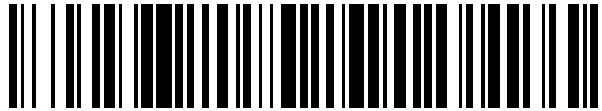


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 582 001**

51 Int. Cl.:

C07K 16/46 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.02.2010 E 10154751 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.04.2016 EP 2361936**

54 Título: **Molécula que se une a antígeno y usos de la misma**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.09.2016

73 Titular/es:

**AFFIMED GMBH (100.0%)
Im Neuenheimer Feld 582
69120 Heidelberg, DE**

72 Inventor/es:

**LITTLE, MELVYN y
LE GALL, FABRICE**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

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

ES 2 582 001 T3

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

DESCRIPCIÓN

Molécula que se une a antígeno y usos de la misma

Antecedentes de la invención

5 Se han diseñado diversos formatos de fragmentos de anticuerpos recombinantes multivalentes como alternativas a los anticuerpos obtenidos a partir de cuadromas.

El documento US 7.129.330 y Kipriyanov et al. J. Mol. Biol. (1999) 293, 41- 56 describen la construcción y la producción de un formato particular de fragmentos de anticuerpos multivalentes que se denominan "diacuerpos en tándem" (TandAb[®]), ya que su diseño se basa en el apareamiento intermolecular de dominios variables V_H y V_L de dos polipéptidos diferentes, tal y como se describe para los diacuerpos (Holliger et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-64488). Los anticuerpos descritos son biespecíficos para CD19 y CD3. En contraste con los tándems bivalentes scFv-scFv (scFv)₂, los diacuerpos en tándem son tetravalentes debido a que tienen cuatro sitios de unión a antígeno. Se describen polipéptidos dispuestos en el orden de dominios V_HA-V_LB-V_HB-V_LA desde el extremo N-terminal al C-terminal de los polipéptidos que forman los diacuerpos en tándem. El orden de los dominios variables y los péptidos enlazadores entre ellos, se diseñó de tal manera que cada dominio se asociaba con un dominio complementario en otra molécula idéntica, formando de este modo los diacuerpos en tándem tetravalentes dimerizados. Los diacuerpos en tándem están desprovistos de dominios constantes de inmunoglobulina. Se ha informado de que los diacuerpos en tándem tienen ventajas tales como una alta afinidad, una avidéz más elevada, tasas de aclaramiento menores y presentan una eficacia favorable *in vitro* e *in vivo*.

20 Se conocen diversos diacuerpos en tándem adicionales que comprenden especificidades de anticuerpo tales como, por ejemplo, anti-CD16, anti-EpCAM y anti-CD30. En todos los casos, sin embargo, el orden de los cuatro dominios de anticuerpo a lo largo de las cadenas polipeptídicas del diacuerpo en tándem desde el extremo N-terminal al C-terminal, era siempre V_HA-V_LB-V_HB-V_LA, en donde V_H y V_L representan los dominios variables de la cadena pesada y ligera de anticuerpos con especificidades para los antígenos A y B, respectivamente.

25 Unos diacuerpos en tándem biespecíficos de este tipo pueden formar un puente entre una célula tumoral (por ejemplo, linfocito B-CLL) y una célula efectora del sistema inmune humano (célula NK, linfocito T, monocito, macrófago o granulocito) permitiendo de este modo la destrucción de la célula tumoral. La estrecha unión de la célula tumoral y la célula citotóxica induce la destrucción de la célula tumoral.

30 Aunque tales diacuerpos en tándem han demostrado ser favorables para aplicaciones terapéuticas, por ejemplo, para conceptos terapéuticos para el tratamiento de tumores, sigue habiendo una necesidad de mejorar las moléculas que se unen a antígeno para reforzar la respuesta inmune.

Le Gall F, et al. (Protein Engineering, Design and Selection, 2004, 17(4):257-261) informan sobre el efecto de diferentes longitudes del enlazador sobre la actividad de un diacuerpo en tándem biespecífico CD3xCD19 con los dominios variables en el orden V_HCD3-V_LCD19-V_HCD19-V_LCD3.

Breve descripción de los dibujos

35 La Fig. 1

ilustra la organización de los genes de una estructura artificial que codifica una molécula de antígeno de acuerdo con la invención, en donde V_LA representa un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina, específico de un antígeno A, V_HB representa un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina, específico de un antígeno B, V_LB representa un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina, específico del antígeno B, V_HA representa un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina, específico del antígeno A, L1 es un enlazador peptídico o un enlace peptídico que conecta V_LA y V_HB, L2 es un enlazador peptídico o un enlace peptídico que conecta V_HB y V_LB y L3 es un enlazador peptídico o un enlace peptídico que conecta V_LB y V_HA.

La Fig. 2

45 ilustra la formación de una molécula dímera que se une a antígeno de acuerdo con la invención, procedente de cadenas polipeptídicas monómeras no funcionales (A) mediante emparejamiento intramolecular de dominios variables de una primera cadena polipeptídica 1 y una segunda cadena polipeptídica 2 entre sí (B) con una molécula funcional que se une a antígeno de acuerdo con la invención, en el formato de diacuerpo en tándem, en donde "1" representa la primera cadena polipeptídica, "2" representa la segunda cadena polipeptídica, V_LA representa un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina, específico de un antígeno A, V_HB representa un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina, específico de un antígeno B, V_LB representa un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina, específico del antígeno B, V_HA representa un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina, específico del antígeno A, L1 es un enlazador peptídico o un enlace peptídico que conecta V_LA y V_HB, L2 es un enlazador peptídico o un enlace peptídico que conecta V_HB y V_LB y L3 es un enlazador peptídico o un enlace peptídico que conecta V_LB y V_HA.

La Fig. 3

muestra una comparación de diacuerpos en tándem CD19xCD3 en un ensayo de citotoxicidad. Opción 0 = anticuerpo A1 con el orden de dominios $V_{H}A-V_{L}B-V_{H}B-V_{L}A$. Opción 2 = anticuerpo B con el orden de dominios $V_{L}A-V_{H}B-V_{L}B-V_{H}A$ de acuerdo con la invención. Se incubaron 1×10^4 células Raji marcadas con calceína con 5×10^5 PBMCs en presencia de concentraciones crecientes de los diacuerpos en tándem CD19xCD3 indicados. Las PBMCs se cultivaron durante una noche en presencia de 25 U/ml de IL-2 humana antes de que se utilizaran como células efectoras en el ensayo. Después de 4 h de incubación, se midió la calceína fluorescente en el medio de cultivo celular, liberada desde las células diana apoptóticas a 520 nm y se calculó el % de lisis específica. Los valores de CE_{50} se analizaron mediante regresión no lineal usando el programa informático GraphPad. Se representaron la media y las desviaciones estándar de duplicados.

La Fig. 4

muestra una comparación de diacuerpos en tándem CD19xCD3 en un ensayo de citotoxicidad. Opción 0 = anticuerpo A2 con el orden de dominios $V_{H}A-V_{L}B-V_{H}B-V_{L}A$. Opción 2 = anticuerpo C con el orden de dominios $V_{L}A-V_{H}B-V_{L}B-V_{H}A$ de acuerdo con la invención. Se incubaron 1×10^4 células Raji marcadas con calceína con 5×10^5 PBMCs recién aisladas en presencia de concentraciones crecientes de los diacuerpos en tándem CD19xCD3 indicados. Después de 4 h de incubación, se midió la calceína fluorescente en el medio de cultivo celular, liberada desde las células diana apoptóticas a 520 nm y se calculó el % de lisis específica. Los valores de CE_{50} se analizaron mediante regresión no lineal usando el programa informático GraphPad. Se representaron la media y las desviaciones estándar de duplicados.

La Fig. 5

muestra el mapa del vector con los sitios de restricción de pCDNA5FRT que codifica el anticuerpo B. VH y VL: dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras.

La Fig. 6

muestra el mapa del vector con los sitios de restricción de pSKK3 que codifica el anticuerpo C. VH y VL: dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona una molécula recombinante que se une a antígeno, dímera y tetravalente con cuatro dominios de inmunoglobulina (dos dominios variables de cadena pesada y dos dominios variables de cadena ligera) unidos entre sí en una cadena de polipéptido y dispuestos en el orden $V_{L}A-V_{H}B-V_{L}B-V_{H}A$ desde el extremo N-terminal al C-terminal de la cadena de polipéptido y que son específicos para CD3 y CD19. Tal molécula que se une a antígeno de la presente invención, desencadena una respuesta inmune mejorada.

En una realización, se ilustra que una molécula que se une a antígeno dímera, biespecífica en la que el formato de diacuerpo en tándem es específico para CD3 y CD19 y que tiene cadenas polipeptídicas dispuestas en el orden de dominios $V_{L}A-V_{H}B-V_{L}B-V_{H}A$ es más de 60 veces más activa *in vitro*, es decir, citotóxica, que una molécula de diacuerpo en tándem correspondiente con los mismos dominios, pero con el orden de dominios inverso $V_{H}A-V_{L}B-V_{H}B-V_{L}A$.

Por lo tanto, los diacuerpos en tándem dispuestos en el orden de dominios $V_{L}A-V_{H}B-V_{L}B-V_{H}A$ desde el extremo N-terminal al C-terminal de las cadenas polipeptídicas tienen un mayor potencial para la inmunoterapia. Una ventaja adicional de la actividad citotóxica mejorada es que se pueden reducir las dosificaciones terapéuticas eficaces para tales diacuerpos en tándem. Además, los efectos secundarios causados por las moléculas que se unen a antígeno administradas también se pueden reducir debido a dosificaciones más bajas. Sin estar limitado por ninguna teoría, el nuevo orden de los dominios permite una reticulación modificada de la molécula dímera que se une a antígeno, entre CD3 como antígeno A y CD19 como antígeno B, en comparación con los diacuerpos en tándem de la técnica y, en ciertos aspectos de la invención, esto permitirá que la molécula se una a los antígenos diana de manera más eficaz que las moléculas dímeras que se unen a antígeno de la técnica.

Por lo tanto, la actividad biológica de un diacuerpo en tándem se puede mejorar, cuando los cuatro dominios variables de cada cadena polipeptídica que forman la molécula dímera que se une a antígeno, están dispuestos en el orden $V_{L}A-V_{H}B-V_{L}B-V_{H}A$ desde el extremo N-terminal al C-terminal de cada cadena polipeptídica.

La presente invención proporciona una molécula dímera que se une a antígeno que comprende una primera y una segunda cadena polipeptídica, en donde cada una de la primera y la segunda cadenas polipeptídicas comprende un primer dominio $V_{L}A$ que es un dominio variable de cadena ligera, específico de un primer antígeno A, un segundo dominio $V_{H}B$ que es un dominio variable de cadena pesada, específico de un segundo antígeno B, un tercer dominio $V_{L}B$ que es un dominio variable de cadena ligera, específico del segundo antígeno B, un cuarto dominio $V_{H}A$ que es un dominio variable de cadena pesada, específico del primer antígeno A, y dichos dominios están dispuestos en cada una de dichas cadenas primera y segunda polipeptídicas en el orden $V_{L}A-V_{H}B-V_{L}B-V_{H}A$ desde el extremo N-

terminal al C-terminal de dichas cadenas polipeptídicas, en donde el antígeno A es CD3 y el antígeno B es CD19.

Los dominios variables primero, segundo, tercero y cuarto están dispuestos en una orientación que evita el emparejamiento intramolecular dentro de la misma cadena polipeptídica y la primera cadena polipeptídica se asocia, es decir, se dimeriza con la segunda cadena polipeptídica, de tal manera que el primer dominio V_LA de la primera cadena polipeptídica está asociado con el cuarto dominio V_HA de la segunda cadena polipeptídica para formar un sitio de unión a antígeno para el primer antígeno A, el segundo dominio V_HB de la primera cadena polipeptídica está asociado con el tercer dominio V_LB de la segunda cadena polipeptídica para formar un sitio de unión a antígeno para el segundo antígeno B, el tercer dominio V_LB de la primera cadena polipeptídica está asociado con el segundo dominio V_HB de la segunda cadena polipeptídica para formar un sitio de unión a antígeno para el segundo antígeno B y el cuarto dominio V_HA de la primera cadena polipeptídica está asociado con el primer dominio V_LA de la segunda cadena polipeptídica para formar un sitio de unión a antígeno para el primer antígeno A.

La expresión "molécula que se une a antígeno" se refiere a un derivado de inmunoglobulina con propiedades multivalentes de unión a antígeno, que tiene al menos cuatro sitios de unión a antígeno. Cada sitio de unión a antígeno está formado por un dominio variable de cadena pesada V_H y un dominio variable de cadena ligera V_L del mismo antígeno, es decir, especificidad de epítipo. Preferiblemente, la molécula que se une a antígeno de acuerdo con la invención está desprovista de dominios constantes de inmunoglobulina o de fragmentos de dominios constantes de inmunoglobulina, pero en ciertos casos descritos a continuación, un dominio constante o partes del mismo, puede estar ligado a la molécula que se une a antígeno.

La molécula que se une a antígeno es "dímera", término que se refiere a un complejo de dos monómeros polipeptídicos. Estos dos monómeros polipeptídicos son la primera y la segunda cadenas polipeptídicas. Preferiblemente, la molécula que se une a antígeno es un "homodímero", término que significa que la molécula que se une a antígeno se compone de monómeros polipeptídicos idénticos. En una molécula que se une a antígeno homodímera preferida de acuerdo con la invención, la primera y la segunda cadenas polipeptídicas pueden tener la misma secuencia de aminoácidos, es decir, la primera y la segunda cadenas polipeptídicas son idénticas y, por lo tanto, están codificadas y expresadas por el mismo polinucleótido aislado. Esto es diferente en el caso de los denominados dímeros biespecíficos, que son heterodímeros que están codificados por dos polinucleótidos diferentes. En el primer caso, cada una de la primera y segunda cadenas polipeptídicas contiene cuatro dominios variables, se forman cuatro sitios de unión y la molécula que se une a antígeno es tetravalente. Las moléculas que se unen a antígeno homodímeras tetravalentes de este tipo han recibido algún tipo de reconocimiento en la técnica como dímeros en tándem.

Preferiblemente, en la molécula que se une a antígeno, la primera y la segunda cadena polipeptídica están asociadas entre sí de forma no covalente, en particular, con la condición de que no haya una unión covalente entre la primera y la segunda cadena polipeptídica. Sin embargo, si se desea, las dos cadenas polipeptídicas se pueden estabilizar adicionalmente a través de al menos un enlace covalente, por ejemplo, mediante un puente disulfuro entre los residuos de cisteína de diferentes cadenas polipeptídicas.

La expresión "cadena polipeptídica" se refiere a un polímero de residuos de aminoácidos unidos por enlaces amida. La primera y la segunda cadenas polipeptídicas son, preferiblemente, proteínas de fusión de cadena sencilla que no están ramificadas. En cada una de la primera y segunda cadenas polipeptídicas, los cuatro dominios están dispuestos de tal manera que el segundo dominio V_HB es C-terminal del primer dominio V_LA , el tercer dominio V_LB es C-terminal del segundo dominio V_HB y el cuarto dominio V_HA es C-terminal del tercer dominio V_LB . La primera y la segunda cadenas polipeptídicas pueden tener residuos de aminoácidos contiguos, además de ser N-terminales con respecto al primer dominio V_LA y/o C-terminales con respecto al cuarto dominio V_HA . Por ejemplo, la cadena polipeptídica puede contener una secuencia marcadora, preferiblemente en el extremo C-terminal que podría ser útil para la purificación del polipéptido. Un ejemplo de una secuencia marcadora es un marcador His, por ejemplo un marcador His que consiste en seis residuos His.

En algunas realizaciones, el primero, el segundo, el tercero y el cuarto dominio están conectados covalentemente de tal manera que los dominios de la misma cadena polipeptídica no se asocian, es decir, no se emparejan entre sí. Los dominios pueden estar enlazados de tal manera que el primer dominio V_LA está unido con el segundo dominio V_HB a través de un primer enlazador L1, el segundo dominio V_HB está enlazado con el tercer dominio V_LB a través de un segundo enlazador L2 y el tercer dominio V_LB está enlazado con el cuarto dominio V_HA a través de un tercer enlazador L3, en donde el primer enlazador L1 y el tercer L3 enlazador son distales con respecto al enlazador central L2 en cada una de la primera y segunda cadenas polipeptídicas.

La longitud de cada uno de los enlazadores L1, L2 y L3 es tal que los dominios de la primera cadena polipeptídica se pueden asociar con los dominios de la segunda cadena polipeptídica para formar la molécula dímera que se une a antígeno. La longitud de los enlazadores influye sobre la flexibilidad de la molécula que se une a antígeno. La flexibilidad deseada de la molécula que se une a antígeno depende de la densidad del antígeno diana y de la accesibilidad del antígeno diana, es decir, epítopos. Los enlazadores más largos proporcionan moléculas que se unen a antígeno más flexibles con sitios de unión a antígeno más flexibles. El efecto de la longitud del enlazador sobre la formación de moléculas dímeras que se unen a antígeno se describe, por ejemplo, en Todorovska et al., 2001 Journal of Immunological Methods 248:47-66; Perisic et al., 1994 Structure 2:1217-1226; Le Gall et al., 2004, Protein Engineering 17:357-366 y el documento WO 94/13804.

Los enlazadores L1, L2 y/o L3 son "cortos", es decir, constan de 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 residuos de aminoácidos. Tales enlazadores cortos favorecen la dimerización correcta de la primera cadena con la segunda cadena polipeptídica mediante la unión y la formación de sitios de unión al antígeno entre los dominios variables de la cadena ligera y los dominios variables de la cadena pesada de las diferentes cadenas polipeptídicas. En particular, el enlazador central L2 debe ser corto, de tal manera que evita la formación de una unidad que se une a antígeno de cadena sencilla Fv (scFv) dentro de la misma cadena polipeptídica a través de los dos dominios adyacentes V_HB y V_LB. El enlazador central L2 influye sobre la flexibilidad de la cadena polipeptídica. Si el enlazador central L2 es largo y flexible (en general consiste en aproximadamente 12 o más residuos de aminoácidos), la cadena polipeptídica se puede plegar de cabeza a cola y formar una molécula que se une a antígeno de cadena sencilla, conocida en la técnica como un diacuerpo de cadena sencilla. Si el enlazador central L2 es corto y rígido, la cadena polipeptídica no se puede plegar de cabeza a cola y se dimeriza con otra cadena polipeptídica. Acortar el enlazador hasta aproximadamente 12 residuos de aminoácidos o menos, en general impide que dominios adyacentes de la misma cadena polipeptídica interactúen entre sí. Por lo tanto, el enlazador central L2 y los enlazadores distales L1 y L3 deben consistir en 6-12 residuos de aminoácidos para evitar el emparejamiento de dominios adyacentes de la misma cadena polipeptídica. Los enlazadores pueden constar de diferentes cantidades de residuos de aminoácidos, pero se prefiere que los enlazadores distales L1 y L3 tengan el mismo número de residuos de aminoácidos o que la longitud no difiera en más de uno o dos residuos de aminoácidos. En un cierto aspecto de la invención, al menos uno de los enlazadores L1, L2 y/o L3 consiste en nueve residuos de aminoácidos. En una realización particular de la invención, los tres enlazadores L1, L2 y L3 consisten en nueve residuos de aminoácidos.

En cuanto a la composición de aminoácidos de los enlazadores, en algunas realizaciones, los péptidos se seleccionan de modo que no interfieren con la dimerización de la primera y la segunda cadenas polipeptídicas. Por ejemplo, enlazadores que comprenden residuos de glicina y serina, generalmente proporcionan flexibilidad y resistencia a la proteasa. La secuencia de aminoácidos de los enlazadores se puede optimizar, por ejemplo, por métodos de presentación en fago para mejorar la unión al antígeno y el rendimiento de la producción de las moléculas. En realizaciones particulares de la invención, el enlazador puede comprender la secuencia de aminoácidos GSGSGSGS.

El primer dominio V_LA, el segundo dominio V_HB, el tercer dominio V_LB y el cuarto dominio V_HA son dominios variables de cadena ligera y de cadena pesada de una inmunoglobulina. Los dominios variables comprenden los bucles hipervariables o regiones de unión complementarias (CDRs) que contienen los residuos en contacto con el antígeno y los segmentos que contribuyen al plegamiento correcto y la presentación de las CDRs. Se prefiere que cada uno de los dominios variables de la cadena pesada y la cadena ligera comprenda las tres CDRs respectivas. Los dominios se pueden obtener a partir de cualquier clase de inmunoglobulina, por ejemplo, IgA, IgD, IgE e IgM o una subclase de las mismas. La inmunoglobulina puede ser de origen animal, en particular de mamífero. Cada dominio puede ser un dominio variable completo de cadena pesada o ligera de inmunoglobulina, un mutante, un fragmento o un derivado de un dominio variable de origen natural, o uno sintético, por ejemplo, un dominio recombinante que se manipula genéticamente. Un derivado es un dominio variable que se diferencia por la delección, sustitución, adición o inserción de al menos un aminoácido procedente de la secuencia de aminoácidos de un dominio variable de origen natural. Los dominios sintéticos, por ejemplo, recombinantes, se pueden obtener, por ejemplo, por métodos reproducibles bien conocidos, a partir de anticuerpos obtenidos a partir de hibridomas o genotecas de inmunoglobulinas que se presentan en fagos. Por ejemplo, los métodos de presentación en fago se pueden utilizar para obtener dominios variables de anticuerpos humanos frente a un antígeno, mediante el escrutinio de genotecas procedentes de secuencias de inmunoglobulina humana. La afinidad de los anticuerpos seleccionados inicialmente se puede aumentar aún más mediante maduración por afinidad, por ejemplo, intercambio de cadenas o mutagénesis aleatoria. Una persona con experiencia ordinaria en la técnica está familiarizada con los métodos para la obtención de dominios de anticuerpos naturales o recombinantes (para manuales de laboratorio véase, por ejemplo, *Antibody engineering: methods and protocols* / editado por Benny K.C. Lo; Benny K.C. II Series: *Methods in molecular biology* (Totowa, N.J.)).

En un cierto aspecto de la invención, al menos uno, preferiblemente todos, entre el primer dominio V_LA, el segundo dominio V_HB, el tercer dominio V_LB y el cuarto dominio V_HA son dominios totalmente humanos, están humanizados o son dominios quiméricos. Un dominio variable humanizado comprende una región marco que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana y una CDR de una inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados pueden ser producidos por métodos bien establecidos, tales como, por ejemplo, injerto de CDRs (véase, por ejemplo, *Antibody engineering: methods and protocols* / editado por Benny K.C. Lo; Benny K.C. II Series: *Methods in molecular biology* (Totowa, N.J.)). Por lo tanto, una persona experta es bien capaz de preparar una versión humanizada o totalmente humana de moléculas que se unen a antígeno y de dominios variables procedentes de fuentes no humanas, por ejemplo, murinas, con métodos convencionales de biología molecular conocidos en la técnica para reducir la inmunogenicidad y mejorar la eficacia de la molécula que se une a antígeno en un sistema inmune humano. En una realización preferida de la invención, todos los dominios (por ejemplo, V_LA, V_HB, V_LB y V_HA) están humanizados o son completamente humanos; lo más preferido, la molécula dímera que se une a antígeno de acuerdo con la invención está humanizada o es completamente humana. La expresión "completamente humana" tal y como se emplea en el presente documento, significa que las secuencias de aminoácidos de los dominios variables y los péptidos que enlazan los dominios variables en la primera y la segunda cadenas polipeptídicas se originan o se pueden encontrar en los seres humanos. En ciertas realizaciones de la invención, los dominios variables pueden ser humanos o estar humanizados, pero no los péptidos que enlazan los dominios variables.

El antígeno CD3 se asocia con el complejo del receptor de linfocitos T sobre los linfocitos T. La unión con CD3 de la molécula dímica que se une a antígeno de acuerdo con la invención, desencadena la actividad citotóxica de los linfocitos T. Mediante una unión específica de la molécula dímica que se une a CD3 y una célula diana, por ejemplo, una célula tumoral, se puede inducir la lisis celular de la célula diana. Las moléculas dimeras que se unen a antígeno con especificidad hacia CD3 y su producción, son conocidas en la técnica (y se describen, por ejemplo, en Kipriyanov et al., 1999, *Journal of Molecular Biology* 293:41-56, Le Gall et al., 2004, *Protein Engineering, Design & Selection*, 17/4:357-366)

Las moléculas dimeras que se unen a antígeno de acuerdo con la invención, en las que la especificidad tumoral es hacia el antígeno CD19, se pueden utilizar para la inmunoterapia de enfermedades malignas de linfocitos B, debido a que el antígeno CD19 se expresa en prácticamente todos los tumores malignos de la línea B, desde la leucemia linfoblástica (LLA) hasta el linfoma no Hodgkin (LNH). En particular se pueden utilizar para el tratamiento de moléculas dimeras que se unen a antígeno de linfoma no Hodgkin que tienen especificidad hacia CD19. Las moléculas dimeras que se unen a antígeno que tienen especificidad hacia CD19 y su producción son conocidas en la técnica (y se describen, por ejemplo, en Cochlovius et al., 2000, *Cancer Research* 60:4336-4341).

La molécula que se une a antígeno tal y como se describe en el presente documento, es dímica y biespecífica de CD3 y CD19.

El primer dominio V_{LA} y el cuarto dominio V_{HA} son específicos de CD3, mientras que el segundo dominio V_{HB} y el tercer dominio V_{LB} son específicos de CD19. La primera y la segunda cadenas polipeptídicas tienen cada una el orden de dominios $V_{L_{CD3}}-V_{H_{CD19}}-V_{L_{CD19}}-V_{H_{CD3}}$ desde el extremo N-terminal al C-terminal de las cadenas polipeptídicas. En una realización preferida, el primero, el segundo, el tercero y el cuarto dominio están humanizados o son completamente humanos. En una realización más preferida, la primera y la segunda cadenas polipeptídicas, tal y como se han definido anteriormente, están humanizadas o son completamente humanas.

Un aspecto adicional de la invención proporciona una molécula dímica que se une a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente, que está enlazada con una unidad funcional adicional, por ejemplo, un dominio o un agente funcional, que media independientemente en una función biológica, en particular un acontecimiento bioquímico. La unidad funcional adicional puede formar un complejo o estar unida covalentemente con al menos una de las dos cadenas polipeptídicas individuales de la molécula dímica que se une a antígeno. En un aspecto, la unidad funcional adicional se puede unir covalentemente a una sola de las cadenas polipeptídicas individuales y en otro aspecto, una unidad funcional adicional puede estar unida de forma covalente a las dos cadenas polipeptídicas de la molécula dímica que se une a antígeno, enlazando de este modo las dos cadenas polipeptídicas. En un aspecto adicional, cada una de las dos cadenas polipeptídicas está unida covalentemente de forma individual a una unidad funcional adicional. Cuando la unidad funcional adicional se une covalentemente a al menos una de las dos cadenas polipeptídicas, la unidad funcional adicional se puede fusionar a al menos una de las dos cadenas polipeptídicas a través de un enlace peptídico o un enlazador peptídico. Alternativamente, la unidad funcional adicional puede estar enlazada a través de una conjugación química, tal como un puente disulfuro, por ejemplo, entre un residuo de cisteína de al menos una cadena polipeptídica y un residuo de cisteína de la unidad funcional adicional, un enlace éster o por reticulación química. En un cierto aspecto de la invención, la unidad funcional adicional puede estar ligada a la molécula que se une a antígeno a través de un enlazador escindible, tal como, por ejemplo, un enlace disulfuro.

La unidad funcional adicional puede estar enlazada con el extremo N-terminal o C-terminal de la primera y/o la segunda cadenas polipeptídicas. Si una unidad funcional adicional está enlazada a ambas, la primera y la segunda cadenas polipeptídicas, la unidad funcional adicional puede estar enlazada por el extremo N-terminal con una cadena polipeptídica y por el extremo C-terminal con la otra cadena polipeptídica.

Los reactivos homobifuncionales y heterobifuncionales para la reticulación química de una cadena polipeptídica con una unidad funcional adicional, tal como un polipéptido adicional o un agente, son bien conocidos en la técnica. Los ejemplos incluyen pero no se limitan a ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB), o-fenilendimaleimida (o-PDM), 3-(2-piridilditio)propionato de succinimidilo (SPDP), S-acetilto acetato de N-succinimidilo (SATA), 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC) o hidrazida de ácido 4-(4-N-maleimidofenil)butírico (MPBH). Los métodos para la reticulación de cadenas polipeptídicas que comprenden cadenas de inmunoglobulinas con un polipéptido adicional o un agente químico, se describen por ejemplo en Graziano et al., *Methods in Molecular Biology*, 2004, vol. 283, 71-85 y Hermanson, G.T. "Bioconjugate Techniques" Academic Press, Londres 1996.

En un aspecto, la unidad funcional adicional puede ser al menos un dominio variable adicional de inmunoglobulina. El dominio variable adicional de inmunoglobulina puede ser específico del primer antígeno A o del segundo antígeno B para los que los sitios de unión de la molécula dímica que se une a antígeno son específicos o, alternativamente, puede ser específico de un tercer antígeno C que es diferente del antígeno A y del antígeno B. En un cierto aspecto, un dominio variable adicional de la cadena ligera V_L y un dominio adicional de la cadena pesada variable V_H se pueden fusionar a cada una de las dos cadenas polipeptídicas, de tal manera que un dominio adicional, en particular V_H , se fusiona con el extremo N-terminal y el otro dominio adicional, en particular V_L , se fusiona con el extremo C-terminal dando como resultado un polipéptido que tiene seis dominios variables, el cual se asociará con otro polipép-

tido idéntico a una molécula dímera que se une a antígeno que tiene seis sitios de unión a antígeno. En otro aspecto, un dominio variable adicional de inmunoglobulina puede estar fusionado con una de las cadenas polipeptídicas de la molécula que se une a antígeno, que se asocia entonces de forma no covalente con un dominio variable complementario de inmunoglobulina con la misma especificidad que un tercer polipéptido adicional, formando de este modo un sitio de unión a antígeno adicional entre la molécula dímera que se une a antígeno y el tercer polipéptido adicional. En otro aspecto, una unidad adicional que se une a antígeno que incluye un scFv o un diacuerpo, puede estar enlazada como una unidad funcional adicional a la molécula dímera que se une a antígeno.

En un cierto aspecto, la unidad funcional adicional puede ser al menos una molécula dímera adicional que se une a antígeno, tal y como se describe en el presente documento. Por consiguiente, dos o más moléculas dímeras que se unen a antígeno de acuerdo con la invención pueden estar unidas entre sí para aumentar la valencia y la avidéz de las moléculas que se unen a antígeno.

En otro aspecto, la unidad funcional adicional puede ser un dominio efector que incluye un dominio Fc, un dominio CH2, un dominio CH3, un dominio bisagra o un fragmento de los mismos. Una unidad de este tipo puede conferir propiedades efectoras a la molécula que se une a antígeno en el caso de unión a receptores Fc. Tales unidades funcionales se pueden emplear adicionalmente para aumentar la semivida en suero de la molécula que se une a antígeno.

En otro aspecto, la unidad funcional adicional puede ser una enzima. En el caso en el que la enzima es capaz de convertir un profármaco en un fármaco activo, una molécula que se une a antígeno de este tipo se puede utilizar en una terapia con enzima para profármaco dependiente de anticuerpo (ADEPT). Para ello, la molécula que se une a antígeno dirige a la enzima hacia el tejido de interés y cuando la molécula que se une a antígeno se une al tejido, el profármaco se activa en ese sitio.

En otro aspecto, la unidad funcional puede ser un fármaco, una toxina, un radioisótopo, una linfocina, una quimiocina o una molécula marcada. Una molécula que se une a antígeno de este tipo entrega la unidad funcional en el sitio de acción deseado. Por ejemplo, un fármaco quimioterapéutico ligado a una molécula que se une a antígeno que es específica de un antígeno tumoral, se puede administrar a una célula tumoral y las toxinas se pueden administrar a agentes patógenos o células tumorales. Ejemplos de toxinas son, pero no se limitan a, ribosil transferasa, serina proteasa, activador de guanil ciclasa, adenil ciclasa dependiente de calmodulina, ribonucleasa, agente alquilante de ADN o inhibidor de la mitosis, por ejemplo, doxorubicina. La molécula marcadora puede ser, por ejemplo, una molécula fluorescente, luminiscente o radiomarcadora, un quelato metálico o una enzima (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, malato deshidrogenasa, glucosa oxidasa, ureasa, catalasa, etc.) la cual, a su vez, cuando se expone más tarde a un sustrato, reaccionará con el sustrato de tal manera que producirá un resto químico que se puede detectar y se puede utilizar para la formación de imágenes *in vivo* o inmunoensayos, cuando está enlazado con la molécula que se une a antígeno de acuerdo con la invención. Cuando se utiliza para un inmunoensayo, la molécula dímera que se une a antígeno también se puede inmovilizar sobre un soporte insoluble, por ejemplo, vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nailon, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, agarosa y perlas magnéticas.

Para aumentar la semivida en suero de las moléculas que se unen a antígeno de acuerdo con la invención, en el cuerpo, la molécula que se une a antígeno, si se desea, se puede fusionar con albúmina o pegilar, sializar o glicosilar (véase, por ejemplo, Stork et al., 2008, J. Biol. Chem., 283:7804-7.812).

La molécula dímera que se une a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente en esta memoria, se puede producir mediante la expresión de polinucleótidos que codifican las cadenas polipeptídicas individuales que se asocian entre sí para formar la molécula dímera que se une a antígeno. Por lo tanto, una realización adicional de la invención son polinucleótidos, por ejemplo, ADN o ARN, que codifican las cadenas polipeptídicas de la molécula dímera que se une a antígeno, tal y como se ha descrito anteriormente en este memoria.

Los polinucleótidos se pueden construir por métodos conocidos por la persona experta, por ejemplo, mediante la combinación de los genes que codifican el primer dominio V_LA, el segundo dominio V_HB, el tercer dominio V_LB y el cuarto dominio V_HA, o bien separados por enlazadores peptídicos o unidos directamente por un péptido unido, en una única estructura artificial genética, ligada funcionalmente a un promotor adecuado, y opcionalmente un terminador de la transcripción adecuado y que se expresa en bacterias u otro sistema de expresión apropiado. Dependiendo del sistema de vector y hospedador utilizados, se puede emplear cualquier cantidad de elementos de transcripción y traducción adecuados, incluyendo promotores constitutivos e inducibles. El promotor se selecciona de tal manera que dirige la expresión del polinucleótido en la célula hospedadora respectiva.

En los polinucleótidos se pueden optimizar los codones alterando el sesgo de los codones para adaptar la expresión particular en el hospedador seleccionado.

El polinucleótido se puede insertar en vectores, preferiblemente vectores de expresión, que representan una realización adicional de la invención. Estos vectores recombinantes se pueden construir de acuerdo con métodos bien conocidos por el experto en la técnica; véase, por ejemplo, Sambrook, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold

Spring Harbor Laboratory (1989) Nueva York.

Se puede utilizar una variedad de sistemas de expresión vector/hospedador para contener y expresar los polinucleótidos que codifican las cadenas polipeptídicas de la presente invención. Estos incluyen, pero no se limitan a, microorganismos tales como bacterias transformadas con un bacteriófago recombinante, un plásmido o vectores que expresan ADN de cósmido, levadura transformada con vectores de expresión de levadura; sistemas de células de insecto infectados con vectores de expresión de virus (por ejemplo, baculovirus); sistemas de células vegetales transformadas con vectores de expresión de virus (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o con vectores de expresión bacteriana (por ejemplo, plásmidos Ti o pBR322); o sistemas de células animales, para los cuales se pueden utilizar, por ejemplo, los sistemas de expresión basados en virus.

Un vector de expresión preferido en particular para la expresión en *E. coli* es pSKK (LeGall et al., J Immunol Methods (2004) 285(1):111-27) o pcDNA5 (Invitrogen) para la expresión en células de mamífero.

Por lo tanto, la molécula dímera que se une a antígeno tal y como se describe en la presente memoria se puede producir mediante la introducción de un polinucleótido o un vector que codifica la cadena polipeptídica tal como se ha descrito anteriormente, en una célula hospedadora, y cultivar dicha célula hospedadora en condiciones en las que se exprese la cadena polipeptídica. La molécula dímera que se une a antígeno obtenida a partir de las cadenas polipeptídicas expresadas se puede aislar y, opcionalmente, purificar adicionalmente. Las condiciones para el crecimiento y el mantenimiento de las células hospedadoras, la expresión, el aislamiento y la purificación de moléculas dímeras que se unen a antígeno de acuerdo con la invención, a partir de estas células hospedadoras, se describen ampliamente en la técnica.

En una realización adicional de la invención, se proporcionan composiciones que comprenden una molécula dímera que se une a antígeno o un polinucleótido tal y como se han descrito anteriormente en esta memoria y al menos un componente adicional. Para el uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad o trastorno, la composición que contiene la molécula dímera que se une a antígeno o la molécula de poli(ácido nucleico) que codifica las cadenas polipeptídicas que forman la molécula que se une a antígeno, se combina preferiblemente con un vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado. La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" se entiende que incluye cualquier vehículo, que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica de los ingredientes y que no es tóxico para el paciente al que se administra. Ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados son bien conocidos en la técnica e incluyen soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones de aceite/agua, diversos tipos de agentes humectantes, soluciones estériles, etc. Estos vehículos se pueden formular mediante métodos convencionales y se pueden administrar al sujeto en una dosis adecuada. Preferiblemente, las composiciones son estériles. Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como conservantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. Una prevención de la acción de los microorganismos se puede asegurar mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos. La administración de las composiciones adecuadas se puede efectuar mediante diferentes vías, por ejemplo, mediante administración por vía intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, tópica o intradérmica. La vía de administración, por supuesto, depende del tipo de terapia y del tipo de compuesto contenido en la composición farmacéutica. El régimen de dosificación será determinado por el médico encargado y otros factores clínicos. Como es bien conocido en las técnicas médicas, las dosificaciones para cualquier paciente dependen de muchos factores, incluyendo el tamaño del paciente, el área de superficie corporal, la edad, el sexo, el compuesto particular que se va a administrar, el tiempo y la vía de administración, el tipo de terapia, la salud general y otros fármacos que se administran al mismo tiempo.

En otro aspecto de la invención, la molécula dímera que se une a antígeno tal y como se ha descrito anteriormente en este documento, se utiliza en la preparación de un medicamento para el tratamiento de neoplasias malignas de linfocitos B (por ejemplo, linfoma de no Hodgkin; leucemia linfocítica crónica; linfoma de Hodgkin).

Los métodos para la preparación de composiciones farmacéuticas, es decir, medicamentos, y la aplicación clínica de moléculas que se unen a antígeno en la prevención y/o el tratamiento de enfermedades tales como, por ejemplo, el cáncer, son conocidos por el experto en la materia.

En un aspecto particular de la invención, la molécula dímera que se une a antígeno es biespecífica y se utiliza en la terapia contra el cáncer, debido a que tales anticuerpos se pueden usar para redirigir células efectoras citotóxicas contra células tumorales. Este concepto terapéutico es bien conocido en la técnica. Por ejemplo, estudios clínicos mostraron una regresión tumoral en pacientes tratados con un anticuerpo biespecífico anti-CD3 x antitumoral (por ejemplo, Canevari, S. et al., J. Natl. Cancer Inst., 87:1463-1469, 1996) o pacientes tratados con un anticuerpo biespecífico anti-CD16 x antitumoral (por ejemplo, Hartmann et al.; Clin Cancer Res. 2001; 7(7):1873-81). Una prueba de concepto también se ha mostrado para diversas moléculas de anticuerpos recombinantes biespecíficas que comprendían solo dominios variables (Fv), tales como, por ejemplo, moléculas dímeras y tetravalentes que se unen a antígeno CD3xCD19 que tenían un orden de los dominios V_HA-V_LB-V_HB-V_LA (Cochlovius et al.; Cancer Research, 2000, 60:4336-4341) o recientemente en estudios clínicos con moléculas de anticuerpo monómero de cadena sencilla Fv en formato BiTE[®] (dos anticuerpos de cadena sencilla con diferentes especificidades unidos entre sí; Micromet AG, Alemania; Bargou R. et al., Science, 2008, 321(5891):974-977; Baeuerle PA y Reinhardt C., Cancer Res. 2009, 69(12):4941-4944). Las moléculas dímeras que se unen a antígeno descritas en este documento se pueden utilizar como medicamentos y se aplican en métodos de tratamiento de una manera similar a los anticuerpos biespecíficos

de la técnica, ya que son capaces de redirigir mecanismos terapéuticos, por ejemplo, citotóxicos utilizando las mismas especificidades combinadas de anticuerpo.

La molécula que se une a antígeno y las composiciones de la misma pueden estar como una forma de dosificación oral, intravenosa, intraperitoneal u otras formas de dosificación farmacéuticamente aceptables. En algunas realizaciones, la composición se administra por vía oral y la forma de dosificación es un comprimido, una cápsula, un comprimido oblongo u otra forma disponible por vía oral. En algunas realizaciones, la composición es parenteral, por ejemplo, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular o subcutánea, y se administra por medio de una solución que contiene la molécula que se une a antígeno.

Una persona experta será capaz fácilmente de construir y obtener, sin una carga indebida, las moléculas que se unen a antígeno que se describen en el presente documento, mediante la utilización de técnicas establecidas y métodos convencionales conocidos en la técnica, véase por ejemplo Sambrook, Manual Molecular Cloning A Laboratory, Cold Spring Harbor laboratorio (1989) N.Y.; The Protein Protocols Handbook, editado por John M. Walker, Humana Press Inc. (2002); o Antibody engineering: methods and protocols / editado por Benny K.C. Lo; Benny K.C. II Series: Methods in molecular biology (Totowa, N.J.). Además, un experto en la materia será capaz de preparar las moléculas que se unen a antígeno descritas en esta memoria, utilizando métodos convencionales conocidos en la técnica y modificando los métodos descritos en el documento US 7.129.330, Kipriyanov et al. J. Mol. Biol. (1999) 293, 41-56 o Le Gall et al., 2004, Protein Engineering 17:357-366, de tal manera que se obtienen moléculas dímeras que se unen a antígeno tal y como se han descrito anteriormente, que comprenden dos cadenas polipeptídicas que tienen el orden de dominios V_L - V_H B- V_L B- V_H A, desde el extremo N-terminal al C-terminal de cada cadena polipeptídica.

El siguiente ejemplo ilustra adicionalmente la invención, sin limitar el alcance de la invención.

Ejemplo 1:

Para construir diacuerpos dímeros funcionales en tándem (TandAb[®]) utilizando una disposición de dominios distintos de V_H A- V_L B- V_H B- V_L A, varios de tales diacuerpos dímeros en tándem se construyeron con la disposición de dominios V_L A- V_H B- V_L B- V_H A de acuerdo con la invención, usando los dos dominios de un anticuerpo anti-CD19 de cadena sencilla humanizado y un anticuerpo anti-CD3 de cadena sencilla humanizado, respectivamente. Los resultados fueron confirmados mediante el uso de dos variantes de cada molécula que se une a antígeno, en representación de los productos de diferentes etapas de un procedimiento de maduración por afinidad que se realizó para ambos anticuerpos anti-CD3 humanizado y anti-CD19 humanizado.

Los anticuerpos monoclonales murinos HD37 y UCHT dirigidos contra CD19 y CD3, respectivamente, fueron el material de partida para la obtención de anticuerpos humanizados con afinidades relativamente altas. En cada caso, el dominio V_H se combinó primero con una genoteca de V_L humano en un vector fagémido scFv para seleccionar una cadena V_L humana adecuada mediante presentación en fagos. En una segunda etapa, la cadena de V_L humano seleccionada se combinó con una genoteca de dominios V_H en donde la región CDR3 se mantuvo constante. Este procedimiento dio lugar a un anticuerpo anti-CD19 y anti-CD3 humanizado, respectivamente, que solo contenía una secuencia murina corta en la región VHCDR3. Estos clones maduraron posteriormente por afinidad, introduciendo mutaciones puntuales en los residuos que se creía que participaban en la unión al antígeno. Los mutantes que se unían mejor, se seleccionaron a continuación mediante presentación en fagos. Los clones seleccionados para la construcción del TandAb eran M13 y M39 que se unían a CD19 y C4 y LcHC21 que se unía a CD3.

Se generaron los siguientes anticuerpos de acuerdo con la invención:

Anticuerpo A1: $CD19^{M39}xCD3^{C4}$ (opción 0) $V_H^{CD3C4-V_L^{CD19M39}}$ - $V_H^{CD19M39-V_L^{CD3C4}}$

Anticuerpo B: $CD19^{M39}xCD3^{C4}$ (opción 2) $V_H^{CD3C4-V_H^{CD19M39}}$ - $V_L^{CD19M39-V_H^{CD3C4}}$

Anticuerpo A2: $CD19^{M13}xCD3^{LCHC21}$ (opción 0) $V_H^{CD3LCHC21-V_L^{CD19M13}}$ - $V_H^{CD19M13-V_L^{CD3LCHC21}}$

Anticuerpo C: $CD19^{M13}xCD3^{LCHC21}$ (opción 2) $V_L^{CD3LCHC21-V_H^{CD19M13}}$ - $V_L^{CD19M13-V_H^{CD3LCHC21}}$

Los plásmidos que codificaban los monómeros híbridos $V_L^{CD3C4-V_H^{CD19M39}}$ - $V_L^{CD19M39-V_H^{CD3C4}}$ del anticuerpo B y $V_L^{D3LCHC21-V_H^{CD19M13}}$ - $V_L^{D19M13-V_H^{CD3LCHC21}}$ del anticuerpo C se generaron mediante modificación genética de ADN y un proveedor de procesamiento. La secuencia de la estructura principal del monómero $V_L^{CD3C4-V_H^{CD19M39}}$ - $V_L^{CD19M39-V_H^{CD3C4}}$ comprende las secuencias de ADN de dos anticuerpos scFv, a saber scFvCD19^{M39} y scFvCD3^{C4} respectivamente. La secuencia del monómero $V_L^{CD3LCHC21-V_H^{CD19M13}}$ - $V_L^{CD19M13-V_H^{CD3LCHC21}}$ combina los dominios variables de la cadena sencilla FvCD19^{M13} y la cadena sencilla FvCD3^{LCHC21}. Los cuatro scFv se obtuvieron mediante selección por presentación en fago de anticuerpos de cadena sencilla frente a los antígenos CD19 y CD3. En ambos casos, la información de la secuencia se utilizó para construir los monómeros híbridos anteriores. Un enlazador (G₂S)₃ de 9 aminoácidos se utilizó para enlazar los dominios entre sí. El gen sintetizado que codificaba $V_L^{CD3C4-V_H^{CD19M39}}$ - $V_L^{CD19M39-V_H^{CD3C4}}$ se clonó en el vector de expresión de mamífero pCDNA5FRT (Invitrogen). El gen de $V_L^{CD3LCHC21-V_H^{CD19M13}}$ - $V_L^{CD19M13-V_H^{CD3LCHC21}}$ también se clonó en un vector de expresión y se amplificó mediante PCR usando un cebador directo que introducía un sitio de escisión NcoI y un cebador inverso que introducía un sitio de escisión NotI.

Después del análisis y el aislamiento mediante gel de agarosa, el producto de la PCR se digirió posteriormente de forma doble con NcoI y NotI y se clonó en el vector pSKK3 linealizado con NcoI y NotI. La clonación correcta se confirmó mediante secuenciación de ADN.

5 El mapa del vector pCDNA5FRTB que codifica el anticuerpo B se muestra en la Fig. 6. El mapa del vector pSKK3 que codifica el anticuerpo C se muestra en la Fig. 7.

Para obtener una producción elevada, el vector que contenía el gen $V_L^{CD3C4}-V_H^{CD19M39}-V_L^{CD19M39}-V_H^{CD3C4}$ se transfirió transitoriamente (usando $CaPO_4$) en células HEK293 adherentes. La fermentación de proteínas se realizó en condiciones de crecimiento bien conocidas en la técnica.

10 La proteína recombinante se expresó como una proteína de fusión marcador His con un péptido señal. La proteína se aisló del material sobrenadante del cultivo celular mediante cromatografía de afinidad sobre metal inmovilizado (IMAC) tal y como se ha descrito (Kipriyanov et al., 1999, J. Mol. Biol., 293, 41-56). El material purificado se analizó posteriormente por SDS-PAGE. La tinción de Coomassie de un gel SDS PAGE y la cromatografía de exclusión por tamaño en una columna Superdex 200 HR10/30 calibrada (Amersham Pharmacia, Friburgo, Alemania) en tampón fosfato de sodio ($NaPO_4$ 30 mM arginina/HCl 0,75 M, pH 6,0), reveló una proteína recombinante pura y ensamblada
15 correctamente (Anticuerpo B).

Para una expresión a nivel elevado, el gen que codificaba el monómero $V_L^{CD3LCHC21}-V_H^{CD19M13}-V_L^{CD19M13}-V_H^{CD3LCHC21}$ humanizado seguido de marcador 6x His, se clonó en el plásmido pSKK3 que contenía el sistema suicida celular del gen hok/sok y un gen skp que codificaba el factor periplásmico Skp/OmpH (LeGall et al., 2004, J. Immunol. Methods, 285, 111-127). El plásmido se transfirió en una cepa de *E. coli* K12 (ATCC 31608®).

20 Las bacterias transformadas crecieron en matraces de agitación y se indujeron esencialmente como se ha descrito anteriormente (Cochlovius et al., 2000, J. Immunol., 165, 888-895). Las proteínas recombinantes se aislaron tanto a partir de la fracción periplásmica soluble como del material sobrenadante del medio bacteriano, mediante cromatografía de afinidad sobre metal inmovilizado (IMAC) como ya se ha descrito (Kipriyanov et al., 1999, J. Mol. Biol., 293, 41-56).

25 El material purificado se analizó posteriormente mediante SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie y cromatografía de exclusión por tamaño en una columna Superdex 200 HR10/30 calibrada (Amersham Pharmacia, Friburgo, Alemania) en tampón fosfato de sodio ($NaPO_4$ 30 mM arginina/HCl 0,75 M, pH 6,0). El producto parecía ser puro y estar ensamblado correctamente.

30 Los anticuerpos comparativos A1 y A2 se generaron de la misma manera que los anticuerpos B y C, respectivamente, en donde el orden de los dominios de los anticuerpos A1 y A2, respectivamente, se invirtió en comparación con el de los anticuerpos B y C, respectivamente.

35 Los ensayos de citotoxicidad se llevaron a cabo esencialmente como se ha descrito en T. Dreier et al. (2002, Int. J. Cancer 100, 690-697). Las PBMCs que se utilizaron como células efectoras se aislaron a partir de la sangre periférica de voluntarios sanos por centrifugación en gradiente de densidad. En algunos casos, las PBMCs se cultivaron durante una noche en presencia de 25 U/ml de IL-2 humana, antes de utilizarlas como células efectoras en el ensayo de citotoxicidad. La pureza y la expresión de antígenos de las PBMCs aisladas se comprobó mediante citometría de flujo en cada caso (datos no mostrados).

40 Células diana $CD19^+$ JOK-1 o Raji se cultivaron en medio RPMI 1640 complementado con 10% de FCS, L-glutamina 2 mM y 100 UI/ml de penicilina G sódica y 100 μ g/ml de sulfato de estreptomycin (en adelante denominado medio RPMI; todos los componentes eran de Invitrogen). Para el ensayo de citotoxicidad, las células se marcaron con calceína AM 10 μ M (Molecular Probes/Invitrogen) durante 30 min en medio RPMI sin FCS a 37°C. Después de lavar suavemente, las células marcadas se resuspendieron en medio RPMI hasta una densidad de 1×10^5 /mL. A continuación, se sembraron 1×10^4 células diana junto con 5×10^5 PBMCs con los anticuerpos indicados en pocillos individuales de una microplaca de fondo redondo de 96 pocillos, en un volumen total de 200 μ L/pocillo. Después de centrifugar durante 2 minutos a 200 g, el ensayo se incubó durante 4 horas a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO_2 . Quince minutos antes del final de la incubación, se añadieron 20 μ L de 10% de Triton X-100 en medio RPMI a los pocillos que solo tenían células diana. Se añadieron 20 μ L de medio RPMI a todos los demás pocillos. Se recogieron 100 μ L de material sobrenadante del cultivo celular de cada pocillo después de una centrifugación adicional durante 5 minutos a 500 g, y la fluorescencia de la calceína liberada se midió a 520 nm usando un lector de placas de fluorescencia (Victor 3, Perkin Elmer). Basándose en los recuentos medidos, la lisis celular específica se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula: $[fluorescencia (muestra) - fluorescencia (espontánea)] / [fluorescencia (máxima) - fluorescencia (espontánea)] \times 100\%$. La fluorescencia (espontánea) representa los recuentos de fluorescencia de las células diana en ausencia de células efectoras y anticuerpos, y la fluorescencia (máxima) representa la lisis celular total inducida por la adición de Triton X-100. Las curvas sigmoideas de respuesta a la dosis y los valores CE_{50} se calcularon utilizando el programa informático Prism (GraphPad).
55

Resultados:

Los resultados de los ensayos de citotoxicidad para anticuerpos en tándem que tienen el siguiente orden de domi-

nios, a partir del extremo N-terminal, $V_{H}A-V_{L}B-V_{H}B-V_{L}A$ (anticuerpo A) y $V_{L}A-V_{H}B-V_{L}B-V_{H}A$ (anticuerpo B), respectivamente, utilizando la variante anti-CD19 M39 y la variante anti-CD3 C4, se muestran en la Figura 3.

- 5 Sorprendentemente, había una diferencia muy grande en la actividad citotóxica de los dos diacuerpos en tándem. El diacuerpo en tándem que tenía la disposición de dominios de acuerdo con la invención, denominado "anticuerpo B" era más de 60 x más activo que el diacuerpo en tándem denominado "anticuerpo B" según se determinó mediante una comparación de sus valores CE_{50} en las condiciones dadas.

La superioridad de la disposición de dominios representada por la presente invención (anticuerpo C) para una mejor citotoxicidad, se confirmó mediante el uso de dos variantes adicionales de los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD19 (véase la Figura 4).

- 10 El valor CE_{50} del diacuerpo en tándem con el orden de dominios de acuerdo con la invención, representado por la opción 2, es extremadamente bajo (0,1 pM). Es 27x más activo que el TandAb representado por la opción 0 después de comparar los valores CE_{50} en las condiciones dadas.

REIVINDICACIONES

1. Una molécula dímera que se une a antígeno específica de CD3 y CD19, compuesta por una primera y una segunda cadena polipeptídica, comprendiendo cada una de la primera y la segunda cadenas polipeptídicas
- 5 - un primer dominio V_LA que es un dominio variable de cadena ligera específico de CD3;
- un segundo dominio V_HB que es un dominio variable de cadena pesada específico de CD19;
- un tercer dominio V_LB que es un dominio variable de cadena ligera específico de CD19; y
- un cuarto dominio V_HA que es un dominio variable de cadena pesada específico de CD3,
- en donde
- 10 - en la primera y la segunda cadena polipeptídica el primer dominio V_LA está enlazado con el segundo dominio V_HB a través de un primer enlazador L1, el segundo dominio V_HB está enlazado con el tercer dominio V_LB a través de un segundo enlazador L2 y el tercer dominio V_LB está enlazado con el cuarto dominio V_HA a través de un tercer enlazador L3, en donde los enlazadores L1, L2 y L3 consisten en 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 residuos de aminoácidos,
- 15 - dichos dominios están dispuestos en cada una de dichas primera y segunda cadenas polipeptídicas en el orden V_LA-V_HB-V_LB-V_HA desde el extremo N-terminal al C-terminal de dichas cadenas polipeptídicas en una orientación que evita el emparejamiento intramolecular, y
- el primer dominio V_LA de la primera cadena polipeptídica está asociado con el cuarto dominio V_HA de la segunda cadena polipeptídica para formar un sitio de unión a antígeno para el primer antígeno A;
- 20 - el segundo dominio V_HB de la primera cadena polipeptídica está asociado con el tercer dominio V_LB de la segunda cadena polipeptídica para formar un sitio de unión a antígeno para el segundo antígeno B;
- el tercer dominio V_LB de la primera cadena polipeptídica está asociado con el segundo dominio V_HB de la segunda cadena polipeptídica para formar un sitio de unión a antígeno para el segundo antígeno B; y
- 25 - el cuarto dominio V_HA de la primera cadena polipeptídica está asociado con el primer dominio V_LA de la segunda cadena polipeptídica para formar un sitio de unión a antígeno para el primer antígeno A.
2. La molécula que se une a antígeno según la reivindicación 1, en la que los enlazadores L1, L2 y/o L3 consisten en 9 residuos de aminoácidos contiguos.
3. La molécula que se une a antígeno según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en la que los dominios son dominios humanos o dominios humanizados.
- 30 4. La molécula que se une a antígeno según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicha molécula que se une a antígeno comprende al menos una unidad funcional adicional.
5. Una composición que comprende la molécula que se une a antígeno según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 35 6. La molécula que se une a antígeno según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para uso como medicamento.

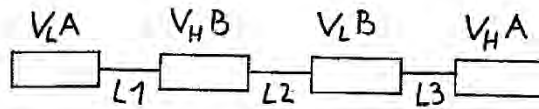


Fig.1

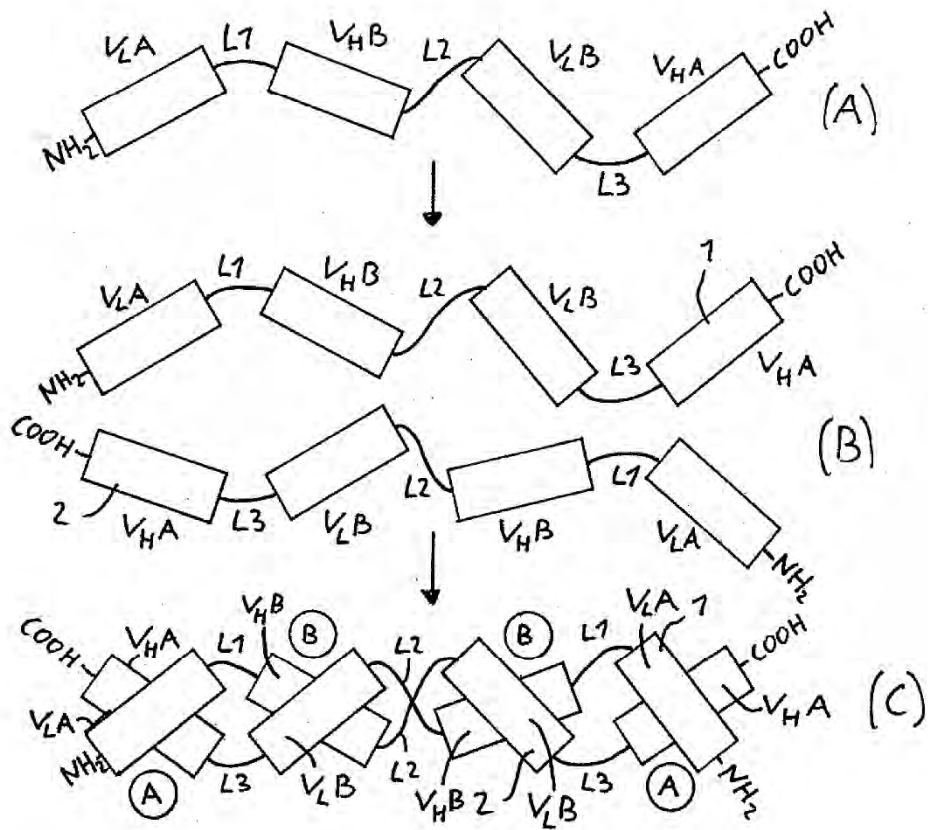


Fig.2

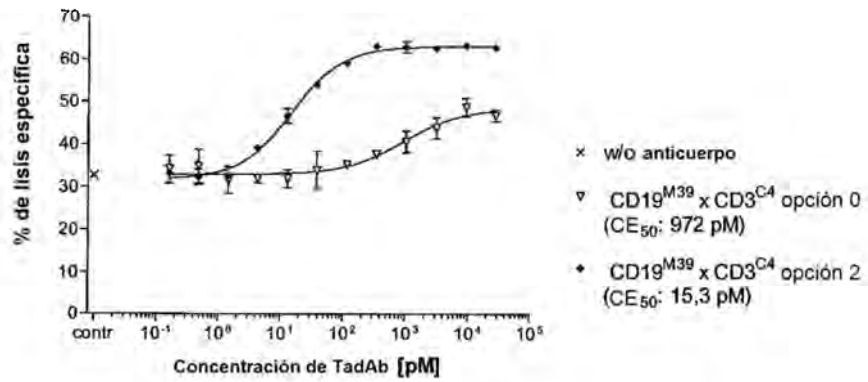


Fig. 3

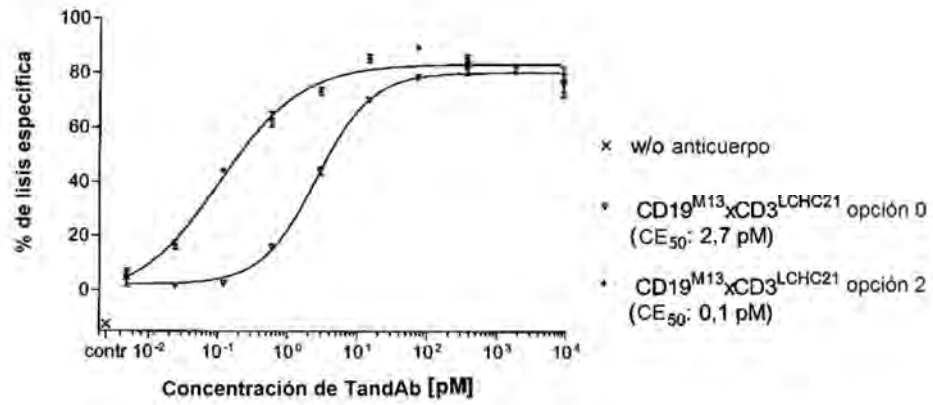


Fig. 4

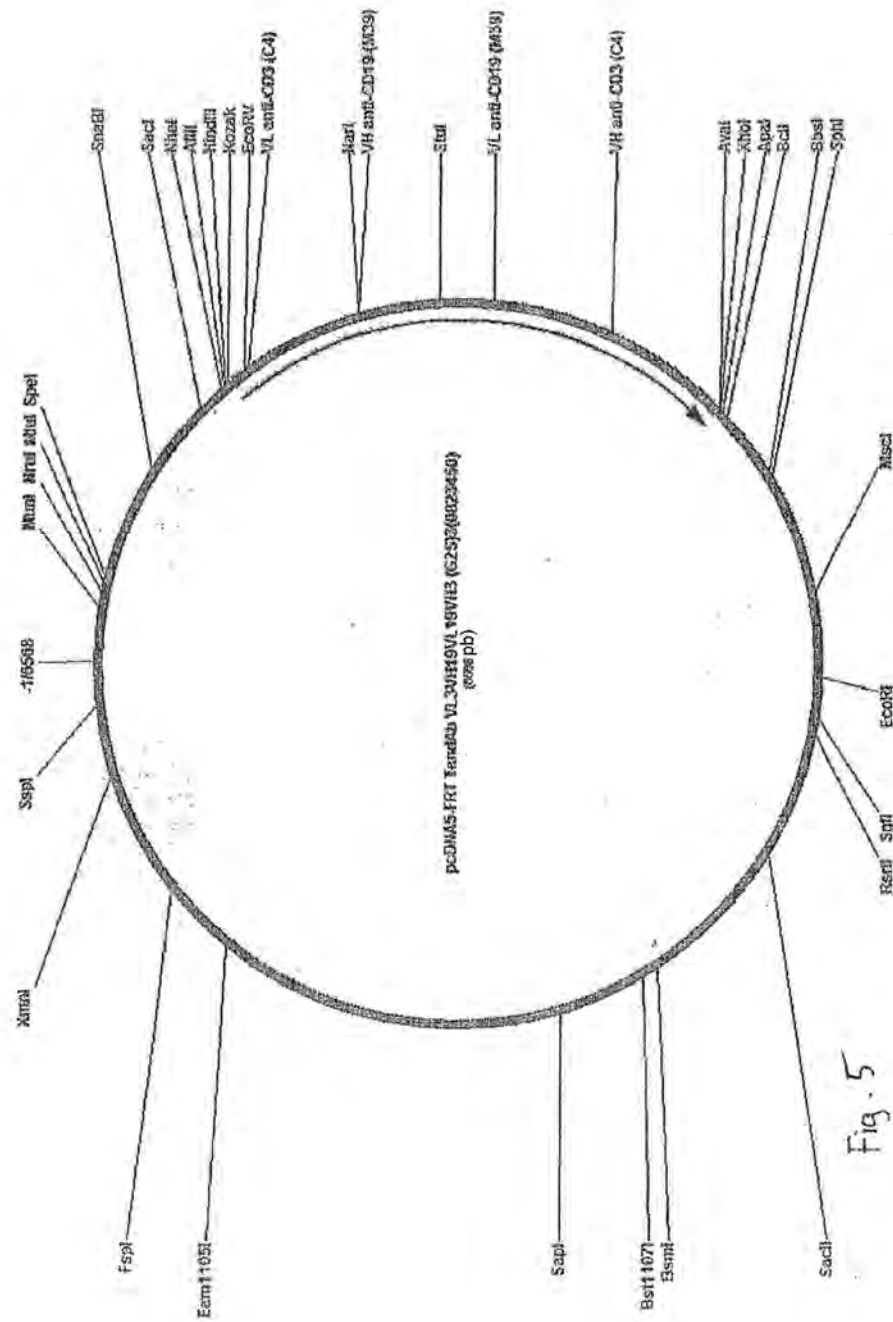


Fig. 5

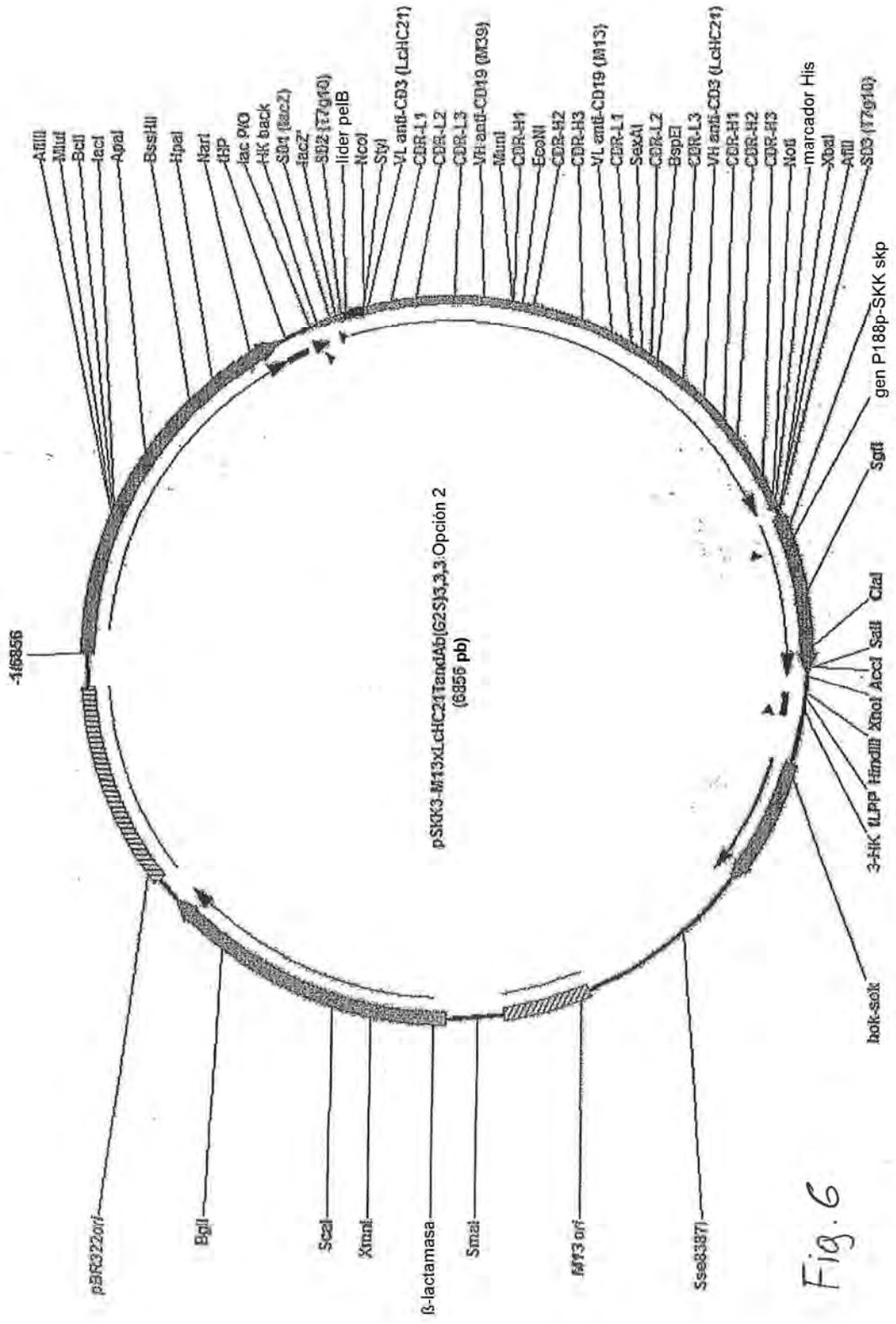


Fig. 6