVAZI A ; YODER SC. Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 2006, vol. 103, 4005-4010 [0106]
- LEGRAS S ; GUNTHER T U ; STAUDER R ; CURT F ; OLIFERENKO S ; KLUIN-NELEMANS HC ; MARIE JP ; PROCTOR S ; JASMIN C ; SMADJA-JOFFE F. A strong expression of CD44-6v correlates with shorter survival of patients with acute myeloid leukemia. *Blood*, 1998, vol. 91, 3401-3413 [0106]
- LEONARD JP ; COLEMAN M ; KETAS JC ; CHADBURN A ; ELY S ; FURMAN RR ; WEGENER WA ; HANSEN HJ ; ZICCARDI H ; ESCHENBERG M. Phase I/II trial of epratuzumab (humanized anti-CD22 antibody) in indolent non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol.*, 2003, vol. 21, 3051-3059 [0106]
- LOFFLER A ; KUFER P ; LUTTERBUSE R ; ZETTL F ; DANIEL PT ; SCHWENKENBECHER JM ; RIETHMULLER G ; DORKEN B ; BARGOU RC. A recombinant bispecific single-chain antibody, CD19 x CD3, induces rapid and high lymphoma-directed cytotoxicity by unstimulated T lymphocytes. *Blood*, 2000, vol. 95, 2098-2103 [0106]
- MCCALL, A.M. ; SHAHIED, L. ; AMOROSO, A.R. ; HORAK, E.M. ; SIMMONS, H.H. ; NIELSON, U ; ADAMS, G.P. ; SCHIER, R. ; MARKS, J.D. ; WEINER, L.M. Increasing the affinity for tumor antigen enhances bispecific antibody cytotoxicity. *J Immunol*, 2001, vol. 166, 6112-6117 [0106]
- MESSINGER Y ; YANISHEVSKI Y ; EK O ; ZEREN T ; WAURZYNIAK B ; GUNTHER R ; CHELSTROM L ; CHANDAN-LANGLIE M ; SCHNEIDER E ; MYERS DE. In vivo toxicity and pharmacokinetic features of B43 (anti-CD19)-genistein immunoconjugate in nonhuman primates. *Clin Cancer Res.*, 1998, vol. 4, 165-170 [0106]
- MURPHY G ; COCKETT MI ; WARD RV ; DOCHERTY AJ. Matrix metalloproteinase degradation of elastin, type IV collagen and proteoglycan. A quantitative comparison of the activities. *Biochem J.*, 1991, vol. 277, 277-279 [0106]
- ONRUST SV ; LAMB HM ; BALFOUR JA. *Rituximab. Drugs*, 1999, vol. 58, 79-88, 89-90 [0106]
- OWENS GC. ; CHAPPELL SA. ; MAURO VP. ; EDELMAN GM. Identification of two short internal ribosome entry sites selected from libraries of random oligonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, vol. 98 (4), 1471-1476 [0106]
- PANTOLIANO MW ; BIRD RE ; JOHNSON S ; ASELED ; DODD SW ; WOOD JF ; HARDMAN KD. Conformational stability, folding, and ligand-binding affinity of single-chain Fv immunoglobulin fragments expressed in *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 1991, vol. 30, 10117-10125 [0106]
- PASSEGUE E ; JAMIESON, CHM ; AILLES LE ; WEISSMAN IL. Normal and leukemic hematopoiesis: Are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics?. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 2003, vol. 100 (1), 11842-49 [0106]

- **PEIPP M ; VALERIUS T.** Bispecific antibodies targeting cancer cells. *Biochem Soc Trans.*, 2002, vol. 30, 507-511 [0106]
- **PEIPP M ; KUPERS H ; SAUL D et al.** A recombinant CD7-specific single-chain immunotoxin is a potent inducer of apoptosis in acute leukemic T cells. *Cancer Res.*, 2002, vol. 62, 2848-2855 [0106]
- **PIETERSZ GA ; WENJUN L ; SUTTON VR ; BURGESS J ; MCKENZIE IF ; ZOLA H ; TRAPANI JA.** In vitro and in vivo antitumor activity of a chimeric anti-CD19 antibody. *Cancer Immunol Immunother.*, 1995, vol. 41, 53-60 [0106]
- **RAVETCH JV ; KINET JP.** Fc receptors. *Annu Rev Immunol.*, 1991, vol. 9, 457-492 [0106]
- **REFF ME ; CARNER K ; CHAMBERS KS ; CHINN PC ; LEONARD JE ; RAAB R ; NEWMAN RA ; HANNA N ; ANDERSON DR.** Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood*, 1994, vol. 83, 435-445 [0106]
- **REITER Y ; BRINKMANN U ; KREITMAN RJ ; JUNG SH ; LEE B ; PASTAN I.** Stabilization of the Fv Fragments in Recombinant Immunotoxins by Disulfide Bonds Engineered into Conserved Framework Regions. *Biochemistry*, 1994, vol. 33, 5451-5459 [0106]
- **RIECHMANN L ; CLARK M ; WALDMANN H ; WINTER G.** Reshaping human antibodies for therapy. *Nature*, 1988, vol. 332, 323-327 [0106]
- **SAMBROOK.** Molecular Cloning A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, 2001 [0106]
- **SCHWEMMLEIN M ; STIEGLMAIER J ; KELLNER C ; PEIPP M ; SAUL D ; ODUNCU F ; EMMERICH B ; STOCKMEYER B ; LANG P ; BECK JD.** A CD19-specific single-chain immunotoxin mediates potent apoptosis of B-lineage leukemic cells. *Leukemia*, 2007, vol. 21, 1405-1412 [0106]
- **SCHWENKERT M ; BIRKHOLZ K ; SCHWEMMLEIN M ; KELLNER C ; KÜGLER M ; PEIPP M ; NETTELBECK D M ; SCHULER-THURNER B ; SCHAFT N ; DÖRRIE J.** A single chain immunotoxin, targeting the melanoma associated chondroitin sulfate proteoglycan, is a potent inducer of apoptosis in cultured human melanoma cells. *Melanoma Res.*, 2006, vol. 18 (2), 73-84 [0106]
- **SEGAL DM ; WEINER GJ ; WEINER LM.** Bispecific antibodies in cancer therapy. *Curr Opin Immunol.*, 1999, vol. 11, 558-562 [0106]
- **SIEVERS EL ; APPELBAUM FR ; SPIELBERGER RT ; FORMAN SJ ; FLOWERS D ; SMITH FO ; SHANNON-DORCY K ; BERGER MS ; BERNSTEIN ID.** Selective ablation of acute myeloid leukemia using antibody-targeted chemotherapy: a phase I study of an anti-CD33 calicheamicin immunoconjugate. *Blood*, 1999, vol. 93, 3678-3684 [0106]
- **SPANGRUDE GJ ; HEIMFELD S ; WEISSMAN IL.** Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science*, 1988, vol. 241, 58-62 [0106]
- **STEMMER WP ; MORRIS SK ; WILSON BS.** Selection of an active single chain Fv antibody from a protein linker library prepared by enzymatic inverse PCR. *Biotechniques*, 1993, vol. 14, 256-265 [0106]
- **STORK R ; ZETTLITZ KA ; MÜLLER D ; RETHER M ; HANISCH FG ; KONTERMANN RE.** N-Glycosylation as Novel Strategy to Improve Pharmacokinetic Properties of Bispecific Single-chain Diabodies. *J Biol Chem.*, 2008, vol. 283 (12), 7804-12 [0106]
- **TAN BT ; PARK CY ; AILLES E ; WEISSMAN IL.** The cancer stem cell hypothesis: a work in progress. *Lab Invest.*, 2006, vol. 86, 1203-7 [0106]
- **TAUSSIG DC ; PEARCE DJ ; SIMPSON C ; ROHATINER AZ ; LISTER TA ; KELLY G ; LUONGO JL ; DANET-DESNOYERS GH ; BONNET D.** Hematopoietic stem cells express multiple myeloid markers: implications for the origin and targeted therapy of acute myeloid leukemia. *Blood*, 2005, vol. 106 (13), 4086-92 [0106]
- **VALLERA DA ; ELSON M ; BRECHBIEL MW ; DUSENBERY KE ; BURNS LJ ; JASZCZ WB ; RAMSAY NK ; PANOSKALTSIS-MORTAR A ; KUROKIDW ; WAGNER JE.** Radiotherapy of CD19 expressing Daudi tumors in nude mice with Yttrium-90-labeled anti-CD19 antibody. *Cancer Biother Radiopharm.*, 2004, vol. 19, 11-23 [0106]
- **VAN DE WINKEL JG ; ANDERSON CL.** Biology of human immunoglobulin G Fc receptors. *J Leukoc Biol.*, 1991, vol. 49, 511-524 [0106]
- **VAN RHENEN A ; VAN DONGEN GAM ; KELDER A ; ROMBOUTS EJ ; FELLER N ; MOSHAVER B ; STIGTER-VAN WALSUM M ; ZWEEGMAN S ; OSSENKOPPELE GJ ; GERRIT.** The novel AML stem cell-associated antigen CLL-1 aids in discrimination between normal and leukemic stem cells. *Blood*, 2007, vol. 110 (7), 2659-2666 [0106]
- **VERVOORDELDONK SF ; MERLE PA ; VAN LEEUWEN EF ; VON DEM BORNE AE ; SLAPER-CORTENBACH IC.** Preclinical studies with radiolabeled monoclonal antibodies for treatment of patients with B-cell malignancies. *Cancer*, 1994, vol. 73, 1006-1011 [0106]
- **WEINER GJ ; DE GAST GC.** Bispecific monoclonal antibody therapy of B-cell malignancy. *Leuk Lymphoma*, 1995, vol. 16, 199-207 [0106]
- **WEINER LM ; HOLMES M ; RICHESON A ; GODWIN A ; ADAMS GP ; HSIEH-MA ST ; RING DB ; ALPAUGH RK.** Binding and cytotoxicity characteristics of the bispecific murine monoclonal antibody 2B1. *J Immunol.*, 1993, vol. 151, 2877-2886 [0106]
- **WENG WK ; LEVY R.** Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma. *J Clin Oncol.*, 2003, vol. 21, 3940-3947 [0106]