

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 692 951**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.09.2013 PCT/NL2013/050693**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.04.2014 WO14051433**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.09.2013 E 13777349 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.09.2018 EP 2900694**

54 Título: **Anticuerpos IgG biespecíficos como acopladores de células T**

30 Prioridad:

**27.09.2012 US 201261706543 P**  
**14.06.2013 US 201361834915 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**05.12.2018**

73 Titular/es:

**MERUS N.V. (100.0%)**  
**Yalelaan 62**  
**3584 CM Utrecht, NL**

72 Inventor/es:

**BAKKER, ALEXANDER BERTHOLD HENDRIK;**  
**VAN LOO, PIETER FOKKO y**  
**LOGTENBERG, TON**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

**ES 2 692 951 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Anticuerpos IgG biespecíficos como acopladores de células T

## 5 Campo técnico

La invención se refiere al campo de la ingeniería de anticuerpos. En particular se refiere al campo de los anticuerpos terapéuticos (humanos) para el tratamiento de enfermedades relacionadas con células aberrantes. Más en particular se refiere a anticuerpos biespecíficos para el tratamiento de tumores.

## 10 Antecedentes de la invención

En los laboratorios, los anticuerpos biespecíficos se han usado ampliamente para el redireccionamiento de células efectoras inmunitarias a células tumorales. En este caso, un sitio de unión se dirige contra un antígeno asociado a tumor (TAA) y el segundo antígeno contra una molécula activadora en las células efectoras, tales como por ejemplo CD3 en células T (Kontermann, MABS 2012 (4) 182-197; Chames y Baty, MABS 2009 (1) 539-547; Moore y otros Blood 2011 (117) 4542-4551). Los primeros anticuerpos biespecíficos dirigidos a CD3 y a un antígeno asociado a células tumorales eran de naturaleza roedor y se produjeron con el uso de hibridomas híbridos (Liu y otros 1985 PNAS 82: 8648, Staerz y otros 1986 PNAS 83:1453, Lanzavecchia y otros 1987, Eur.J.Imm. 17:105). En estos hibridomas híbridos la redistribución de las cadenas pesadas y ligeras de Ig dio lugar a la producción de moléculas de anticuerpos funcionales biespecíficos dentro de un grupo mucho más grande de anticuerpos mono-específicos y biespecíficos no funcionales resultantes de la combinación errónea de cadenas pesadas y ligeras. Debido a su doble especificidad, estos anticuerpos biespecíficos funcionales fueron capaces de vincular linfocitos T citotóxicos (CTL) murinos y humanos a células diana y activar la función citotóxica lo que dio lugar a la lisis de células tumorales que muestran el antígeno relevante. Sin embargo, la inducción de la lisis de células tumorales mediada por IgG biespecífica CD3xTAA por células T humanas en reposo policlonales no podría lograrse a menos que se proporcione coestimulación mediante la adición de IL-2 exógena o AcM anti-CD28. Esto se ejemplifica mediante la molécula biespecífica CD3xCD19 híbrida IgG2b de rata/IgG1 de ratón que fue capaz de inducir la lisis de la línea de células tumorales REH B-ALL positivas para CD19 por linfocitos T humanos en reposo solo después de la coadministración de IL-2 (Haagen y otros 1995 Blood 85:3208). Zeidler y otros demostraron con el uso de una molécula CD3xEpcam IgG2b de rata/IgG2a de ratón similar que la lisis de células tumorales positivas para Epcam inducida por IgG biespecífica podía lograrse en cultivos celulares mixtos que comprenden células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células tumorales sin adición de IL2 exógena (Zeidler y otros 1999 J. Immunol. 163:1246). Los autores reivindicaron que el "tercer" brazo del anticuerpo, la región Fc, provoca este efecto a través de la interacción con células auxiliares positivas para el receptor de Fcγ presentes dentro de la fracción de PBMC. En particular, el fuerte potencial de activación se correlacionó con la combinación de subclases híbrida IgG2a de ratón/IgG2b de rata que, a diferencia de otras combinaciones informadas (por ejemplo, IgG2a de ratón/IgG1 de ratón o IgG2b de rata/IgG1 de ratón), no solo se une sino que también activa células auxiliares positivas para el receptor de Fcγ. Este denominado anticuerpo biespecífico CD3xEpcam triomAb, también conocido como catumaxomab, se ha desarrollado clínicamente y se ha registrado en Europa para el tratamiento paliativo de tumores abdominales de origen epitelial. Aunque este anticuerpo biespecífico ha demostrado claramente su eficacia clínica, su naturaleza de roedor induce respuestas inmunitarias contra el producto tras la dosificación repetida y por lo tanto impide una aplicación generalizada de este formato.

Se han explorado formatos CD3xTAA alternativos para solucionar los problemas de fabricación y los problemas de inmunogenicidad asociados con el formato triomAb de roedor híbrido. Con frecuencia tales formatos son moléculas de tipo inmunoglobulina que se desvían de moléculas de IgG humanas de longitud completa, e incluyen moléculas tales como moléculas de redireccionamiento de doble afinidad (Dual-Affinity Re-Targeting, DART™) desarrolladas por MacroGenics con sitio web en la red mundial en [macrogenics.com/Platforms-DART.html](http://macrogenics.com/Platforms-DART.html), moléculas acopladoras de células T biespecíficas (Bispecific T cell Engager, BiTE®) desarrolladas por Micromet, ahora Amgen (Sheridan C, Nat Biotechnol. 2012 (30):300-1), moléculas de inmunoglobulina con dominio variable doble (Dual Variable Domain - immunoglobulin, DVD-Ig™) desarrolladas por Abbott, y moléculas TandAb® RECRUIT desarrolladas por Affimed con sitio web en la red mundial en [affimed.com/tandab-recruit](http://affimed.com/tandab-recruit). Se demostró para uno de estos formatos que el redireccionamiento exitoso de linfocitos de sangre periférica para lisar células tumorales positivas para CD19 con el uso de un diacuerpo CD3xCD19 requería la preactivación de los linfocitos T de sangre periférica, ahora con el uso de anticuerpo anti-CD3 más IL-2 humana (Kipriyanov y otros 1998 Int.J.Can. 77:763). Otros formatos, tales como el formato CD3xTAA BiTE® de cadena simple bivalente Fv (Loffler y otros 2000 Blood 95:2098) no requieren la preactivación de células T en reposo y son capaces de inducir in vitro la lisis de células tumorales positivas para el antígeno de una manera extremadamente eficiente (Dreier y otros 2002 Int.J.Canc. 100:690). Estudios adicionales con el uso de BiTE® dirigidos a diferentes TAA revelaron que la potente eficacia del formato BiTE® se correlacionaba con el tamaño del antígeno y particularmente con la distancia del epítipo en el TAA a la membrana de la célula tumoral (Blumel y otros 2010 Cancer Immunol. Immunother. 59:1197). La formación eficaz de sinapsis de células T citolíticas se demostró para moléculas BiTE® que se explica que forma la base estructural de su potencia (Offner y otros Molecular Immunology 2006 (43) 763-771) que se cree además que esté asociada al tamaño pequeño del formato BiTE®. Si el tamaño es importante, esto podría sugerir que moléculas más grandes tales como IgG intacta serían demasiado grandes para formar sinapsis citolíticas eficaces. El BiTE® CD3xCD19,

blinatumomab, ha demostrado una eficacia clínica notable en pacientes con linfoma no Hodgkin y leucemia linfática aguda refractarios (Bargou y otros 2008 Science 321:974). Aunque el BiTE® CD3xCD19 muestra lisis de células tumorales muy eficiente a bajos niveles in vitro, la administración de este formato biespecífico a pacientes se asocia con retos significativos. Debido a su tamaño pequeño, los BiTE® se eliminan rápidamente de la circulación y la dosificación de los pacientes requiere por lo tanto una infusión continua. Dado que el régimen de dosificación tiene una duración total de más de 2 meses, este tratamiento tiene un impacto significativo sobre la calidad de vida de los pacientes.

Por lo tanto aún existe la necesidad de moléculas IgG biespecíficas de longitud completa eficaces que se acoplen a células T para erradicar células aberrantes que combinen una vida media en circulación larga tras la administración intravenosa sin necesidad de infusión continua sin ser inmunogénicas y solo con efectos secundarios limitados.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1: CLEC12A y secuencias relacionadas.

La Figura 2: Activación de células T por varios anticuerpos: IgG contra CD3 bivalente monoclonal, IgG biespecífica CD3xCLEC12, IgG biespecífica CD3xcontrol de isotipo, IgG contra CLEC12A bivalente monoclonal, IgG control de isotipo bivalente monoclonal.

La Figura 3: Lisis específica de células HL60 por IgG biespecífica CD3xCLEC12A y anticuerpos de control.

La Figura 4: Lisis específica de células HL60 por IgG biespecífica CD3xCLEC12A y anticuerpos de control (relaciones E:D).

La Figura 5: Lisis específica de células HL60 con varias moléculas de IgG biespecífica CD3xCLEC12A que consisten en varios brazos contra CLEC12A & brazo contra CD3 fijo, y anticuerpos de control.

La Figura 6: Lisis específica de células HL60 con IgG biespecífica CD3xCLEC12A en combinación con silenciamiento de Fc (DM=doble mutante; TM= triple mutante; WT=silvestre, sin silenciamiento de Fc).

La Figura 7: El silenciamiento de Fc no afecta la unión a FcRn.

La Figura 8: Inducción de la proliferación de células T específica de diana del Acbe CD3xCLEC12A.

La Figura 9: Compartimiento de células T CD8+ de pacientes con AML en comparación con donantes sanos.

La Figura 10: Activación de células T y lisis de células tumorales HL60 específicas inducidas por CD3xCLEC12A con DM-Fc por células T de pacientes con AML.

La Figura 11: Lisis específica de blastos de AML por células T autólogas de pacientes con AML.

La Figura 12: Lisis específica de monocitos por células T de pacientes.

La Figura 13: El silenciamiento de Fc elimina significativamente la liberación de citocinas por células circulantes.

La Figura 14A: Tinción por FACS de anticuerpos anti-CD3 en células HPB-ALL

La Figura 14B: IgG unida a placa, células T etiquetadas con CFSE, lectura en el día 5 por FACS

Figura 15: ensayo de citotoxicidad en HL60

Figura 16: Tinción por FACS de anticuerpos anti-CLEC12A en células HL60

La Figura 17: Ensayos de citotoxicidad en HL60

Figura 18: Análisis de FACS

Figura 19: Ensayos de citotoxicidad en HL60

Figura 20: Secuencias de VH de los brazos Fab específicos para CD3 y específicos para CLEC12A. Secuencia de VL de la cadena ligera común 012. Las secuencias de las CDR están en negritas y subrayadas.

Resumen de la invención

La presente invención se refiere a un anticuerpo IgG biespecífico de longitud completa completamente humano para el tratamiento de AML. Un brazo del anticuerpo se une a un epítipo en células efectoras inmunitarias, CD3, mientras que el otro brazo se dirige a CLEC12A, una diana de superficie específica de células mieloides que se expresa en 90-95 % de los pacientes con AML de novo y recidivante. CLEC12A se expresa en células madre leucémicas de AML, pero no en células hematopoyéticas normales. A diferencia de CD33, CLEC12A no se expresa en precursores eritroides o en megacariocitos, de modo que el anticuerpo IgG1 biespecífico CD3xCLEC12A de la presente invención no debe inducir la reducción de plaquetas o glóbulos rojos. Los experimentos con colonias de células de médula ósea han demostrado que la reducción de células CLEC12A+ en médula ósea normal no afecta los linajes mieloides que producen plaquetas y glóbulos rojos. Un anticuerpo IgG biespecífico CD3xCLEC12A de acuerdo con la presente invención en una modalidad preferida contiene una región Fc modificada a fin de reducir la activación inmunitaria no específica resultante del acoplamiento de células T y células que expresan FcγR dentro de las PBMC. En base a los datos descritos para el anticuerpo biespecífico triomAb en el estado de la técnica se dudaba mucho que una IgG biespecífica CD3xTAA de un formato IgG1 completamente humano fuera capaz de inducir actividad antitumoral lítica en linfocitos de sangre periférica en reposo sin necesidad de preactivación de células T. Además, los datos disponibles para el formato BiTE® sugerían que una molécula de IgG de longitud completa sería demasiado grande para crear sinapsis citolíticas eficaces entre células tumorales y células efectoras. Sorprendentemente, se demostró que una IgG1 biespecífica CD3xCLEC12A de longitud completa completamente humana era capaz de inducir in vitro la lisis mediada por células T muy eficiente de células tumorales de AML HL60 positivas para CLEC12A. De hecho, la lisis eficaz estuvo mediada por linfocitos T en reposo purificados a partir de PBMC sin necesidad de activación previa de las células T. Además, se demostró que esta actividad lítica no depende necesariamente de las interacciones con el FcγR presente en células HL60 dado que esta actividad lítica

no se afectó por la presencia de exceso de IgG humana cuando el ensayo se realizó en medio que contiene suero humano. Esta es la primera vez que un anticuerpo IgG1 acoplador de células T biespecífico humano de longitud completa ejerce lisis de células tumorales eficiente sin necesidad de preactivación de células T o necesidad de interacciones con FcγR activo. La lisis eficaz se logra a pesar del tamaño relativamente grande de la IgG1 en comparación con moléculas BiTE®. Notablemente, cuando se introdujeron mutaciones en CH2/bisagra inferior en la molécula IgG1 biespecífica CD3xCLEC12A para disminuir aún más las interacciones con el receptor de Fc, esto aún dio lugar a la lisis eficiente de células tumorales por células efectoras inmunitarias. Un anticuerpo IgG1 acoplador de células T biespecífico humano tiene ventajas respecto a la IgG actual que usa la combinación de subclases híbrida IgG2a de ratón/IgG2b de rata, dado que una IgG1 humana será menos inmunogénica y por lo tanto puede aplicarse para la terapia repetida. Además, un anticuerpo IgG1 acoplador de células T biespecífico humano de longitud completa tiene ventajas respecto a moléculas de tipo inmunoglobulina tales como DART™, TandAb® o BiTE® dado que la IgG1 humana de longitud completa no se elimina rápidamente de la circulación y por lo tanto la dosificación de los pacientes no requerirá infusión continua, lo que es más beneficioso para los pacientes.

Modalidades

La invención proporciona un anticuerpo IgG biespecífico de acuerdo con las reivindicaciones, en donde dicho anticuerpo IgG biespecífico comprende un brazo que reconoce específicamente CLEC12A y un segundo brazo que reconoce específicamente un antígeno en células efectoras inmunitarias, CD3, capaz de reclutar tales células hacia una célula aberrante que expresa CLEC12A.

Como se usa en la presente, el término "reconoce específicamente CLEC12A" significa que dicho brazo tiene la capacidad de reconocer específicamente CLEC12A, en la situación en que CLEC12A esté presente cerca de dicho anticuerpo. Del mismo modo, el término "reconoce específicamente un antígeno en células efectoras inmunitarias" significa que dicho brazo tiene la capacidad de reconocer específicamente dicho antígeno cuando dicho antígeno está presente cerca de dicho anticuerpo. Tal reconocimiento del antígeno por un anticuerpo está mediado típicamente a través de las regiones de complementariedad del anticuerpo y la estructura tridimensional específica tanto del antígeno como del brazo del anticuerpo lo que permite a estas dos estructuras unirse entre sí con precisión (una interacción similar a una cerradura y su llave), al contrario de la adhesión aleatoria, no específica de anticuerpos. Dado que un anticuerpo reconoce típicamente un epítipo de un antígeno, y que tal epítipo también puede estar presente en otros compuestos, los anticuerpos de acuerdo con la presente invención que "reconocen específicamente CLEC12A", y "reconocen específicamente un antígeno en células efectoras inmunitarias" también pueden reconocer otros compuestos, si tales otros compuestos contienen el mismo tipo de epítipo. Por tanto, los términos "reconoce específicamente CLEC12A", "reconoce específicamente un antígeno en células efectoras inmunitarias" y "reconoce específicamente CD3" no excluyen la unión de los anticuerpos a otros compuestos que contienen el mismo (tipo de) epítipo. En su lugar, se permite la reactividad cruzada. Un anticuerpo de acuerdo con la presente invención es capaz típicamente de unirse a CLEC12A y a un antígeno en células efectoras inmunitarias, CD3, con una afinidad de unión de al menos  $1 \times 10^{-5}$  M, como se explica en más detalle a continuación.

El término "anticuerpo" como se usa en la presente significa una molécula proteica perteneciente a la clase de proteínas inmunoglobulinas, que contiene uno o más dominios que se unen a un epítipo en un antígeno, donde tales dominios se derivan de o comparten homología de secuencia con la región variable de un anticuerpo. Los anticuerpos para uso terapéutico son preferentemente tan cercanos a los anticuerpos naturales del sujeto a tratar como sea posible (por ejemplo anticuerpos humanos para sujetos humanos). La unión del anticuerpo puede expresarse en términos de especificidad y afinidad. La especificidad determina qué antígeno o epítipo de este se une específicamente por el dominio de unión. La afinidad es una medida de la fortaleza de la unión a un antígeno o epítipo particular. La unión específica, o "reconocimiento específico" se define como la unión con afinidades (KD) de al menos  $1 \times 10^{-5}$  M, con mayor preferencia  $1 \times 10^{-7}$  M, con mayor preferencia mayor que  $1 \times 10^{-9}$  M. Típicamente, los anticuerpos para aplicaciones terapéuticas tienen afinidades de hasta  $1 \times 10^{-10}$  M o incluso superiores. Los anticuerpos de la presente invención son típicamente anticuerpos biespecíficos de longitud completa de la subclase IgG humana. Preferentemente, los anticuerpos de la presente invención son de la subclase IgG1 humana.

El término 'IgG de longitud completa' de acuerdo con la invención se define como que comprende una IgG esencialmente completa, que sin embargo no tiene necesariamente todas las funciones de una IgG intacta. Para evitar dudas, una IgG de longitud completa contiene dos cadenas pesadas y dos ligeras. Cada cadena contiene regiones constantes (C) y variables (V), que pueden dividirse en dominios designados CH1, CH2, CH3, VH, y CL, VL. Un anticuerpo IgG se une a un antígeno por medio de los dominios de región variable contenidos en la porción Fab, y después de la unión puede interactuar con moléculas y células del sistema inmunitario a través de los dominios constantes, principalmente a través de la porción Fc. Los términos 'dominio de región variable', 'región variable', 'dominio variable', 'pareja VH/VL', 'VH/VL', 'porción Fab', 'brazo Fab', 'Fab' o 'brazo' se usan indistintamente en la presente. Los anticuerpos de longitud completa de acuerdo con la invención abarcan moléculas de IgG en donde pueden estar presentes mutaciones que proporcionan características deseadas. Tales mutaciones no deben ser deleciones de porciones sustanciales de cualquiera de las regiones. Sin embargo, las moléculas de IgG en donde se eliminan uno o varios residuos de aminoácidos, sin alterar esencialmente las características de unión de la molécula de IgG resultante, se incluyen dentro del término "IgG de longitud completa". Por ejemplo, tales moléculas

de IgG pueden tener una o más deleciones de entre 1 y 10 residuos de aminoácidos, preferentemente en regiones que no son CDR, en donde los aminoácidos eliminados no son esenciales para la especificidad de unión de la IgG.

5 Los anticuerpos IgG de longitud completa se prefieren debido a su vida media favorable y la necesidad de permanecer tan cerca de las moléculas completamente autólogas (humanas) por razones de inmunogenicidad. De acuerdo con la invención, se usan anticuerpos IgG biespecíficos. En una modalidad preferida, se usan anticuerpos IgG1 biespecíficos de longitud completa. La IgG1 se favorece en base a su vida media en circulación larga en el hombre. Para impedir cualquier inmunogenicidad en seres humanos se prefiere que el anticuerpo IgG biespecífico de acuerdo con la invención sea una IgG1 humana. El término 'biespecífico' (be) significa que un brazo del anticuerpo se une a un primer antígeno mientras que el segundo brazo se une a un segundo antígeno, en donde dichos primer y segundo antígenos no son idénticos. De acuerdo con la presente invención, dichos primer y segundo antígenos son de hecho dos moléculas diferentes ubicadas en dos tipos de células diferentes. El término 'un brazo [del anticuerpo]' significa preferentemente una porción Fab del anticuerpo IgG de longitud completa. Los anticuerpos biespecíficos que median la citotoxicidad mediante el reclutamiento y la activación de células inmunitarias endógenas son una clase emergente de anticuerpos terapéuticos de nueva generación. Esto puede lograrse mediante la combinación de las especificidades de unión a antígeno para células diana (es decir, células tumorales) y células efectoras (es decir, células T, células NK, y macrófagos) en una molécula (Cui y otros JBC 2012 (287) 28206-28214; Kontermann, MABS 2012 (4) 182-197; Chames y Baty, MABS 2009 (1) 539-547; Moore y otros Blood 2011 (117) 4542-4551; Loffler y otros 2000 Blood 95:2098; Zeidler y otros 1999 J. Immunol. 163:1246). De acuerdo con la invención, se proporcionan anticuerpos biespecíficos en donde un brazo se une al antígeno CLEC12A en células aberrantes (tumorales) mientras que el segundo brazo se une a un antígeno en células efectoras inmunitarias.

25 El término 'CLEC12A' como se usa en la presente se refiere al miembro A de la familia 12 de dominios de lectina de tipo C, también conocido como molécula 1 tipo lectina de tipo C (CLL-1), un antígeno que se expresa en células blásticas leucémicas y en células madre leucémicas en la leucemia mieloide aguda (AML), que incluyen las células madre leucémicas negativas para CD34 o con baja expresión de CD34 (población secundaria) (A.B. Bakker y otros Cancer Res 2004, 64, p8443-50; Van Rhenen y otros 2007 Blood 110:2659; Moshaver y otros 2008 Stem Cells 26:3059). De cualquier otra manera la expresión de CLEC12A se restringe al linaje hematopoyético, particularmente a células mieloides en sangre periférica y médula ósea, es decir, granulocitos, monocitos y precursores de células dendríticas. Más importante aún, CLEC12A está ausente en células madre hematopoyéticas. Este perfil de expresión hace de CLEC12A una diana particularmente favorable en AML. Los nombres alternativos para CLEC12A incluyen lectina 2 de tipo C asociada a células dendríticas (DCAL-2), receptor tipo lectina de tipo C inhibidor mieloide (MICL) y subfamilia L de receptores tipo lectina de células asesinas, miembro 1 (KLRL1) (Zhang W. y otros núm. de registro de GenBank: AF247788; A.S. Marshall, y otros J Biol Chem 2004, 279, p14792-802; núm. de registro de GenBank: AY498550; Y.Han y otros Blood 2004, 104, p2858-66; H.Floyd, y otros núm. de registro de GenBank: AY426759; C.H.Chen, y otros Blood 2006, 107, p1459-67). Un alineamiento de estas secuencias se representa en la Figura 1. La forma de longitud completa de CLEC12A comprende 275 residuos de aminoácidos, que incluyen un segmento intracelular adicional de 10 aminoácidos que está ausente en la mayoría de las otras isoformas, y muestra el perfil de expresión estrictamente mieloide (expresión en superficie y nivel de ARNm). El término 'CLEC12A' significa todas las variantes a las que se hizo referencia anteriormente.

45 El término 'células aberrantes' como se usa en la presente incluye células tumorales, más específicamente células tumorales de origen hematológico que incluyen además células preleucémicas tales como células que provocan síndromes mielodisplásicos (MDS) y células leucémicas tales como células tumorales de leucemia mieloide aguda (AML) o células de leucemia mielógena crónica (CML).

50 El término 'célula efectora inmunitaria' o 'célula efectora' como se usa en la presente se refiere a una célula dentro del repertorio natural de células en el sistema inmunitario de mamíferos que puede activarse para afectar la viabilidad de una célula diana. Las células efectoras inmunitarias incluyen células del linaje linfóide tales como células asesinas naturales (NK), células T que incluyen células T citotóxicas, o células B, pero las células del linaje mieloide también pueden considerarse células efectoras inmunitarias, tales como monocitos o macrófagos, células dendríticas y granulocitos neutrófilos. Por tanto, dicha célula efectora es preferentemente una célula NK, una célula T, una célula B, un monocito, un macrófago, una célula dendrítica o un granulocito neutrófilo. De acuerdo con la invención, el reclutamiento de células efectoras hacia células aberrantes significa que las células efectoras inmunitarias se acercan a las células diana aberrantes de manera que las células efectoras pueden causar directamente, o iniciar indirectamente la muerte de las células aberrantes hacia las que se reclutan. Para evitar interacciones no específicas se prefiere que los anticuerpos biespecíficos de la invención reconozcan específicamente los antígenos en células efectoras inmunitarias que al menos se sobreexpresan en estas células efectoras inmunitarias en comparación con otras células en el cuerpo. Los antígenos diana presentes en células efectoras inmunitarias incluyen CD3. Preferentemente, el antígeno en células efectoras inmunitarias es CD3 expresado en células T. El antígeno más preferido en una célula efectora inmunitaria es la cadena CD3ε. Se ha demostrado que este antígeno es muy eficaz para reclutar células T hacia células aberrantes. Por tanto, un anticuerpo IgG biespecífico de acuerdo con la presente invención contiene preferentemente un brazo que reconoce específicamente CD3ε.

Por lo tanto, la invención proporciona un anticuerpo IgG biespecífico de longitud completa de acuerdo con las reivindicaciones, en donde dicho anticuerpo biespecífico comprende un brazo que reconoce específicamente CLEC12A y un segundo brazo que reconoce específicamente un antígeno CD3 en células efectoras inmunitarias capaz de reclutar tales células hacia una célula aberrante que expresa CLEC12A, en donde dichas células efectoras inmunitarias comprenden células T. La invención proporciona un anticuerpo IgG biespecífico de acuerdo con la invención en donde dicho antígeno en dichas células efectoras inmunitarias es CD3, preferentemente CD3ε humano.

La invención proporciona un anticuerpo IgG biespecífico de acuerdo con las reivindicaciones en donde ambos brazos comprenden una cadena ligera común. El término 'cadena ligera común' de acuerdo con la invención se refiere a cadenas ligeras que pueden ser idénticas o tener algunas diferencias en la secuencia de aminoácidos mientras conservan la especificidad de unión del anticuerpo. Es posible por ejemplo dentro del alcance de la definición de cadenas ligeras comunes como se usa en la presente, preparar o encontrar cadenas ligeras que no son idénticas pero aún así funcionalmente equivalentes, por ejemplo, mediante la introducción y prueba de cambios conservativos de aminoácidos, cambios de aminoácidos en regiones que no contribuyen o contribuyen solo en parte a la especificidad de unión cuando se combinan con la cadena pesada, y similares. Los términos 'cadena ligera común', 'VL común', 'cadena ligera individual', 'VL individual', con o sin la adición del término 'reordenada' se usan indistintamente en la presente. La presente invención usa como cadena ligera común una cadena ligera humana que puede combinarse con diferentes cadenas pesadas para formar anticuerpos con dominios de unión a antígeno funcionales (documentos WO2004/009618, WO2009/157771, Merchant y otros 1998, Nissim y otros 1994). Preferentemente, la cadena ligera común tiene una secuencia de línea germinal. Una secuencia de línea germinal preferida es una región variable de cadena ligera que se usa frecuentemente en el repertorio humano y tiene capacidad superior para combinarse con muchas regiones VH diferentes, y tiene buena estabilidad termodinámica, rendimiento y solubilidad. Una cadena ligera de línea germinal de máxima preferencia es 012, preferentemente la cadena ligera kappa humana de línea germinal reordenada IgVκ1-39\*01/IGJk1\*01 (nomenclatura de acuerdo con la base de datos IMGT con sitio web en la red mundial en imgt.org) o fragmento o un derivado funcional de esta. Los términos cadena ligera kappa humana de línea germinal reordenada IgVκ1-39\*01/IGJk1\*01, IGKV1-39/IGKJ1, cadena ligera huVκ1-39 o abreviado huVκ1-39 se usan indistintamente en toda la solicitud. Obviamente, los expertos en la técnica reconocerán que "común" también se refiere a equivalentes funcionales de la cadena ligera cuya secuencia de aminoácidos no es idéntica. Existen muchas variantes de dicha cadena ligera en donde están presentes mutaciones (deleciones, sustituciones, adiciones) que no influyen materialmente en la formación de regiones de unión funcionales.

En una modalidad particularmente preferida se proporciona un anticuerpo IgG biespecífico de acuerdo con la invención en donde el brazo que reconoce específicamente CLEC12A comprende una secuencia de CDR1 de cadena pesada que consiste en una secuencia que es idéntica a SGYTFTSY y una secuencia de CDR2 de cadena pesada que consiste en una secuencia que es idéntica a IINPSGGS y una secuencia de CDR3 de cadena pesada que consiste en una secuencia que es idéntica a GTTGDWFD. Las secuencias de CDR mencionadas son las secuencias de CDR del brazo Fab de 4327 que, como se muestra en los Ejemplos, tiene buenas propiedades de unión a CLEC12A. La secuencia de cadena pesada del brazo Fab de 4327, por tanto la VH del anticuerpo específico para CLEC12A 4327, se muestra en la Figura 20. En una modalidad preferida, un anticuerpo IgG biespecífico de acuerdo con la invención comprende una secuencia variable de cadena pesada (VH) que es idéntica a esta VH del anticuerpo 4327. Por lo tanto se proporciona además un anticuerpo IgG biespecífico de acuerdo con la invención, en donde el brazo que reconoce específicamente CLEC12A comprende una secuencia de VH que consiste en una secuencia que es idéntica a la secuencia QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCSCKASGYTFTSYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGS TSYAQKFQGRVTMTRDTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAKGTGDFDYWGQGLTV TVS. Como se muestra en los Ejemplos, los anticuerpos biespecíficos de acuerdo con la invención que contienen la secuencia de VH mencionada anteriormente, junto con una secuencia de VH de un brazo Fab que reconoce CD3 (y junto con una cadena ligera común), tienen una excelente capacidad de inducir la lisis mediada por células T de células tumorales de AML positivas para CLEC12A.

En una modalidad preferida adicional se proporciona un anticuerpo IgG biespecífico de acuerdo con la invención en donde el brazo que reconoce específicamente CLEC12A comprende una secuencia de CDR1 de cadena pesada que consiste en una secuencia que es idéntica a SGYTFTSY y una secuencia de CDR2 de cadena pesada que consiste en una secuencia que es idéntica a IINPSGGS y una secuencia de CDR3 de cadena pesada que consiste en una secuencia que es idéntica a GNYGDEFDY. Las secuencias de CDR mencionadas son las secuencias de CDR de la región VH del anticuerpo 4331 que, como se muestra en los Ejemplos, tiene buenas propiedades de unión a CLEC12A. La secuencia de VH del brazo Fab de 4331 también se muestra en la Figura 20. En una modalidad preferida, un anticuerpo IgG biespecífico de acuerdo con la invención comprende una secuencia de VH que es idéntica a esta VH del brazo Fab de 4331. Por lo tanto se proporciona además un anticuerpo IgG biespecífico de acuerdo con la invención, en donde el brazo que reconoce específicamente CLEC12A comprende una secuencia de VH que consiste en una secuencia que es idéntica a la secuencia EVQLVQSGAEVKKPGASVKVCSCKASGYTFTSYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGS TSYAQKFQGRVTMTRDTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGNYGDEFDYWGQGLTV TVSS. Como se muestra en

los Ejemplos, los anticuerpos biespecíficos de acuerdo con la invención que contienen la secuencia de VH del brazo Fab de 4331, junto con una secuencia de VH de un brazo Fab que reconoce CD3, (junto con una cadena ligera común) tienen una excelente capacidad de inducir la lisis mediada por células T de células tumorales de AML positivas para CLEC12A.

5 En una modalidad preferida adicional se proporciona un anticuerpo IgG biespecífico de acuerdo con la invención en donde el segundo brazo reconoce específicamente CD3 y comprende una secuencia de CDR1 de cadena pesada que consiste en la secuencia SYGMH y una secuencia de CDR2 de cadena pesada que consiste en la secuencia IIWYSGSKKNYADSVKG y una secuencia de CDR3 de cadena pesada que consiste en la secuencia GTGYNWFDP.

10 Preferentemente, dicho brazo específico para CD3 comprende una secuencia de VH que consiste en la secuencia QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFRSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIIWYSGSK  
KNYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGTGYNWFDPWGQGLTV TVSS. Las secuencias de CDR y la secuencia de VH mencionadas son las secuencias del anticuerpo 3896. Estas secuencias también se representan en la Figura 20. Una cadena pesada que comprende estas secuencias de CDR específicas para CD3

15 y/o la secuencia de VH del brazo Fab de 3896 mencionada se prefieren para un anticuerpo IgG biespecífico de acuerdo con la invención, dado que estas secuencias proporcionan al anticuerpo biespecífico una afinidad óptima por células inmunitarias que expresan CD3, mientras permiten de forma simultánea la unión suficiente a células tumorales de AML positivas para CLEC12A. Sin desear estar ligado a la teoría, se piensa que el efecto general de un anticuerpo biespecífico está determinado por el efecto combinado de la afinidad de un brazo para el antígeno 1 y

20 la afinidad del otro brazo para el antígeno 2. Para un anticuerpo de la presente invención, que tiene una especificidad por CLEC12A y un antígeno en células efectoras inmunitarias, CD3, se prefiere una sincronización optimizada de la unión a células inmunitarias positivas para CD3 y células tumorales que expresan CLEC12A para inducir eficientemente la lisis mediada por células T de células tumorales positivas para CLEC12A. Se plantea la hipótesis de que el equilibrio entre las afinidades de un anticuerpo biespecífico CLEC12A/CD3 es de suma

25 importancia. Se piensa que una afinidad significativamente mayor por CD3 frente a una afinidad mucho menor por CLEC12A (es decir, una afinidad demasiado alta por CD3) dará lugar a una situación en donde los anticuerpos se unirán principalmente a células T que expresan CD3. Tales células T 'cargadas de anticuerpo biespecífico' pueden internalizar sus CD3 o pueden invadir los tejidos para de este modo abandonar la circulación incluso antes de haber encontrado una célula tumoral positiva para CLEC12A. Esto disminuiría el efecto terapéutico del anticuerpo

30 biespecífico.

En un modo de acción más favorable, las células tumorales positivas para CLEC12A se unen primero a uno o más anticuerpos biespecíficos de acuerdo con la invención, donde después las células T son atraídas por el brazo contra

35 CD3 libre del anticuerpo biespecífico y tiene lugar la activación posterior de células T. Alternativamente, las células T positivas para CD3 y las células tumorales positivas para CLEC12A se unen esencialmente de forma simultánea al anticuerpo biespecífico. Por tanto, las afinidades tanto por CLEC12A como por un antígeno en células efectoras inmunitarias, CD3, se eligen o se modulan preferentemente de manera que se logre el equilibrio correcto, es decir que los anticuerpos biespecíficos resultantes se unan a CLEC12A y CD3 esencialmente de forma simultánea o que

40 los anticuerpos biespecíficos tengan una tendencia a unirse a células tumorales positivas para CLEC12A en un grado suficiente, donde después tiene lugar la activación de células T y las células tumorales se lisan. De acuerdo con la presente invención, tal equilibrio excelente entre las afinidades de unión por CD3 y CLEC12A se logra preferentemente mediante la combinación de una VH que tiene las secuencias de CDR (o la secuencia de VH completa) del brazo Fab de 3896 (que es específico para CD3) con una VH que tiene las secuencias de CDR (o la

45 secuencia de VH completa) de cualquiera de los brazos Fab de 4327 o 4331 (que son específicos para CLEC12A). Tales anticuerpos biespecíficos resultantes muestran un equilibrio favorable entre las afinidades de unión por CD3 y CLEC12A, de manera que las células T y las células tumorales de AML positivas para CLEC12A se acercan eficientemente, y la lisis mediada por células T de células tumorales de AML positivas para CLEC12A se induce de manera óptima.

50 Como se describió anteriormente en la presente, se proporciona un anticuerpo IgG biespecífico de acuerdo con las reivindicaciones en donde ambos brazos comprenden un dominio variable de cadena ligera común. Una cadena ligera común particularmente preferida es la cadena ligera kappa humana reordenada IgVκ1-39\*01/IgJκ1\*01, también llamada 012. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la VL de 012 también se representan en la

55 Figura 20. Las secuencias de CDR están en negritas y subrayadas. Por lo tanto se proporciona un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención que contiene una cadena ligera común que al menos comprende las secuencias de CDR de 012. Por lo tanto un aspecto de la invención proporciona un anticuerpo IgG biespecífico de acuerdo con la invención, en donde el primer y el segundo brazos comprenden además una secuencia de CDR1 de cadena ligera que consiste en una secuencia que es idéntica a RASQSISSYLN y una secuencia de CDR2 de

60 cadena ligera que consiste en una secuencia que es idéntica a AASSLQS y una secuencia de CDR3 de cadena ligera que consiste en una secuencia que es idéntica a QQSYSTPPT. Un anticuerpo IgG biespecífico de acuerdo con la invención comprende una secuencia de VL que es idéntica a la cadena VL de 012. Por lo tanto se proporciona además un anticuerpo IgG biespecífico de acuerdo con la invención, en donde el primer y el segundo brazos comprenden una secuencia de VL que consiste en una secuencia que es idéntica a la secuencia

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR  
 FSGSGSGTDFLITISLQPEDFAITYCQQSYSTPPTFGQGTKVEIK.

Un anticuerpo IgG biespecífico de longitud completa de acuerdo con la invención tiene por definición dos sitios de unión a antígeno diferentes pero la región Fc de la IgG comprende además un tercer sitio de unión para un receptor de Fc. Si una célula porta tanto un receptor de Fc como una de las dianas del anticuerpo biespecífico, puede producirse el entrecruzamiento del receptor de Fc y dicha diana en la superficie de dicha célula, lo que puede conducir a efectos no deseados. En una modalidad preferida la invención proporciona un anticuerpo IgG biespecífico de longitud completa de acuerdo con la invención, en donde dicho anticuerpo IgG biespecífico tiene mutados los dominios de bisagra inferior y/o CH2 de manera que la interacción de dicho anticuerpo IgG biespecífico con los receptores de Fc gamma (Fcy) se reduce significativamente. Como se usa en la presente, el término "de manera que la interacción de dicho anticuerpo IgG biespecífico con receptores de Fc gamma se reduce significativamente" significa que la capacidad de dicho anticuerpo IgG biespecífico de interactuar con receptores de Fc gamma, si tales receptores de Fc gamma están presentes cerca de dicho anticuerpo, se reduce. Por lo tanto, de acuerdo con la invención una región del anticuerpo, preferentemente la bisagra inferior y/o el dominio CH2 del anticuerpo se muta (típicamente mediante la expresión de una secuencia de ácido nucleico mutada que lo codifica) de modo que la capacidad de interactuar con un receptor de Fc disminuye. Se prefiere que la interacción con el receptor de Fc se suprima esencialmente. Los residuos de aminoácidos en la IgG1 humana que participan en la unión a receptores de Fcy se han mapeado anteriormente. Además de los residuos que, cuando se alteran, mejoran la unión solamente a receptores específicos o de forma simultánea mejoran la unión a un tipo de receptor y reducen la unión a otro tipo, se encontraron varios residuos que suprimen la unión a uno o más de los receptores (Shields RL y otros JBC 2001 (276) 6591-6604; Armour y otros Mol. Immunol. 2003 (40) 585-593). En una modalidad preferida adicional, dichos dominios de bisagra inferior y/o CH2 mutados comprenden al menos una sustitución en las posiciones de aminoácidos 235 y/o 236 (numeración de acuerdo con Kabat). Preferentemente, se sustituyen ambas posiciones de aminoácidos 235 y 236. Se muestra en los ejemplos que las sustituciones en estos sitios son capaces de impedir esencialmente la interacción entre el anticuerpo biespecífico y el receptor de Fc presente en las células tumorales. En particular se muestra que las sustituciones L235G y/o G236R son muy adecuadas para ese propósito. Por lo tanto en la presente se proporciona además un anticuerpo IgG biespecífico de acuerdo con la invención, en donde dichos dominios CH2 y/o bisagra inferior mutados comprenden la sustitución L235G y/o G236R. Preferentemente, se sustituyen tanto L235G como G236R. Alternativamente, un experto en la técnica puede introducir mutaciones en la bisagra inferior y/o el dominio CH2 que comprenden las sustituciones 234F, 235E y/o 331S (Oganessian y otros Biol. Crystall. 2008(D64)700). Preferentemente, las tres sustituciones se introducen en esta alternativa.

En la solicitud provisional de Estados Unidos 61/635,935, a la que sigue la solicitud regular de Estados Unidos núm. 13/866,747 y la solicitud PCT núm. PCT/NL2013/050294, se describen métodos y medios para producir anticuerpos biespecíficos a partir de una célula individual, de modo que se proporcionan medios que favorecen la formación de anticuerpos biespecíficos respecto a la formación de anticuerpos monoespecíficos. Estos métodos también pueden emplearse favorablemente en la presente invención. Por lo tanto la invención proporciona un método de acuerdo con las reivindicaciones para producir un anticuerpo IgG biespecífico de longitud completa de acuerdo con la invención a partir de una célula individual. Dichas primera y segunda moléculas de ácido nucleico pueden ser parte del mismo vector o vehículo de suministro de genes y pueden integrarse en el mismo sitio del genoma de la célula huésped. Alternativamente, dichas primera y segunda moléculas de ácido nucleico se proporcionan por separado a dicha célula.

Una modalidad preferida proporciona un método para producir un anticuerpo IgG biespecífico de longitud completa de acuerdo con la invención a partir de una célula individual, en donde dicho anticuerpo IgG biespecífico comprende dos dominios CH3 que son capaces de formar una interfase, dicho método comprende proporcionar:

- una célula que tiene a) una primera secuencia de ácido nucleico que codifica dicha cadena pesada de IgG que reconoce específicamente CLEC12A y que contiene un 1er dominio CH3, y b) una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica dicha cadena pesada de IgG que reconoce específicamente un antígeno en células efectoras inmunitarias, CD3, y que contiene un 2do dominio CH3, en donde dichas secuencias de ácido nucleico se proporcionan con medios para la combinación preferencial de dichos 1er y 2do dominios CH3, dicho método comprende además la etapa de cultivar dicha célula y permitir la expresión de dichas dos secuencias de ácido nucleico y cosechar dicho anticuerpo IgG biespecífico del cultivo. Dicha célula tiene además una tercera secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena ligera común de acuerdo con las reivindicaciones. Una cadena ligera común preferida es 012, preferentemente la cadena ligera kappa humana de línea germinal reordenada IgVk1-39\*01/IGJk1\*01, como se describió anteriormente. Las mutaciones preferidas para producir esencialmente solo moléculas de IgG biespecíficas de longitud completa son las sustituciones de aminoácidos L351K y T366K (numeración de acuerdo con Kabat) en el primer dominio CH3 y las sustituciones de aminoácidos L351D y L368E en el segundo dominio CH3, o viceversa. Por lo tanto se proporciona además un método de acuerdo con la invención para producir un anticuerpo IgG1 biespecífico, en donde dicho primer dominio CH3 comprende las sustituciones de aminoácidos L351K y T366K (numeración de acuerdo con Kabat) y en donde dicho segundo dominio CH3 comprende las sustituciones de aminoácidos L351D y L368E, dicho método comprende además la etapa de cultivar dicha célula y permitir la expresión de dichas secuencias de ácido nucleico y cosechar dicho anticuerpo biespecífico

del cultivo. Se proporciona además un método de acuerdo con la invención para producir un anticuerpo IgG1 biespecífico, en donde dicho primer dominio CH3 comprende las sustituciones de aminoácidos L351D y L368E (numeración de acuerdo con Kabat) y en donde dicho segundo dominio CH3 comprende las sustituciones de aminoácidos L351K y T366K, dicho método comprende además la etapa de cultivar dicha célula y permitir la expresión de dichas secuencias de ácido nucleico y cosechar dicho anticuerpo biespecífico del cultivo. Los anticuerpos que pueden producirse por estos métodos también son parte de la presente invención.

La invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo IgG biespecífico de acuerdo con la invención y un portador farmacéuticamente aceptable. Como se usa en la presente, tal 'portador farmacéuticamente aceptable' incluye cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y que retardan la absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles. En dependencia de la vía de administración (por ejemplo, intravenosa, subcutánea, intraarticular y similares) el compuesto activo puede recubrirse con un material para proteger el compuesto de la acción de ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto.

Los anticuerpos y composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención son útiles en el tratamiento de varias leucemias y enfermedades preleucémicas de origen mielóide pero también de linfomas de células B. Las enfermedades que pueden tratarse de acuerdo con la invención incluyen leucemias mieloides o enfermedades preleucémicas tales como AML, MDS y CML y linfomas de Hodgkin y la mayoría de los linfomas no Hodgkin. Por lo tanto la invención proporciona un anticuerpo IgG biespecífico de longitud completa de acuerdo con la invención para el uso como un producto farmacéutico en el tratamiento de síndrome mielodisplásico (MDS), leucemia mielógena crónica (CML) o preferentemente leucemia mielóide aguda (AML). Se contempla además un uso de un anticuerpo IgG biespecífico de acuerdo con la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de síndrome mielodisplásico (MDS), leucemia mielógena crónica (CML) o preferentemente leucemia mielóide aguda (AML).

La cantidad de anticuerpo de acuerdo con la invención que se administrará a un paciente está típicamente en la ventana terapéutica, lo que significa que se usa una cantidad suficiente para obtener un efecto terapéutico, mientras la cantidad no exceda un valor umbral que conduzca a un grado inaceptable de efectos secundarios. Típicamente mientras menor sea la cantidad de anticuerpo necesaria para obtener un efecto terapéutico deseado, mayor será la ventana terapéutica. Por lo tanto, se prefiere un anticuerpo de acuerdo con la invención que ejerce efectos terapéuticos suficientes a dosis bajas.

Aproximadamente 30.000 pacientes se diagnostican cada año con leucemia mielóide aguda (AML) en Europa y Estados Unidos. La mayoría de estos pacientes son de 60 años de edad o más. La vejez es un determinante negativo principal del resultado en AML y la supervivencia a largo plazo (a 5 años) de pacientes ancianos con AML tratados intensivamente es aproximadamente 10 %. En casi todos los pacientes que han logrado la remisión tras la quimioterapia de inducción, la progresión de la enfermedad se observa dentro de 3 años. El tratamiento actual posterior a la remisión ha mostrado un valor limitado, de tenerlo, en pacientes ancianos con AML. Por lo tanto, queda una carga significativa de leucemia resistente residual, y la subpoblación sobreviviente de células leucémicas resistentes a fármaco rápidamente genera recurrencia. Nuevos tipos de fármacos con modos de acción completamente diferentes son necesarios para actuar sobre estas células tumorales de AML que no responden a la quimioterapia en los esfuerzos para inducir y mantener remisiones completas. Aunque la remisión completa (CR) puede lograrse con una serie de combinaciones de quimioterapia intensiva en más de 50 % de los pacientes ancianos con AML y alrededor de 80 % en pacientes más jóvenes, los progresos de respuesta o supervivencia son aún un reto importante en la investigación. En un metaanálisis de redes publicado recientemente de 65 ensayos clínicos aleatorios (15.110 pacientes) en pacientes ancianos con AML la mayoría de los regímenes de inducción investigativa enmendados tienen perfiles de eficacia similares o incluso peores en comparación con el régimen de inducción 3+7 convencional sin daunorrubicina y citarabina. Este tratamiento estándar de AML se asocia con alta morbilidad e incluso mortalidad. La mayoría de los pacientes en CR recaen debido a las células madre leucémicas restantes después de la quimioterapia. La intensificación adicional de la dosis es limitada debido a la toxicidad inaceptable. Por lo tanto está surgiendo una necesidad urgente de modalidades de tratamiento preferentemente con menos toxicidad especialmente en pacientes ancianos con AML.

El tratamiento de AML que no responde a la quimioterapia podría lograrse mediante el acoplamiento de células T del propio sistema inmunitario del paciente y células tumorales de AML con el uso de un anticuerpo biespecífico. De esta manera, el sistema inmunitario de los pacientes se fortalece y se redirige para atacar y erradicar las células tumorales de AML. La presente invención proporciona anticuerpos IgG biespecíficos CD3xCLEC12A que inducen eficientemente la lisis de células tumorales de AML. Por lo tanto los anticuerpos biespecíficos CD3xCLEC12A son una terapia dirigida con menos efectos secundarios que erradica específicamente las células madre leucémicas para mejorar el pronóstico de pacientes con AML. Debido a que CLEC12A se expresa en células madre leucémicas (LSC) y no en células madre hematopoyéticas normales, la terapia dirigida contra este antígeno (como se ha demostrado in vitro) erradicará las LSC mientras preserva la célula madre normal. Con mayor probabilidad esto tendrá el mayor impacto en situaciones de enfermedad residual mínima (MRD). La expectativa es que el porcentaje de recidiva se reduzca debido a la erradicación de la MRD. Así el impacto para el paciente con AML de esta nueva modalidad de

tratamiento sería un tratamiento menos tóxico con un menor porcentaje de recidiva lo que da lugar a una mejora del resultado asociada con una mejor calidad de vida. Estos anticuerpos IgG biespecíficos de longitud completa se evalúan clínicamente en pacientes con AML recidivante. La eficacia clínica se analiza con el uso de la reducción de blastos de AML en la médula ósea como criterio objetivo de respuesta. Una IgG biespecífica eficaz para AML proporciona una nueva opción terapéutica para un gran segmento de pacientes para los que actualmente no se dispone de tratamiento. Además de proporcionar un medio para lograr remisiones duraderas, esta opción de tratamiento también tiene un potencial curativo para AML cuando se aplica durante la remisión.

## EJEMPLOS

Ejemplo 1: Generación y caracterización funcional de una IgG1 biespecífica CD3xCLEC12A candidata

Para validar el concepto de dirigir una célula efectora inmunitaria a una célula aberrante con una IgG biespecífica de longitud completa, se generó una IgG biespecífica CD3XCLEC12A1 candidata cuyos brazos Fab contra CD3 y CLEC12A se derivan de los anticuerpos descritos anteriormente. En el brazo Fab contra CD3, se usó la región VH del anticuerpo anti-CD3 15C3, uno de los anticuerpos específicos para CD3 como se describe en el documento WO2005/118635, y esta VH se refiere como '3056'. En el brazo Fab contra CLEC12A, la región VH de scFv SC02-357, se usó uno de los anticuerpos específicos para CLEC12A como se describe en el documento WO2005/000894, (llamado en lo adelante '[brazo Fab o anticuerpo] contra CLEC12A de referencia'; alternativamente esta VH se refiere como '3116'). Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la VH del brazo contra CD3 (3056), así como las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la VH del brazo contra CLEC12A (3116) de esta molécula candidata, que se refiere como candidato 3056x3116, se proporcionan en la Figura 20. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la VL común (huVκ1-39; 012) también se proporcionan en la Figura 20.

Las regiones VH respectivas se clonaron en vectores de expresión con el uso de métodos conocidos en la técnica para la producción de IgG1 biespecífica (Gunasekaran y otros JBC 2010 (285) 19637-19646; documento WO2009/089004), junto con la cadena ligera IGKV1-39/IGKJ1 (huVκ1-39) humana reordenada. Anteriormente se demostró que la cadena huVκ1-39 es capaz de combinarse con más de una cadena pesada para de este modo producir anticuerpos con diversas especificidades, lo que facilita la generación de moléculas biespecíficas (De Wildt RM y otros J. Mol. Biol. 1999 (285) 895-901; De Kruijff y otros J. Mol. Biol. 2009 (387) 548-58; documento WO2009/157771).

En primer lugar, la unión de la IgG1 biespecífica CD3xCLEC12A candidata 3056x3116 a CD3ε en células HPB-ALL se demostró por citometría de flujo, que se realizó de acuerdo con procedimientos estándares conocidos en la técnica (Tabla 1). La unión a CD3ε expresado en células se confirma con el uso de células CHO transfectadas con CD3δ/ε o CD3γ/ε. La unión de la IgG1 biespecífica candidata 3056x3116 a CLEC12A se determinó con el uso de células CHO transfectadas con una construcción de expresión de CLEC12A; el anticuerpo monoespecífico para CD3 (3056x3056) y el anticuerpo monoespecífico para CLEC12A (3116x3116), así como un AcM control de isotipo IgG1 irrelevante se tomaron como controles.

Tabla 1: Unión a CD3 y CLEC12A expresados en células por citometría de flujo.

IgG	Células HPB-ALL*	Células CHO transfectadas con CLEC12A*
<b>Candidato 3056x3116 CD3XCLEC12A</b>	6216	5299
<b>CD3</b>	6899	282
<b>CLEC12A</b>	199	4147
<b>Control de isotipo</b>	34	289

\*Los resultados se proporcionan como la intensidad de fluorescencia media.

Las mediciones de afinidad de la IgG1 biespecífica candidata 3056x3116 por CD3δ/ε y el dominio extracelular de CLEC12A se determinan por resonancia de plasmones superficiales (BIAcore). Brevemente, los antígenos recombinantes purificados se acoplan covalentemente a la superficie de un chip sensor CM5 con el uso de química de amina libre: los antígenos se diluyen en un tampón kAc a 10 µg/ml y se acoplan a una superficie que se activa con NHS/EDC (de acuerdo con las recomendaciones del fabricante). Para determinar las afinidades de los brazos Fab presentes en anticuerpos biespecíficos, estos se diluyen de manera seriada a 100, 50, 20, 10, 1 y 0,1 nM en

solución salina tamponada con Hepes (HBS) y se dejan fluir sobre la superficie con antígenos acoplados del chip sensor CM5 a una velocidad de flujo alta (30  $\mu\text{l}/\text{min}$ ) (para impedir la readhesión). La celda de flujo 1 (FC1) se usa como superficie de control (blanco) y las respuestas (sensogramas) resultantes de esta superficie se sustraen a las respuestas medidas en las otras celdas de flujo (FC). Las celdas FC2 y FC3 se usan para los dos antígenos diferentes reconocidos por el anticuerpo biespecífico, para poder medir las afinidades de ambos brazos Fab en una sola corrida cinética sobre las tres superficies. Dado que la concentración de anticuerpo no cambia significativamente cuando este fluye sobre una superficie con antígenos acoplados, las velocidades de asociación (que dependen de la concentración) de los anticuerpos biespecíficos se miden de forma simultánea en los dos antígenos diferentes que estos reconocen. Los sensogramas de las fases de asociación y disociación de las diferentes proteínas biespecíficas se obtienen de este modo. Con el uso del software de evaluación BIA y el ajuste de la curva que emplea un modelo de interacción 1:1 (para la interacción monovalente), se determinan las afinidades de los brazos Fab. En el caso en que la unión de la proteína biespecífica a la superficie recubierta con antígenos del chip sensor esté comprometida (es decir, se une muy poca proteína, lo que da lugar a respuestas bajas y/o velocidades de disociación muy rápidas), la configuración del experimento se invierte: el anticuerpo biespecífico se acopla covalentemente a la superficie del chip sensor con el uso de química de amina libre y el antígeno recombinante purificado se deja fluir sobre la superficie a una velocidad de flujo alta (30  $\mu\text{l}/\text{min}$ ) para medir la afinidad del brazo Fab dirigido a ese antígeno.

A continuación, se probó la funcionalidad de la Ig biespecífica CD3xCLEC12A candidata 3056x3116. En primer lugar, se investigó la capacidad de estimulación de células T con células T en reposo de donantes sanos. Brevemente, se obtuvo sangre periférica de donantes sanos después del consentimiento informado. Las células T se aislaron mediante aislamiento por gradiente de densidad estándar para el enriquecimiento en células mononucleares de sangre periférica (PBMC), seguido de selección negativa con el uso de esferas magnéticas (kit de células pan T, Miltenyi Biotec, núm. de cat.130-091-155). Con el uso de esta estrategia de purificación, las células T se denominaron 'intactas' (es decir, no teñidas por anticuerpos, denominadas 'células T en reposo') para limitar la posibilidad de preactivación. Las células T en reposo purificadas se incubaron posteriormente con células de la línea celular HL60 derivada de leucemia en suero fetal bovino (FBS) al 10 % o suero humano normal (HS) al 10 % a una relación de células efectoras: dianas de 10:1 durante dos días. Los resultados se expresaron como el porcentaje de células positivas para CD69 o positivas para CD25 dentro de la población de células T positivas para CD4 o positivas para CD8.

Tanto la IgG contra CD3 bivalente como la IgG biespecífica CD3xCLEC12A indujeron eficientemente la regulación positiva de los marcadores de activación de células T CD69 y CD25 en células T positivas para CD4 y positivas para CD8 (Figura 2). En presencia de FBS que no bloqueó los receptores de Fc presentes en células HL60 (Liesveld y otros 1988, J. Immunol. 140(5), páginas 1527-1533), la molécula de control IgG biespecífica CD3Xcontrol de isotipo demostró inducir la activación de células T. Este efecto disminuyó en presencia de HS, lo que sugiere que la activación de células T observada por la unión monovalente a CD3 de la IgG CD3Xcontrol de isotipo depende del entrecruzamiento de Fc. Sin embargo, la activación de células T inducida por la IgG biespecífica CD3xCLEC12A candidata 3056x3116 dependía solo parcialmente de las interacciones de Fc, dado que la potencia para regular positivamente a CD69 y CD25 se mantuvo en gran parte en presencia de HS (Figura 2). Esto indicó que la potencia intrínseca de la unión monovalente a CD3 fue suficiente para activar células T cuando la molécula de unión se vinculó al antígeno CLEC12A en las células diana HL60 después de la unión con el otro brazo Fab.

Para investigar si el grado de activación de células T por la IgG biespecífica CD3xCLEC12A candidata 3056x3116 es suficiente para inducir la lisis de células diana, las células HL60 en este ensayo se etiquetaron con éster succinimidílico de diacetato de carboxifluoresceína (CFSE) y se cultivaron junto con células T a varias relaciones de células efectoras: diana. Después de uno, dos o tres días, las células HL60 positivas para CFSE sobrevivientes se cuantificaron por citometría de flujo. Los resultados se expresaron como el porcentaje de lisis específica con relación a PBS.

Como se esperaba, la IgG bivalente mono específica para CD3 indujo la muerte mediada por células T en reposo de las células HL60 (Figura 3). Sorprendentemente, la IgG monovalente biespecífica CD3xCLEC12A y el control CD3Xcontrol de isotipo también indujeron la muerte mediada por células T en reposo de las células HL60. Estos efectos fueron más prominentes cuando el ensayo se realizó en ausencia de exceso de IgG humana, es decir, cuando los receptores de Fc en las células diana HL60 no estaban bloqueados (condición con FBS; Figura 3). Sorprendentemente, incluso en presencia de exceso de IgG humana (condición de HS al 10 %) la IgG biespecífica CD3xCLEC12A fue muy eficiente para causar la muerte de células HL60 lo que indica que la inducción de la lisis de HL60 no depende de las interacciones con el receptor de Fc $\gamma$ . En el día 3 también se observó lisis de HL60 inducida por el anticuerpo CD3Xcontrol de isotipo, probablemente debido al bloqueo incompleto del receptor de Fc-gamma tras períodos de incubación prolongados. La muerte de células diana HL60 varió con diferentes relaciones de células efectoras: diana (Figura 4).

En conclusión, este ejemplo demuestra que una molécula biespecífica CD3xCLEC12A es un inductor potente de la lisis de células tumorales mediada por células T y confirma la hipótesis de que el acoplamiento de células T para la muerte eficaz de células aberrantes puede estar mediado por un anticuerpo IgG1 biespecífico CD3xCLEC12A de

longitud completa. Sorprendentemente, la actividad inducida por la IgG biespecífica CD3XCLEC12A no depende de las interacciones con el receptor de Fc $\gamma$ . Para ampliar el panel de IgG biespecífica CD3XCLEC12A de longitud completa para llegar a un candidato clínico final, se generan paneles de brazos Fab contra CD3 y brazos Fab contra CLEC12A. La validación de la especificidad y la funcionalidad de los brazos Fab contra CD3 y CLEC12A se realiza por fijación del otro brazo con el uso del Fab respectivo de la IgG biespecífica CD3XCLEC12A candidata 3056x3116 que se muestra en el presente ejemplo.

#### Ejemplo 2: Generación y caracterización de brazos Fab contra CD3 para Acbe CD3xCLEC12

El Ejemplo 1 demostró que las moléculas biespecíficas CD3xCLEC12A pueden ser inductores potentes de la lisis de células tumorales mediada por células T. Por lo tanto, para generar paneles más amplios de tales moléculas biespecíficas se generaron paneles separados de aglutinantes de CD3 así como aglutinantes de CLEC12A.

Para la generación de un panel de aglutinantes de CD3, se generan regiones VH específicas para CD3 $\epsilon$  mediante la inmunización de ratones transgénicos para la cadena ligera huV $\kappa$ 1-39 (documento WO2009/157771) y para un minilocus de cadena pesada (HC) humana con CD3 $\epsilon$  en varios formatos: (1) CD3 $\delta/\epsilon$  o CD3 $\gamma/\epsilon$  aislado que puede fusionarse o acoplarse a una molécula portadora (tal como Fc de IgG humana o una etiqueta de His) como se conoce en la técnica con o sin adyuvante, (2) células que expresan CD3 $\delta/\epsilon$  o CD3 $\gamma/\epsilon$ , o (3) construcción de ADN que codifica CD3 $\delta/\epsilon$  o CD3 $\gamma/\epsilon$ , o una combinación de estas estrategias. De los ratones inmunizados que muestran un título específico de antígeno suficiente como se determina por ELISA y/o citometría de flujo, se cosechan los bazos y/o los ganglios linfáticos a partir de los cuales se generan bibliotecas de Fab en fagos. Alternativamente, las secuencias de regiones VH se obtienen directamente del material del bazo y los ganglios linfáticos por secuenciación profunda (solicitud provisional de Estados Unidos 61/539,116 en tramitación pendiente).

Los brazos Fab específicos de antígeno se seleccionan de las bibliotecas de fagos de ratones inmunizados o de bibliotecas sintéticas de presentación en fagos que contienen la región VL de la cadena ligera huV $\kappa$ 1-39 y una colección de regiones VH humanas. Para la generación de bibliotecas sintéticas, se usaron cebadores de CDR3 aleatorios como se describe en De Kruif y otros 1995, J Mol Biol 248(1), páginas 97-105. Los bacteriófagos de estas bibliotecas se seleccionan en múltiples rondas en cuanto a la unión de la proteína CD3 $\delta/\epsilon$  aislada que puede acoplarse a una molécula portadora (ver arriba) o a células que expresan CD3 $\epsilon$  tales como HPB-ALL o células transfectadas para expresar CD3 $\delta/\epsilon$  o CD3 $\gamma/\epsilon$ , o una combinación de estas estrategias. Los fagos que no se unen se eliminan y los fagos que se unen se eluyen con un tampón ácido o, para dirigir el repertorio de Fab seleccionado a una especificidad deseada, con anticuerpos contra un epítipo específico, por ejemplo con anticuerpos que tienen reactividad cruzada con CD3 $\epsilon$  de cynomolgous. Después estos fagos se transfectan en bacterias competentes que se cultivaron con presión de selección para bacterias que contienen fagos. Después de escoger una serie de colonias bacterianas sobrevivientes, los fagos se recuperan y se envían a la siguiente ronda de selección.

Después de completar la selección, los fagos restantes se tamizan en cuanto a la unión a antígeno expresado en células por citometría de flujo y a antígeno aislado por ELISA. Como control positivo de unión, se usan anticuerpos contra CD3 de referencia conocidos en la técnica, por ejemplo, OKT-3. El material nucleotídico de esencialmente todos los fagos que mostraron unión específica a células que expresan antígeno se envía a PCR de colonias para amplificar las regiones VH y la PCR se secuencia para determinar la secuencia de la región VH. Las secuencias resultantes se agrupan en base a la singularidad de sus HCDR3. Para las secuencias derivadas de ratones inmunizados, en las que puede producirse hipermutación somática (limitada), las secuencias de VH se agrupan adicionalmente en base a la probabilidad de una VDJ única (es decir, si las HCDR3 en grupos diferentes contiene una diferencia <2 aminoácidos, estas se consideran parte del mismo grupo y se agrupan). De cada grupo, se seleccionan una o algunas regiones VH por grupo para su clonación en vectores para la expresión en un formato de IgG bivalente monoespecífica junto con la cadena ligera huV $\kappa$ 1-39. Las regiones VH cuya unión específica a antígeno aislado y a antígeno expresado en células se confirmó se clonan posteriormente en vectores para la expresión en un formato biespecífico CD3XCLEC12A. Después estas se caracterizan para seleccionar un candidato con potencial terapéutico (ver los ejemplos siguientes).

#### Ejemplo 3: Generación y caracterización de brazos Fab contra CLEC12 para Acbe CD3xCLEC12

Dado que en el Ejemplo 1 se demostró que las moléculas biespecíficas CD3xCLEC12A tienen la potencia para inducir la lisis de células tumorales mediada por células T, a continuación, se quiso establecer paneles más amplios de tales moléculas biespecíficas. Además del panel de aglutinantes de CD3 como se describió en el Ejemplo 2 también se generó un panel de aglutinantes de CLEC12A.

Brevemente, se seleccionaron brazos Fab específicos para CLEC12A a partir de bibliotecas sintéticas de Fab de presentación en fagos que contenían la región VL de IGKV1-39/IGKJ1 humana reordenada y una colección de regiones VH humanas (De Kruif y otros Biotechnol Bioeng. 2010 (106)741-50). Los bacteriófagos de estos bancos se seleccionaron en dos rondas en cuanto a la unión a CLEC12A. Esto se realizó por incubación con el dominio extracelular de CLEC12A (aminoácidos 75 a 275) acoplado a una etiqueta de His (Sino Biological, núm. de cat. 11896-H07H) que se usó para recubrir una superficie. Los fagos que no se unen se eliminaron, los fagos que se

unen se eluyeron químicamente, y se usaron para infectar bacterias que se cultivaron con presión de selección para bacterias que contienen fagos. Después de escoger una serie de colonias bacterianas sobrevivientes, los fagos se recuperaron y se enviaron a la siguiente ronda de selección y propagación.

5 Después de completar la selección, los fagos restantes se tamizaron por citometría de flujo en cuanto a la unión a CLEC12A expresado en la línea de células tumorales HL60. Como control positivo de unión, se usó el anticuerpo contra CLEC12A de referencia. El material nucleotídico de esencialmente todos los fagos que mostraron unión específica a células que expresan CLEC12A se envió a PCR de colonias para amplificar las regiones VH y la PCR se secuenció para determinar la secuencia de la región VH. Las secuencias resultantes se agruparon en base a la singularidad de sus HCDR3. Las regiones VH de cada grupo de HCDR3 únicas se clonaron en vectores para la expresión en formatos de IgG mono-específica o biespecífica junto con la LC IGKV1-39/IGKJ1 humana reordenada.

10 Tres moléculas de unión a CLEC12A seleccionadas con una secuencia de HCDR3 única mostraron el perfil deseado en formato de IgG, que comprendían las características siguientes (Tabla 2 y datos no mostrados):

15 Unión específica a dominio extracelular aislado de CLEC12A.

Unión específica a CLEC12A expresado en una línea de células tumorales.

20 Confirmación del patrón de expresión específico de linaje mielóide en PBMC humanas.

Tabla 2: Caracterización de los brazos Fab contra CLEC12A.

Fab	Longitud de CDR3	Unión a CLEC12A recubierta*	Unión a células que expresan CLEC12A**	Competencia por epítipo con CLEC12A de referencia***
CLEC12A de referencia	9	1,422	1467	-
3918	10	1,253	899	Sí
4327	9	1,307	1559	No
4331	9	1,328	1106	Sí

\*Probado en ELISA, dominio extracelular de CLEC12A (Sino Biological) recubierto a 2 µg/ml, los resultados se proporcionan como densidad óptica (señal de fondo de control de isotipo: 0,127).

\*\*Probado por citometría de flujo en células HL60 con concentración de IgG optimizada, los resultados se proporcionan como intensidad de fluorescencia media (señal de fondo de control de isotipo: 116).

45 \*\*\*Probado en ELISA con formato Fab, contra IgG de referencia a 20 µg/ml.

Ejemplo 4: Selección de brazo Fab contra CLEC12 funcional para Acbe CD3xCLEC12

50 Los brazos Fab contra CLEC12 seleccionados como se describió en el Ejemplo 3 se expresaron posteriormente en formato de IgG biespecífica con un nuevo brazo Fab contra CD3 como brazo fijo. Este nuevo brazo Fab contra CD3, referido como 'IgG contra CD3 de 3896' o '3896' abreviado, también usa la cadena ligera huVκ1-39. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de este candidato 3896 de VH específica para CD3 se representan en la Figura 20. Por tanto, se expresaron varias moléculas biespecíficas CD3xCLEC12A que tenían el mismo brazo anti-CD3 de 3896 pero que diferían en el brazo contra CLEC12A (ya fuera el brazo contra CLEC12A de referencia, o cualquiera de los brazos Fab contra CLEC12 candidatos de 4327, 4331 o 3918). Después estas moléculas biespecíficas CD3xCLEC12A se probaron funcionalmente en un ensayo de lisis de células diana como se describió en el Ejemplo 1. Los resultados se expresaron como el porcentaje de lisis específica con relación al control de isotipo. Todos los brazos Fab contra CLEC12 candidatos mostraron una lisis específica dependiente de la dosis de células diana HL60 en el formato biespecífico, con cinéticas que eran similares o mejores que cuando se usó el brazo Fab contra CLEC12A de referencia (Figura 5).

65 Además, el Acbe CD3xcontrol de isotipo mostró una lisis de células diana dependiente de la dosis, aunque se requirieron concentraciones 1 log mayores para el mismo grado de lisis específica. A pesar de la presencia de exceso de IgG humana por medio de la adición de HS, la actividad de muerte de esta IgG contra CD3 monovalente aún era evidente, probablemente por el entrecruzamiento mediado por Fc. Como resultará evidente a partir del

Ejemplo 7, esta lisis no específica de la diana puede de hecho suprimirse completamente por medio del silenciamiento de la interacción con el receptor de Fc mediante ingeniería de CH2.

5 Ejemplo 5: eficacia de los candidatos del producto CD3xCLEC12 con el uso de células T de AML y/o células tumorales de AML

10 Los Ejemplos 1 y 4 demostraron la potencia de la IgG biespecífica CD3xCLEC12A con el uso de un brazo Fab contra CD3 de 3056 o 3896 y con el uso de los brazos Fab contra CLEC12A candidatos de 4327, 4331 o 3918 o el brazo Fab contra CLEC12A de referencia de 3116 para inducir la lisis de células diana HL60 mediada por células T en reposo de donantes sanos. En el presente ejemplo, se investiga si las células T derivadas de pacientes con AML, una de las indicaciones primarias para la aplicación terapéutica de un fármaco biespecífico CD3xCLEC12A, pueden estimularse para causar la muerte de las dianas tumorales tras la estimulación con una IgG biespecífica CD3xCLEC12A de longitud completa. A continuación, se determina si las células T derivadas de pacientes pueden causar la muerte de blastos de células tumorales de AML autólogas tras la estimulación con una IgG biespecífica CD3xCLEC12A de longitud completa.

20 Las células T se aíslan a partir de sangre periférica de pacientes con AML de acuerdo con procedimientos como se describió en el Ejemplo 1. Después las células T derivadas de pacientes purificadas se incuban con células HL60 etiquetadas con CFSE y se monitorean en cuanto a la lisis celular como se describió en el Ejemplo 1.

25 Además, el ensayo de lisis de células diana mediada por células T se realiza con blastos tumorales de AML aislados del mismo paciente (Norde y otros Blood 2009 (113)2312). Después los blastos aislados se etiquetan con CFSE y se cultivan junto con células T autólogas derivadas de pacientes en presencia de la mezcla de citocinas como se describe en Norde y otros y en presencia de la IgG biespecífica CD3xCLEC12A o de controles. La lisis de células diana se monitorea como se describió en el Ejemplo 1.

Ejemplo 6: Liberación de citocinas por células T después del contacto con IgG biespecífica CD3xCLEC12A

30 Al usar productos biológicos estimuladores de células T, la sobreestimulación de células T es un riesgo serio dado que esto puede conducir al síndrome de liberación de citocinas (Suntharalingam y otros 2006, New England J Med 355(10), páginas 1018-1028; Chatenoud y otros 1990, Transplantation 49(4), páginas 697-702). Para investigar el grado de estimulación de células T inducida por IgG biespecífica CD3xCLEC12A, se estudió la inducción de citocinas de células T en un cultivo conjunto de células T y células diana que expresan receptor de Fc.

35 Brevemente, se cultivaron células T en reposo de donantes sanos junto con células diana HL60 en presencia de la IgG biespecífica CD3xCLEC12A candidata 3056x3116 (1 µg/ml) o IgG de control como se describió en el Ejemplo 1. Después de dos días, se recolectó el sobrenadante y los niveles de producción de citocinas se determinaron en un ensayo Luminex como se conoce en la técnica con el uso del panel de citocinas humanas Human 10-Plex (Invitrogen, núm. de cat.LHC0001). Este panel abarca las diez principales citocinas de Th1 y Th2.

40 Como se esperaba, la IgG bivalente mono-específica para CD3 indujo una fuerte producción de IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  e IL-2 (Tabla 3), que se consideran las principales causantes del síndrome de liberación de citocinas. Además, la producción de IL-4, IL-6, IL-8 e IL-10 aumentó por incubación con IgG contra CD3. Por el contrario, la IgG biespecífica CD3xCLEC12A solo indujo la producción de IL-8 a un nivel similar a la IgG contra CD3; las otras citocinas no se indujeron significativamente con la IgG biespecífica. El GM-CSF estuvo por debajo del límite de detección en cualquier condición.

Tabla 3: liberación de citocinas por células T inducida por anticuerpos.

50

Citocina	IgG contra CD3	IgG CD3xCLEC12A	CD3Xcontrol de isotipo
IFN $\gamma$	484,3 ± 155,0	13,5 ± 19,1	0,0 ± 0,0
TNF $\alpha$	85,8 ± 23,1	14,5 ± 1,4	4,6 ± 1,1
IL-2	285,6 ± 325,5	3,4 ± 0,8	1,7 ± 0,6
IL-4	23,6 ± 3,7	10,2 ± 0,2	7,3 ± 1,3
IL-6	9,0 ± 1,8	3,7 ± 0,3	2,3 ± 0,0
IL-8	1567,8 ± 5,2	1280,1 ± 118,4	359,6 ± 183,6
IL-10	531,5 ± 224,0	21,1 ± 3,0	3,7 ± 4,0
IL-1 $\beta$	4,4 ± 0,4	3,3 ± 0,1	2,5 ± 0,1
IL-5	2,1 ± 0,2	0,7 ± 0,0	0,6 ± 0,1

65

Los resultados se proporcionan como la concentración promedio de citocina en pg/ml de dos donantes  $\pm$  desviación estándar.

5 Los datos que se muestran aquí sugieren un perfil terapéutico favorable para las diferentes moléculas de IgG biespecífica CD3XCLEC12A, dado que inducen de manera potente la lisis de células diana (Ejemplos 1 y 4) sin activar la secreción por células T de cantidades potencialmente perjudiciales de citocinas proinflamatorias como se observa con la IgG contra CD3.

10 Ejemplo 7: Efecto del silenciamiento de Fc sobre la eficacia *in vitro* del Acbe CD3XCLEC12A

10 Se sugirió que la lisis de células diana dependiente de la dosis por el Acbe CD3xcontrol de isotipo que se muestra en el Ejemplo 4 se debe a la interacción de la parte Fc del Acbe con receptores de Fc en células diana HL60. Dado que esta lisis celular no específica de la diana también puede producirse *in vivo*, ya sea por interacción con receptores de Fc en células diana o en células circulantes tales como células NK, se empleó la ingeniería de la región CH2/bisagra inferior para inducir el silenciamiento de la actividad del Acbe mediada por Fc.

15 Para esto, se examinaron dos estrategias de mutación de Fc, con el uso de una mutación doble 235G 236R (DM; DM-Fc) o una mutación triple 234F 235E 331S (TM; TM-Fc). Se generaron los Acbe CD3XCLEC12A (3056x3116) con una mutación DM-Fc o una TM-Fc y por citometría de flujo se confirmó que se unen a células que expresan CLEC12A con la misma intensidad que el Acbe con Fc silvestre (datos no mostrados). A continuación, estos Acbe y las versiones silvestre, DM-Fc y TM-Fc del Acbe CD3xcontrol de isotipo se probaron en el ensayo de lisis de células diana HL60 (ver los Ejemplos 1 y 4). Los resultados se expresaron como el porcentaje de lisis específica con relación al control de isotipo.

25 El silenciamiento de Fc ya sea por la DM o por la TM no tuvo o solo tuvo una influencia menor sobre el grado de lisis específica de células HL60 inducida por Acbe CD3XCLEC12A (Figura 6). Para el Acbe CD3xcontrol de isotipo, sin embargo, la potencia para inducir la lisis de células HL60 se redujo significativamente con la TM e incluso más con la DM.

30 Esto demuestra que el silenciamiento de Fc por ingeniería de CH2/bisagra inferior contribuye adicionalmente a la muerte específica de diana de células aberrantes mediante la creación de un formato de IgG1 biespecífica CD3xCLEC12A que recluta eficientemente y específicamente las células efectoras, y disminuye la activación inmunitaria no específica potencial mediada por células auxiliares que expresan receptor de Fc $\gamma$  normales.

35 Ejemplo 8: Efecto del silenciamiento de Fc sobre la unión a FcRn, CD16, CD32, CD64 y C1q

40 La unión del Acbe CD3XCLEC12A candidato 3056x3116 con WT-Fc o con DM-Fc o TM-Fc silenciado a FcRn humano se determinó por interferometría de biocapa (BLI, Octet QK, FortéBio). Brevemente, IgG1 CD3XCLEC12A purificada con WT-Fc, IgG1 con DM-Fc o IgG1 con TM-Fc se capturó en biosensores de Proteína L (FortéBio, núm. de cat. 18-5085) a una concentración de 50  $\mu$ g/ml en tampón fosfato 0,1 M/Tween20 al 0,002 % que contiene BSA a 1,0 mg/ml pH 6,0 (tampón de unión a FcRn) a RT. Posteriormente se añadió FcRn humano soluble (Sino Biological Inc, CT009-H08H) a una concentración de 1  $\mu$ g/ml en tampón de unión a FcRn) a RT. El análisis de los datos con el uso del software de análisis Octet QK mostró tras la normalización de la unión de IgG al sensor de ProtL que la unión posterior de Acbe CD3XCLEC12A con Fc silenciado por DM o TM a FcRn humano era comparable a Acbe CD3XCLEC12A con cola Fc silvestre (Figura 7) y por lo tanto el silenciamiento de Fc no afectó la unión a FcRn.

50 La unión de Acbe CD3XCLEC12A con Fc silenciado a CD16, CD32 y CD64 se determina por interferometría de biocapa (BLI, Octet QK, FortéBio). Protocolo abreviado: la IgG1 CD3XCLEC12A purificada con WT-Fc, IgG1 con DM-Fc o IgG1 con TM-Fc se captura en biosensores de Proteína L (FortéBio, núm. de cat. 18-5085) a una concentración de 50  $\mu$ g/ml en tampón Kinetics 1x (FortéBio 18-5032) a RT. Posteriormente se añade proteína CD16 (Sino Biological Inc, 10389-H08H1), CD32 (Sino Biological Inc, 10374-H08H) y CD64 (Sino Biological Inc, 10256-H08H) recombinante a una concentración de 1,0  $\mu$ g/ml en tampón Kinetics (FortéBio 18-5032) a RT. La unión de los receptores FcR a Acbe se analiza con el uso del software de análisis Octet QK.

55 La unión de Acbe CD3XCLEC12A con Fc silenciado a C1q humano se determina por ELISA de captura. Para este fin una placa Nunc-Immuno maxisorp F96 (Nunc, 439454) se recubre con IgG1 CD3XCLEC12A purificada con WT-Fc silvestre, IgG1 con DM-Fc o IgG1 con TM-Fc en un intervalo de concentración de 25-0,012  $\mu$ g/ml en PBS O/N a 4 C. Posteriormente se añade C1q humano (Quidel, A400) a 2,0  $\mu$ g/ml en tampón de ELISA (2 % de leche/PBST). Después este complejo se visualiza con el uso de IgG policlonal de oveja anti-C1q humano (Meridian, K90020C) e IgG policlonal de conejo anti-oveja conjugada a HRP (Southern Biotech, 6150-05). Por último, con el uso del sustrato TMB (BD 51-2606KC/51-2607KC) se revela la unión y la OD450 se cuantifica con el uso de un lector de microplacas (Multiskan EX, Thermo Electron Corporation).

60 Ejemplo 9: Evaluación de la eficacia *in vivo* de la IgG biespecífica CD3xCLEC12A.

65

Se realizan estudios de xenoinjerto en animales con el uso de células HL60 que expresan luciferasa (células HL60(-Luc)) para confirmar y ampliar los hallazgos *in vitro* con el uso de la IgG1 biespecífica CD3xCLEC12A. Más específicamente estos estudios se realizan para determinar las concentraciones plasmáticas en equilibrio a dosis eficaces, que se tendrán en cuenta para establecer la dosis inicial para la evaluación clínica de Fase 1. Para este propósito se inyectan ratones NOD/SCID (o ratones inmunodeprimidos comparables) por vía subcutánea con una cantidad de células HL60(-Luc) viables que da lugar al establecimiento de tumores subcutáneos de HL60 en la mayoría de los animales dentro de dos semanas después de la inyección. Paralelamente a la inoculación de HL60(Luc), o tras la toma inicial del tumor, se administran  $5 \times 10^6$  o  $1 \times 10^7$  PBMC humanas. La IgG biespecífica CD3xCLEC12A o la IgG mono-específica de control o biespecífica de control se administran por vía intravenosa a varios niveles de dosis en el primer día de administración de PBMC, y 3, 6, y 9 días después. Las dimensiones del tumor se califican 1 semana después de la inoculación de HL60(Luc) inicial. El promedio aritmético de las dimensiones del tumor (indicado como volúmenes tumorales o como bioluminiscencia total) de cada grupo se representa gráficamente contra el tiempo.

Ejemplo 10: Uso de un anticuerpo IgG1 biespecífico CD3xCLEC12A de longitud completa en un estudio Fase Ia/Ib.

El candidato final de IgG1 biespecífica CD3xCLEC12A de longitud completa se usa para fabricar material de calidad GMP y se evalúa clínicamente en pacientes con AML. En primer lugar, se realiza un análisis formal de seguridad no clínico del candidato de producto para establecer una dosis inicial segura para los primeros estudios en humanos. En lo adelante, se realiza un ensayo Fase Ia/b de escalado de dosis abierto y multicéntrico, en AML recidivante y/o refractaria y en pacientes no aptos para el tratamiento intensivo, para explorar la seguridad y la tolerabilidad de la IgG biespecífica CD3xCLEC12A tras la administración i.v. Los criterios de valoración secundarios incluyen la caracterización farmacocinética y farmacodinámica y el análisis preliminar de la eficacia. Las tasas de respuesta global se evalúan por evaluación de la reducción de blastos de AML en la médula ósea. En Fase Ia la dosis máxima tolerada (MTD) se evalúa tras el escalado de dosis únicas/múltiples. Después del análisis PK interino, la parte Fase 1b del estudio implica una cohorte de extensión de dosis a la MTD o implica una exploración adicional de la frecuencia de dosificación.

Ejemplo 11: Capacidad de Acbe CD3xCLEC12A para inducir la proliferación de células T.

En pacientes con AML las cantidades de célula T son bajas en comparación con la cantidad de blastos de AML en el diagnóstico. Se conoce bien que las células T experimentan proliferación tras la activación lo que da lugar a un aumento de la cantidad de células T. Por otra parte, en el Ejemplo 1 se ha demostrado que un Acbe CD3xCLEC12A puede activar las células T y tiene la potencia para inducir la lisis de células tumorales mediada por células T. Se plantea la hipótesis de que los pacientes con AML tratados con Acbe CD3xCLEC12A se beneficiarán de la expansión de subconjuntos de células T tras la activación de células T mediada por la molécula biespecífica CD3xCLEC12A dado que la proliferación de células T dará lugar a un aumento de la cantidad de células T efectoras. Para demostrar que Acbe CD3xCLEC12A induce la proliferación de células T *in vitro*, se purificaron células T en reposo, se etiquetaron con éster succinídico de diacetato de carboxifluoresceína (CFSE) y se cultivaron junto con monocitos CLEC12A+ autólogos en presencia de Acbe CD3xCLEC12A o Ac de control. Para investigar específicamente la proliferación de células T inducida por CD3xCLEC12A sin activación no específica de Fc $\gamma$ , se usaron Acbe CD3xCLEC12A con la cola DM-Fc, como se describió en los Ejemplos 7 y 8. Como controles, se incluyeron un Acbe CD3xcontrol de isotipo con WT-Fc, un Acbe CD3xcontrol de isotipo con DM-Fc, un monoclonal contra CD3 con WT-Fc y un control de isotipo irrelevante (IgG con WT-Fc). Los monocitos y células T de sangre periférica de donantes sanos se aislaron mediante aislamiento por gradiente de densidad estándar para el enriquecimiento en células mononucleares de sangre periférica (PBMC), seguido de una selección de monocitos positivos para CD14 con el uso de microesferas con CD14 (microesferas con CD14 humano, Miltenyi Biotec, núm. de cat. 130-050-201) y una selección negativa de células T intactas con el uso de esferas magnéticas contra otros leucocitos (kit de aislamiento de células pan T, Miltenyi Biotec, núm. de cat. 130-096-535). El kit de aislamiento de células pan T permite el aislamiento de células T en reposo (intactas) (es decir no teñidas con anticuerpos) lo que evita la posibilidad de reactivación de células T.

Las células T en reposo purificadas etiquetadas con CFSE se incubaron posteriormente con monocitos purificados y Acbe en medio con suero humano normal (HS) al 10 % a una relación de células efectoras: dianas de 5:1 durante siete días. En el día 7 se midió la disminución de la señal de CFSE como lectura de la proliferación de células T por citometría de flujo. Los resultados se expresaron como la señal de CFSE por células T CD3+, CD3+CD4+ o CD3+CD8+ en histogramas.

El Ac contra CD3 con WT-Fc de control positivo indujo la proliferación de células T mientras que la IgG control de isotipo con WT-Fc no indujo la proliferación de células T (Figura 8). Como se esperaba el Acbe CD3xcontrol de isotipo con WT-Fc indujo la proliferación de células T, pero en menor grado en comparación con la IgG anti-CD3 mono-específica bivalente de control. Por el contrario, el Acbe CD3xcontrol de isotipo con DM-Fc no indujo la proliferación de células T debido a su cola de Fc silenciado. El Acbe CD3xCLEC12A con DM-Fc también indujo la proliferación de células T deseada mediada por el vínculo específico de CD3 con el antígeno CLEC12A

Esto demuestra que un Acbe CD3xCLEC12A no solo es capaz de inducir la lisis tumoral mediada por células T específica de diana como se demostró anteriormente, sino que también puede inducir de manera potente la proliferación de células T específica de diana lo que da lugar a un aumento de la cantidad de células T. Por otra parte, esto demuestra además que el silenciamiento de Fc por ingeniería de CH2/bisagra inferior no solo contribuye a la muerte específica de diana de células aberrantes sino también a la inducción específica de diana de la proliferación de células T por el Acbe IgG CD3xCLEC12A con DM-Fc.

Ejemplo 12: Evaluación de la expansión inducida por CD3xCLEC12A del subconjunto T<sub>EMRA</sub> de pacientes con AML.

Dado que la activación de la proliferación de células T se demostró para Acbe CD3xCLEC12 con DM-Fc, a continuación, se quiso investigar si Acbe CD3xCLEC12A con DM-Fc es capaz de inducir la proliferación del compartimiento de células T citotóxicas CD8<sup>+</sup> en pacientes con AML. Las células T citotóxicas CD8<sup>+</sup> se han reconocido como los principales efectores que median la regresión tumoral (Sluijter y otros, 2010). Las células T CD8<sup>+</sup> pueden dividirse en cuatro subconjuntos: células vírgenes (CCR7+CD45RA<sup>+</sup>), de memoria centrales (T<sub>CM</sub>, CCR7+CD45RA<sup>-</sup>), de memoria efectoras (T<sub>EM</sub>, CCR7-CD45RA<sup>-</sup>), y de memoria efectoras CD45RA<sup>+</sup> (T<sub>EMRA</sub>, CCR7-CD45RA<sup>+</sup>). Los estudios han demostrado que los subconjuntos de células T CD8<sup>+</sup> vírgenes y de memoria tienen capacidades diferentes para proliferar y diferenciarse en respuesta a la estimulación del TCR (Geginat y otros, 2003).

En primer lugar, el compartimiento de CD8<sup>+</sup> en sangre periférica de pacientes con AML en remisión clínica se analizó en comparación con donantes sanos. Para este fin las PBMC se aislaron a partir de muestras de sangre periférica congelada de pacientes con AML y donantes sanos mediante aislamiento por gradiente de densidad estándar. A continuación, las PBMC se tiñeron con anticuerpos contra CCR7, CD3, CD4, CD8, CD45RA y CD45RO para analizar los subconjuntos de células T CD8<sup>+</sup> por citometría de flujo. Los resultados se expresaron como el porcentaje de un subconjunto en el compartimiento total de células T CD8<sup>+</sup>.

De manera similar a lo que se describió anteriormente, se observó que el subconjunto de células T CD8<sup>+</sup> vírgenes se redujo en la sangre de pacientes con AML en comparación con el subconjunto de células T CD8<sup>+</sup> vírgenes de individuos sanos, mientras que el compartimiento de T<sub>EMRA</sub> (CCR7-CD45RA<sup>+</sup>) aumentó en pacientes con AML en comparación con donantes sanos (Figura 9).

A continuación, se realizan experimentos para estudiar la proliferación de células T específica de diana tumoral del compartimiento de células T de pacientes con AML. Más específicamente, estos experimentos se realizan para determinar si el Acbe CD3xCLEC12A con DM-Fc puede mejorar la proliferación de células T y el crecimiento excesivo de los subconjuntos de células T efectoras (T<sub>EM</sub> y T<sub>EMRA</sub>) de pacientes con AML con relación a las células T CD8<sup>+</sup> vírgenes de pacientes con AML.

Para este fin se purifican células T en reposo de pacientes con AML en remisión clínica de acuerdo con el ejemplo 11. La composición de los subconjuntos de células T CD8<sup>+</sup> en el día = 0 se analiza por tinción de las PBMC con anticuerpos contra CCR7, CD3, CD4, CD8, CD45RA y CD45RO, seguido de análisis de citometría de flujo. Además, las células T en reposo se etiquetan con CFSE o no se etiquetan (el etiquetado con CFSE es como se describió en el ejemplo 11) y se cultivan junto con células leucémicas HL60 a una relación E:D de 5:1 con anticuerpos de control o de prueba durante 7 días. Las células T etiquetadas con CFSE se usan para la cuantificación de la proliferación de células T, mientras que las células T no etiquetadas se usan para determinar el porcentaje de subconjuntos de células T proliferadas. Las células T etiquetadas y no etiquetadas con CFSE se incuban con PBS, Ac control de isotipo con WT-Fc, Acbe CD3xCLEC12A con DM-Fc, Acbe CD3xcontrol de isotipo con DM-Fc y Ac monoclonal contra CD3 con WT-Fc a 1 µg/ml. Después de 7 días, las células T etiquetadas con CFSE se tiñen con anticuerpos contra CD3, CD4 y CD8 y se someten a análisis de FACS para determinar las cantidades absolutas de células T y el número de divisiones celulares, mientras que las células T no etiquetadas con CFSE se tiñen con anticuerpos contra CCR7, CD3, CD4, CD8, CD45RA y CD45RO para determinar la composición de los subconjuntos de células T CD8<sup>+</sup> proliferadas por citometría de flujo. La proliferación de células T se expresa como la señal de CFSE por subconjunto de células T en histogramas y el tamaño de los cuatro subconjuntos de células T CD8<sup>+</sup> se expresa como porcentaje dentro del compartimiento total de células T CD8<sup>+</sup>.

Ejemplo 13: Eficacia de Acbe CD3xCLEC12A para inducir la lisis de células tumorales mediada por células T de pacientes con AML.

En el ejemplo 1 se demostró que un Acbe CD3xCLEC12A puede inducir la muerte de células HL60 positivas para CLEC12A por células T en reposo de donantes sanos. A continuación, se investigó la capacidad del Acbe CD3xCLEC12A de inducir la activación específica de diana de células T de pacientes con AML y su capacidad de inducir la muerte de células HL60 mediada por células T de pacientes con AML.

Las células T se aislaron a partir de sangre periférica congelada de pacientes con AML (clasificación de AML FAB AML-M1/M2, M4 o M5) en remisión clínica con el uso del kit de aislamiento de células pan T como se describió en el ejemplo 11. Las células T en reposo derivadas de pacientes con AML purificadas se incubaron posteriormente con

células HL60 etiquetadas con CFSE en medio complementado con HS normal al 10 % a una relación de células efectoras: dianas de 5:1 durante dos días, en presencia de PBS, Ac control de isotipo con WT-Fc, CD3xCLEC12A con DM-Fc, CD3xisotipo con DM-Fc, y Ac contra CD3 con WT-Fc de control positivo (todos los anticuerpos a concentración de 1 µg/ml). Después de dos días de cultivo conjunto, la activación de células T se determinó mediante análisis de citometría de flujo para CD3, CD4, y CD25. Estos resultados se expresaron como porcentaje de células CD25+ por células T CD4+. Por otra parte, las células HL60 positivas para CFSE sobrevivientes se cuantificaron por citometría de flujo. Los resultados se expresaron como el porcentaje de lisis específica con relación a IgG.

Estos datos demuestran que la activación específica de antígeno de células T de donantes sanos y pacientes con AML mediada por Acbe CD3xCLEC12A con DM-Fc fue comparable (Figura 10A). Como se esperaba el Acbe CD3xcontrol de isotipo con DM-Fc no indujo la activación de células T derivadas de donantes sanos ni de células T de pacientes con AML. Se demostró que la lisis de células HL60 mediada por Acbe CD3xCLEC12A con DM-Fc por células T derivadas de pacientes con AML (68 % de lisis de células HL60) era comparable a la provocada por células T de donantes sanos (69 % de lisis de células HL60, Figura 10B). Como se esperaba, el Acbe CD3xcontrol de isotipo con DM-Fc no indujo la muerte de células HL60, ni por células T de pacientes con AML ni por células T de donantes sanos. Por lo tanto, la molécula biespecífica CD3xCLEC12A es un inductor potente de la lisis de células tumorales mediada por células T, independientemente de si estas células T se derivan de pacientes con AML o de donantes sanos.

Dado que se demostró que Acbe CD3XCLEC12A tiene la capacidad de inducir la lisis potente de células tumorales HL60 por células T de pacientes con AML, posteriormente se evaluó la capacidad del Acbe CD3XCLEC12A de producir la activación específica de diana de células T de AML. Además, se determinó la capacidad del Acbe CD3XCLEC12A de inducir la lisis de blastos de AML primarios positivos para CLEC12A por células T autólogas derivadas de pacientes con AML. En primer lugar, se descongelaron muestras de médula ósea almacenadas por congelación de pacientes con AML en muestras de diagnóstico que contienen >70 % de blastos de AML primarios como se determina por análisis de citometría de flujo, se cultivaron durante toda la noche (O/N) en medio IMDM complementado con FCS al 10 %, GM-CSF a 100 ng/ml, G-CSF a 100 ng/ml, IL-3 a 50 ng/ml, SCF a 25 ng/ml y Flt3L a 20 ng/ml como se describió anteriormente (Norde y otros, 2009). Después del cultivo O/N, los blastos de AML primarios se fenotipificaron por citometría de flujo en cuanto a la expresión en superficie de CLEC12A, CD3, CD4, CD8, CD14, CD19, CD33, CD34, CD38, CD45 y CD117 y se etiquetaron con CFSE. Las células T en reposo autólogas derivadas de pacientes, recolectadas cuando el paciente había logrado la remisión clínica, se aislaron a partir de la sangre periférica con el uso del kit de aislamiento de células pan T como se describió en el ejemplo 11. Posteriormente, los blastos de AML se cultivaron junto con células T en reposo autólogas a una relación E:D de 5:1 en medio con HS al 10 % durante dos días. Las condiciones probadas incluían PBS, Ac control de isotipo con WT-Fc, CD3xCLEC12A con DM-Fc, CD3xcontrol de isotipo con DM-Fc y Ac contra CD3 con WT-Fc de control positivo (todos los anticuerpos a 1 µg/ml). Después de dos días de cultivo conjunto, la activación de células T se determinó por análisis de citometría de flujo para CD3, CD4, CD8, y CD25. Estos resultados se expresaron como porcentaje de células CD25+ por células T de AML CD4+ o CD8+. La lisis de blastos de AML se determinó mediante la cuantificación de los blastos de AML dobles positivos para CFSE<sup>+</sup>/CD45<sup>bajo</sup> sobrevivientes por citometría de flujo. Los resultados se expresaron como el porcentaje de lisis de blastos específicos con relación a IgG.

Estos datos demuestran que el Acbe CD3xCLEC12A con DM-Fc tiene la capacidad de inducir la activación de células T de AML específicas para los blastos de AML diana de manera comparable al Ac monoclonal contra CD3 con WT-Fc de control positivo (Figura 11A/B). Por otra parte estos datos demuestran que la muerte potente de blastos de AML autólogos inducida por Acbe CD3XCLEC12A por células T derivadas de pacientes con AML es tan potente como la muerte inducida por el Ac monoclonal contra CD3 con WT-Fc de control positivo (Figura 11C). Como se esperaba, no se indujo o fue minoritaria la muerte de blastos de AML por el Ac CD3xcontrol de isotipo con DM-Fc, lo que indica que la muerte de blastos de AML observada mediada por el Acbe CD3XCLEC12A es el resultado principalmente de la activación de células T específica de antígeno y la lisis específica de células tumorales de AML CLEC12A+. En general, este estudio demuestra que el Acbe CD3XCLEC12A puede inducir eficientemente la muerte de células tumorales positivas para CLEC12A por células T de pacientes con AML.

Ejemplo 14: Efecto del silenciamiento de Fc sobre la liberación no específica de citocinas

En los ejemplos 7 y 8 se demostró que el formato de Acbe IgG1 CD3XCLEC12A con silenciamiento de Fc por ingeniería de CH2/bisagra inferior (DM-Fc) dio lugar a la reducción de la afinidad por receptores de Fcγ y suprimió la citotoxicidad no específica mediada por receptor de Fc de la línea celular HL60 derivada de leucemia. A continuación, se investigó si el formato de Acbe IgG1 con silenciamiento por DM-Fc suprimía la citotoxicidad no específica mediada por receptor de Fc en presencia de células circulantes positivas para receptor de Fc tales como células NK. En este estudio, las células T en reposo autólogas derivadas de donantes sanos se redirigieron contra monocitos positivos para CLEC12A en presencia de otras células efectoras innatas circulantes positivas para receptor de Fc tales como células NK. Para este fin las PBMC se aislaron a partir de sangre periférica heparinizada de donantes sanos mediante centrifugación por gradiente de densidad y se sembraron en placa a una densidad de  $1 \times 10^6$  células/ml. Las PBMC se cultivaron durante dos días en medio con FBS al 10 % en presencia de PBS, Ac

control de isotipo, Acbe CD3xCLEC12A con WT-Fc, Acbe CD3xCLEC12A con DM-Fc, Acbe CD3xcontrol de isotipo con WT-Fc, Acbe CD3xcontrol de isotipo con DM-Fc o Ac monoclonal contra CD3 con WT-Fc. Después de dos días de cultivo, los monocitos sobrevivientes se cuantificaron por citometría de flujo en base a la expresión de CD14. Los resultados se expresaron como el porcentaje de lisis específica con relación a IgG.

Se demostró que, para el anticuerpo biespecífico CD3xCLEC12A, el silenciamiento de Fc a través de la presencia de la región DM-Fc solo tuvo un efecto menor sobre la lisis de monocitos (Figura 12). Por el contrario, para el Acbe CD3xcontrol de isotipo, el silenciamiento de Fc a través de la presencia de la región DM-Fc redujo significativamente la lisis no específica de monocitos. Por lo tanto, se llegó a la conclusión de que el silenciamiento de Fc en el Acbe CD3xCLEC12A contribuye adicionalmente a la muerte específica de diana: el Acbe CD3xCLEC12A con DM-Fc recluta específicamente células T y disminuye la activación inmunitaria no específica mediada por células auxiliares que expresan receptor de Fcγ normales.

A continuación, se cuestionó si el silenciamiento de Fc por la mutación DM en el Acbe CD3xCLEC12A suprime la liberación de citocinas mediada por receptor de Fc, conocida por su asociación con el síndrome de liberación de citocinas (CRS), un evento clínico común con terapias de anticuerpos provocado por células auxiliares. Para este fin el perfil de citocinas en los sobrenadantes del ensayo de muerte de monocitos descrito en la Figura 13 se analizó con el uso del panel de citocinas humanas 10-plex para la plataforma Luminex (Invitrogen, LHC0001) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El perfil de las siguientes citocinas humanas se midió en el sobrenadante del día 2: GM-CSF, IFN-γ, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10 y TNF-α. Los resultados mostrados son de concentración de citocina medida en pg/ml. Los niveles de citocinas GM-CSF, IL-4 e IL-5 estuvieron por debajo del límite de detección de este ensayo (datos no mostrados).

Los datos demuestran que CD3xCLEC12A y Acbe CD3xcontrol de isotipo, ambos con cola WT-Fc indujeron la liberación de IL-1β, IL-6, TNF-α, IL-10, IL-2 e IFN-γ (Figura 13). Sin embargo, no se encontraron esas citocinas o solo a niveles muy bajos en CD3xCLEC12A y Acbe CD3xcontrol de isotipo cuando portan la cola DM-Fc, con una excepción para IL-8. Dado que los monocitos son la principal fuente de IL-8, se supone que los altos niveles de IL-8 se liberan de los monocitos lisados y no son un resultado de la liberación mediada por un FcR específico. Se llegó a la conclusión de que el silenciamiento de Fc a través de las mutaciones DM en el formato de Acbe IgG elimina significativamente la liberación mediada por receptor de Fc de las citocinas IL-1b, IL-6, TNF-α, IL-2 e IFN-γ asociadas con CRS. En general, estos datos demuestran que el silenciamiento de Fc por la mutación DM en la región CH2/bisagra inferior contribuye a la mejora de la eficiencia y el reclutamiento específico de células efectoras por Acbe CD3xCLEC12A con DM mediante la disminución de la activación inmunitaria no específica potencial mediada por células auxiliares que expresan receptor de Fcγ normales y la liberación de citocinas proinflamatorias asociada.

#### Ejemplo 15

La unión del candidato 3896 como IgG anti-CD3 monoclonal bivalente de longitud completa a CD3 unido a membrana se comparó con el candidato 3056 como IgG anti-CD3 monoclonal bivalente de longitud completa por análisis de FACS con el uso de células HPB-ALL que expresan CD3. Una IgG1 humana irrelevante sirvió como IgG control de isotipo. La citometría de flujo se realizó de acuerdo con procedimientos estándares conocidos en la técnica. Como se muestra en la Figura 14A, la IgG contra CD3 3896 se unió a CD3 de manera dependiente de la dosis en células HPB-ALL, al igual que la IgG contra CD3 3056.

A continuación, se probó la capacidad de la IgG contra CD3 3896 de inducir proliferación de células T en comparación directa con el anticuerpo contra CD3 OKT3 murino, la IgG contra CD3 3056, y la IgG control de isotipo. Brevemente, los anticuerpos se diluyeron de manera seriada y se inmovilizaron en placas de 96 pocillos. Tras la eliminación de la IgG no unida, se añadieron células T etiquetadas con CFSE y se incubaron a 37 °C. En el día 5, el nivel de inducción de la proliferación de células T se analizó por citometría de flujo. Los resultados se expresan como el porcentaje de células T viables que muestran al menos una reducción en dos veces del nivel de expresión de CFSE y se muestran en la Figura 14B. Se demostró que la IgG contra CD3 3896 como anticuerpo mono-específico bivalente fue menos potente para inducir la proliferación de células T en comparación con la IgG contra CD3 3056 candidata y el OKT3 murino. Estos datos sugieren que la reducción del nivel de proliferación de células T inducido por 3896 en comparación con la IgG contra CD3 3056 refleja la reducción de la capacidad de unión a CD3 analizada por citometría de flujo. Esta diferencia en la unión permite elegir un brazo con una afinidad deseada, lo que da lugar a un anticuerpo biespecífico que muestra un equilibrio favorable entre las afinidades de unión por CD3 y CLEC12A, de manera que las células T y las células tumorales de AML positivas para CLEC12A se acercan eficientemente, y se induce de manera óptima la lisis mediada por células T de células tumorales de AML positivas para CLEC12A.

Para probar la potencia del nuevo brazo anti-CD3 de 3896 frente al brazo anti-CD3 de 3056 en un formato de anticuerpo biespecífico CD3xCLEC12A, el anticuerpo biespecífico 3896xCLEC12A de referencia del ejemplo 4 (candidato 3896x3116) y el anticuerpo biespecífico 3056xCLEC12A de referencia del ejemplo 1 (candidato 3056x3116) se compararon directamente en el ensayo de citotoxicidad en HL60 como se describió anteriormente.

Los resultados se muestran en la Figura 15. Se observó que el Acbe 3896xCLEC12A de referencia tiene una potencia similar a la del Acbe 3056xCLEC12A de referencia. Por tanto, como ambos anticuerpos biespecíficos difieren solamente en su brazo Fab contra CD3 mientras que el brazo Fab contra CLEC12A es el mismo, se llegó a la conclusión de que la funcionalidad del brazo Fab contra CD3 de 3896 es similar a la del brazo Fab contra CD3 de 3056 en un Ac biespecífico CD3xCLEC12A. Cabe señalar que a concentraciones más bajas el candidato 3896x3116 es incluso mejor que el candidato 3056x3116. Esto es favorable dado que proporciona una ventana terapéutica más grande, como se explicó anteriormente en la presente.

#### Ejemplo 16

En el ejemplo 3, se seleccionó un panel de brazos Fab específicos para CLEC12A a partir de bibliotecas de presentación en fagos. Todas las moléculas de unión a CLEC12A contenían la cadena ligera huVκ1-39. Se seleccionaron tres moléculas de unión a CLEC12A: Fab de 3918, 4327 y 4331. Estos Fab se expresaron como IgG1 humana de longitud completa: IgG contra CLEC12A 3918, IgG contra CLEC12A 4327 e IgG contra CLEC12A 4331. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la VH de IgG contra CLEC12A 3918, la VH de IgG contra CLEC12A 4327, la VH de IgG contra CLEC12A 4331 y la VL común (IGKV1-39; 012) se proporcionan en la Figura 20.

Los anticuerpos contra CLEC12A de longitud completa se probaron en cuanto a su unión a CLEC12A expresado por células HL60.

La unión de IgG contra CLEC12A 3918, IgG contra CLEC12A 4327 e IgG contra CLEC12A 4331 a CLEC12A unido a membrana se comparó con el anticuerpo contra CLEC12A de referencia (3116) por análisis de FACS con el uso de células HL60 que expresan CLEC12A. Una IgG1 humana irrelevante sirvió como IgG control de isotipo. La citometría de flujo se realizó de acuerdo con procedimientos estándares conocidos en la técnica. Como se muestra en la Figura 16, la IgG contra CLEC12A 4327 se unió a CLEC12A se manera similar al anticuerpo contra CLEC12A de referencia. Los otros dos anticuerpos, IgG contra CLEC12A 3918 e IgG contra CLEC12A 4331 también demostraron una buena unión a CLEC12A dependiente de la dosis en células HL60. Su unión a CLEC12A parecía algo menor en comparación con el anticuerpo contra CLEC12A de referencia. En conclusión, los Fab de 3918, 4327 y 4331 son buenos brazos de unión a CLEC12A.

#### Ejemplo 17

Se probó si las moléculas biespecíficas que contienen el brazo Fab contra CD3 de 3896 y el brazo Fab contra CLEC12A de 3981, 4327 o 4331 eran funcionales.

Para esto, la secuencia de VH del brazo Fab contra CD3 de 3896 y la región VH del anticuerpo contra CLEC12A de referencia, el Fab contra CLEC12A de 3918, el Fab contra CLEC12A de 4327 o el Fab contra CLEC12A de 4331 se clonaron en vectores de expresión con el uso de métodos conocidos en la técnica para la producción de IgG1 biespecífica (Gunasekaran y otros, documento WO2009/089004) junto con la cadena ligera huVκ1-39 reordenada para dar lugar a anticuerpos biespecíficos; 3896xCLEC12A de referencia, 3896x3918, 3896x4327 y 3896x4331.

Estos anticuerpos biespecíficos se probaron en cuanto a su funcionalidad en el ensayo de citotoxicidad en HL60 descrito anteriormente. Las células T en reposo de dos donantes sanos (HD1 y HD2) se cultivaron junto con células HL60 etiquetadas con CFSE en presencia de varias concentraciones de anticuerpo biespecífico a una relación E:D 5:1 durante 48 horas en presencia de HS al 10 %. Las células HL60 positivas para CFSE sobrevivientes se cuantificaron por citometría de flujo en el día 2. Los resultados en la Figura 17 se expresan como el porcentaje de lisis específica. Para los dos experimentos individuales con células T de donante 1 (HD1; Figura 17 panel superior) y células T para el donante 2 (HD2; Figura 17 panel inferior), se demostró que todos los anticuerpos biespecíficos eran tan potentes como el anticuerpo biespecífico 3896xCLEC12A de referencia cuando se incuban a alta concentración.

De hecho, especialmente a concentraciones más bajas de anticuerpos biespecíficos, se observó que los anticuerpos biespecíficos 3896x4327 y 3896x4331 eran más potentes que el anticuerpo biespecífico 3896xCLEC12A de referencia. Por tanto, como estos anticuerpos biespecíficos difieren solamente en su brazo Fab contra CLEC12A mientras que el brazo Fab contra CD3 es el mismo, puede llegarse a la conclusión de que la funcionalidad de los brazos Fab contra CLEC12 de 4327 y 4331 es más potente en comparación con la del brazo Fab contra CLEC12A de referencia. Sin desear estar ligado a la teoría, las diferencias observadas entre el 3896x4327 y 3896x4331 frente a la IgG biespecífica 3896xCLEC12A de referencia puede reflejar una diferencia en la afinidad de unión de estos nuevos brazos Fab anti-CLEC12 o estos pudieran dirigirse a un epítipo de CLEC12A diferente que permite un entrecruzamiento más eficiente de las células tumorales con células T que expresan CD3.

#### Ejemplo 18

En el ejemplo 2 se demostró que los Fab contra CLEC12A de 3918 y 4331 competían por la unión a un epítipo en CLEC12A cuando se probaron en ELISA como formato de Fab contra fragmentos Fab del anticuerpo contra

CLEC12A de referencia. El Fab contra CLEC12A de 4327, sin embargo, no compitió con la IgG contra CLEC12A de referencia por la unión en este ensayo (Tabla 2).

En este experimento, se probó si la IgG de longitud completa de la IgG contra CLEC12A 4327 competía por la unión a CLEC12A con el anticuerpo contra CLEC12A de referencia. Brevemente, las células HL60 se incubaron previamente con anticuerpo primario a 50 µg/ml en hielo durante 20 minutos. Posteriormente, se añadió un segundo anticuerpo etiquetado con verde Oregón (OG) (Invitrogen, núm. de cat. A10476) a 1 µg/ml a las células más el primer anticuerpo (concentración del primer anticuerpo después de la adición de IgG etiquetada con OG -45 µg/ml). Después de 20 minutos las células se lavaron y se analizaron por FACS.

Los resultados se muestran en la Figura 18: se llegó a la conclusión de que la IgG contra CLEC12A 4327 y la IgG contra CLEC12A de referencia compiten por la unión a CLEC12A. Esto sugiere que ambas IgG se unen a un epítipo estrechamente relacionado en el antígeno CLEC12A o se unen a epítopos diferentes que no permiten la unión simultánea de ambas IgG debido al impedimento estérico.

#### Ejemplo 19

En ejemplos anteriores se demostró que los brazos Fab contra CLEC12 de 4327, 4331, 3918 así como de 3116 son buenos aglutinantes de CLEC12A e inductores potentes de la muerte mediada por células T en un formato biespecífico CD3xCLEC12A. Hasta el momento, los anticuerpos biespecíficos se obtenían con el uso de métodos conocidos para conducir la heterodimerización de cadenas pesadas de inmunoglobulina (Gunasekaran y otros).

En las solicitudes de Estados Unidos y PCT en tramitación pendiente (solicitud regular de Estados Unidos núm.: 13/866,747 y PCT/NL2013/050294; incorporadas en la presente como referencia) se han descrito métodos y medios para producir anticuerpos biespecíficos a partir de una célula individual, de modo que se proporcionan medios que favorecen la formación de anticuerpos biespecíficos respecto a la formación de anticuerpos mono-específicos. Estos métodos también pueden emplearse favorablemente en la presente invención. Específicamente, las mutaciones preferidas para producir esencialmente solo moléculas de IgG biespecífica de longitud completa son las sustituciones de aminoácidos L351K y T366K (numeración de acuerdo con Kabat) en el primer dominio CH3 (la cadena pesada 'variante KK') y las sustituciones de aminoácidos L351D y L368E en el segundo dominio CH3 (la cadena pesada 'variante DE'), o viceversa. Se demostró anteriormente en las solicitudes US 13/866,747 y PCT/NL2013/050294 en tramitación pendiente que la variante DE y la variante KK se combinan preferentemente para formar heterodímeros (denominados moléculas biespecíficas 'DEKK'). La homodimerización de las cadenas pesadas de variante DE (homodímeros DEDE) o cadenas pesadas de variante KK (homodímeros KKKK) difícilmente se produce debido a la fuerte repulsión entre los residuos cargados en la interfase CH3-CH3 entre cadenas pesadas idénticas.

Para demostrar que el efecto de moléculas biespecíficas CD3xCLEC12A no se ve influido por las mutaciones para heterodimerización conocidas (Gunasekaran) o las mutaciones DEKK, las cadenas pesadas de variante DE y variante KK se usaron para conducir la heterodimerización de las diferentes cadenas pesadas para producir CD3xCLEC12A biespecíficas. Además se introdujeron las mutaciones dobles de CH2 / bisagra inferior (L235G y G236R; DM) en estas cadenas pesadas de variantes DE y KK. La cola Fc de estas moléculas biespecíficas resultantes se refiere como 'DM DEKK'.

Brevemente, las regiones VH de cualquiera de los brazos Fab contra CLEC12 de 3116, 4327 o 4331 se clonaron en vectores de expresión que contienen la cadena pesada de variante DE + DM mientras que la región VH del anticuerpo contra CD3 3056 se clonó en un vector de expresión que contiene la cadena pesada de variante KK + DM (solicitud de Estados Unidos regular núm.: 13/866,747 y PCT/NL2013/050294) y estos vectores de expresión, junto con una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena ligera IGKV1-39/IGKJ1 (huVκ1-39) humana reordenada, se proporcionaron a una célula huésped de manera que la célula huésped expresó y produjo anticuerpos biespecíficos. Los anticuerpos biespecíficos 3056x3116 DM DEKK, 3056x4327 DM DEKK y 3056x4331 DM DEKK resultantes se probaron posteriormente en cuanto a su potencia en el ensayo de citotoxicidad en HL60 como se describió anteriormente. Los resultados se muestran en la Figura 19: se demostró que todas las variantes aún son capaces de producir la lisis eficiente de células tumorales y por lo tanto se llegó a la conclusión de que las mutaciones DM y DEKK pueden introducirse en la región Fc del anticuerpo biespecífico CD3xCLEC12A, mientras se mantiene la capacidad de inducir la lisis de células tumorales.

#### Referencias

- Armour y otros Mol. Immunol. 2003 (40) 585-593  
 Bakker A.B. y otros Cancer Res 2004, 64, p8443-50  
 Bargou y otros 2008 Science 321:974  
 Bluemel y otros 2010 Cancer Immunol. Immunother. 59:1197  
 Chames y Baty, MABS 2009 (1) 539-547  
 Chatenoud y otros 1990, Transplantation 49(4), páginas 697-702

- Chen C.H. y otros Blood 2006, 107, p1459-67  
 Cui y otros JBC 2012 (287) 28206-28214  
 De Kruif y otros 1995, J Mol Biol 248(1), páginas 97-105  
 De Kruif y otros J. Mol. Biol. 2009 (387) 548-58  
 5 De Kruif y otros Biotechnol Bioeng. 2010 (106)741-50  
 De Wildt RM y otros J. Mol. Biol. 1999 (285) 895-901;  
 Dreier y otros 2002 Int.J.Canc. 100:690  
 Geginat, J. y otros Blood, 2003. 101(11), p. 4260-6  
 Gunasekaran y otros JBC 2010 (285) 19637-19646  
 10 Haagen y otros 1995 Blood 85:3208  
 Han Y. y otros Blood 2004, 104, p2858-66  
 Kipriyanov y otros 1998 Int.J.Can. 77:763  
 Kontermann, MABS 2012 (4) 182-197  
 Lanzavecchia y otros 1987, Eur.J.Imm. 17:105  
 15 Liu y otros 1985 PNAS 82: 8648  
 Liesveld y otros 1988, J. Immunol. 140(5), páginas 1527-1533  
 Loffler y otros 2000 Blood 95:2098  
 Marshall A.S. y otros J Biol Chem 2004, 279, p14792-802  
 Merchant y otros Nature Biotechnology 1998 Volumen 16, pp 677-681  
 20 Moore y otros Blood 2011 (117) 4542-4551  
 Moshaver y otros 2008 Stem Cells 26:3059  
 Nissim y otros The EMBO Journal vol.13 núm.3 pp.692 - 698. 1994  
 Norde W.J. y otros Blood 2009 (113) (10): p. 2312-23  
 Offner y otros Molecular Immunology 2006 (43) 763-771  
 25 Oganesyanyan y otros Biol. Crystall. 2008(D64)700  
 Schaefer y otros (Cancer Cell 20, 472-486, October 2011  
 Sheridan C, Nat Biotechnol. 2012 (30):300-1  
 Staerz y otros 1986 PNAS 83:1453  
 Shields RL y otros JBC 2001 (276) 6591-6604  
 30 Sluijter, B.J., y otros Clin Immunol, 2010. 137(2), p. 221-33  
 Suntharalingam y otros 2006, New England J Med 355(10), páginas 1018-1028  
 Van Rhenen y otros 2007 Blood 110:2659  
 Zeidler y otros 1999 J. Immunol. 163:1246  
 WO2004/009618  
 35 WO2005/118635  
 WO2005/000894  
 WO2005/000894  
 WO 2008/027236  
 WO2009/089004  
 40 WO2009/157771  
 WO 2010/108127

**Reivindicaciones**

1. Un anticuerpo IgG biespecífico humano de longitud completa, en donde dicho anticuerpo IgG biespecífico comprende un brazo que reconoce específicamente CLEC12A y un segundo brazo que reconoce específicamente CD3, y en donde el brazo que reconoce específicamente CLEC12A comprende una secuencia variable de cadena pesada que consiste en una secuencia que es idéntica a QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGG STSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCAKGGTTGDWFDYWGQGT LVTVSS; o una secuencia variable de cadena pesada que consiste en una secuencia que es idéntica a EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGG STSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARGNYGDEFDYWGQGT LVTVSS, y en donde ambos brazos comprenden una cadena ligera común que comprende una secuencia variable de cadena ligera que consiste en una secuencia que es idéntica a DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRASQSISSYLNWYQQKPKAPKLLIYAASSLQSGVP SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPPTFGQGTKVEIK.
2. El anticuerpo IgG biespecífico de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo reconoce específicamente CD3ε.
3. El anticuerpo IgG biespecífico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde dicho anticuerpo biespecífico es una IgG1 humana.
4. El anticuerpo IgG biespecífico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el segundo brazo que reconoce específicamente CD3 comprende una secuencia de CDR1 de cadena pesada que consiste en la secuencia SYGMH y una secuencia de CDR2 de cadena pesada que consiste en la secuencia IHWYSGSKKNYADSVKVG y una secuencia de CDR3 de cadena pesada que consiste en la secuencia GTGYNWFDP.
5. El anticuerpo IgG biespecífico de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el segundo brazo que reconoce específicamente CD3 comprende una secuencia variable de cadena pesada que consiste en la secuencia QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFRSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIIWYSGS KKNYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGTGYNWFDPWGQGT LVTVSS.
6. El anticuerpo IgG biespecífico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde dicho anticuerpo IgG biespecífico tiene dominios CH2 y/o bisagra inferior mutados de manera que la interacción de dicho anticuerpo IgG biespecífico con receptores de Fcγ se reduce significativamente.
7. El anticuerpo IgG biespecífico de acuerdo con la reivindicación 6, en donde dichos dominios CH2 y/o bisagra inferior mutados comprenden al menos una sustitución en las posiciones de aminoácidos 235 y/o 236 (numeración de acuerdo con Kabat).
8. El anticuerpo IgG biespecífico de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, en donde dichos dominios CH2 y/o bisagra inferior mutados comprenden la sustitución L235G y/o G236R, preferentemente L235G y G236R.
9. Un método para producir un anticuerpo IgG biespecífico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8 a partir de una célula individual, en donde dicho anticuerpo IgG biespecífico comprende dos dominios CH3 que son capaces de formar una interfase, dicho método comprende proporcionar:
  - una célula que tiene a) una primera secuencia de ácido nucleico que codifica dicha cadena pesada de IgG que reconoce específicamente CLEC12A y que contiene un 1er dominio CH3, y b) una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica dicha cadena pesada de IgG que reconoce específicamente CD3, y que contiene un 2do dominio CH3, en donde dicha célula tiene una tercera secuencia de ácido nucleico que codifica dicha cadena ligera común y en donde dichas secuencias de ácido nucleico se proporcionan con mutaciones para la combinación preferencial de dichos 1er y 2do dominios CH3, dicho método comprende además la etapa de cultivar dicha célula y permitir la expresión de dichas secuencias de ácido nucleico y cosechar dicho anticuerpo IgG biespecífico del cultivo.
10. Un método de acuerdo con la reivindicación 9 para producir un anticuerpo IgG1 biespecífico, en donde dicho primer dominio CH3 comprende las sustituciones de aminoácidos L351K y T366K (numeración de acuerdo con Kabat) y en donde dicho segundo dominio CH3 comprende las sustituciones de aminoácidos L351D y

L368E, dicho método comprende además la etapa de cultivar dicha célula y permitir la expresión de dichas secuencias de ácido nucleico y cosechar dicho anticuerpo biespecífico del cultivo.

- 5
11. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo IgG biespecífico de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 y un portador farmacéuticamente aceptable.
  12. Un anticuerpo IgG biespecífico de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para el uso como un producto farmacéutico en el tratamiento de síndrome mielodisplásico (MDS), leucemia mielógena crónica (CML) o preferentemente leucemia mieloide aguda (AML).
- 10

CLL-1: secuencia de aa predicha Bakker y otros 2004  
 KLRL1: secuencia de aa traducida Han y otros 2004 (=grupo Zhang/Cao; depositada con núm. AF247788)  
 M1CL: secuencia de aa predicha Marshall y otros 2004 (depositada con núm. AY498550)  
 DCAL-2: secuencia de aa predicha Chen y otros 2006 (=grupo E.A. Clark depositada con núm. AY426759)  
 CLEC12B: secuencia de aa predicha H.F. Clark y otros 2003 (depositada con núm. AY358810)

```

    KLRL1  -----MSEEVTYADLQFQNSSEMEEKPEIGKGEKAPPAPSHVWRPAALEFLTLCLLLIGLGYLASMFWHTLK---IEMKKNKLNQNI
    M1CL   -----MSEEVTYADLQFQNSSEMEEKPEIGKGEKAPPAPSHVWRPAALEFLTLCLLLIGLGYLASMFWHTLK---IEMKKNKLNQNI
    DCAL-2 -----MSEEVTYADLQFQNSSEMEEKPEIGKGEKAPPAPSHVWRPAALEFLTLCLLLIGLGYLASMFWHTLK---IEMKKNKLNQNI
    CLL-1  MWIDFFTYSSMSEEVTYADLQFQNSSEMEEKPEIGKGEKAPPAPSHVWRPAALEFLTLCLLLIGLGYLASMFWHTLK---IEMKKNKLNQNI
    CLEC12B -----MSEEVTYADLQFQNSACARNNRDGNLRRKRGHPAPSPiWRHAALGLVTLCLKLLIGLVLGMFFLQISNDINSDSEKLSQLQKI

    KLRL1  SEELQRNISLQLMNSMNI-----SNKIRNLSTTLQTIATKLCRELYSKEQEHKCKPCPRRMIWHKDSICYFLS-DDVQVTWQESKMACAAQNAS
    M1CL   SEELQRNISLQLMNSMNI-----SNKIRNLSTTLQTIATKLCRELYSKEQEHKCKPCPRRMIWHKDSICYFLS-DDVQVTWQESKMACAAQNAS
    DCAL-2 SEELQRNISLQLMNSMNI-----SNKIRNLSTTLQTIATKLCRELYSKEQEHKCKPCPRRMIWHKDSICYFLS-DDVQVTWQESKMACAAQNAS
    CLL-1  SEELQRNISLQLMNSMNI-----SNKIRNLSTTLQTIATKLCRELYSKEQEHKCKPCPRRMIWHKDSICYFLS-DDVQVTWQESKMACAAQNAS
    CLEC12B IQQQQDNLSSQQLGNSNLSMEEEFLLKSSQISSVYKIRKQMAIKLQJQELIHHISDHRONPCPKWQWYQNSCYFFTTNEEKIWNANSRKQCIDKKNST

    KLRL1  LLKINNKNALEFIKQSRS  YDYWLGLSPEEDSTRGMVQNIINSSAW  VIRNAPDL  NNKCYGYINRLYVQYHCTYKQRMICEKMANPVQL
    M1CL   LLKINNKNALEFIKQSRS  YDYWLGLSPEEDSTRGMVQNIINSSAW  VIRNAPDL  NNKCYGYINRLYVQYHCTYKQRMICEKMANPVQL
    DCAL-2 LLKINNKNALEFIKQSRS  YDYWLGLSPEEDSTRGMVQNIINSSAW  VIRNAPDL  NNKCYGYINRLYVQYHCTYKQRMICEKMANPVQL
    CLL-1  LLKINNKNALEFIKQSRS--YDYWLGLSPEEDSTRGMVQNIINSSAW-VIRNAPDL-NNMYCGYINRLYVQYHCTYKQRMICEKMANPVQL
    CLEC12B LVKIDSLEEKDFILMSQPLLMFSTFWLGLSWDSGSRWFWEDGVSFSLFSTKELDQINGSKGCAYFQKGNIIYISCSAEIPIWICEKTAAPVKI

    KLRL1  GSTYFREA
    M1CL   GSTYFREA
    DCAL-2 GSTYFREA
    CLL-1  GSTYFREA
    CLEC12B EDLD
  
```

Figura 1

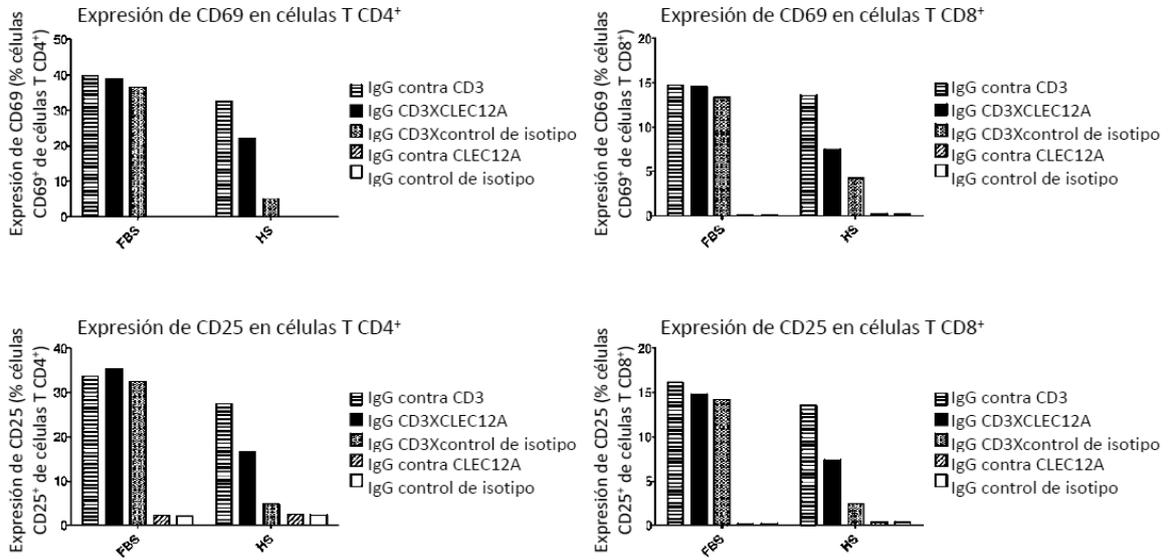


Figura 2

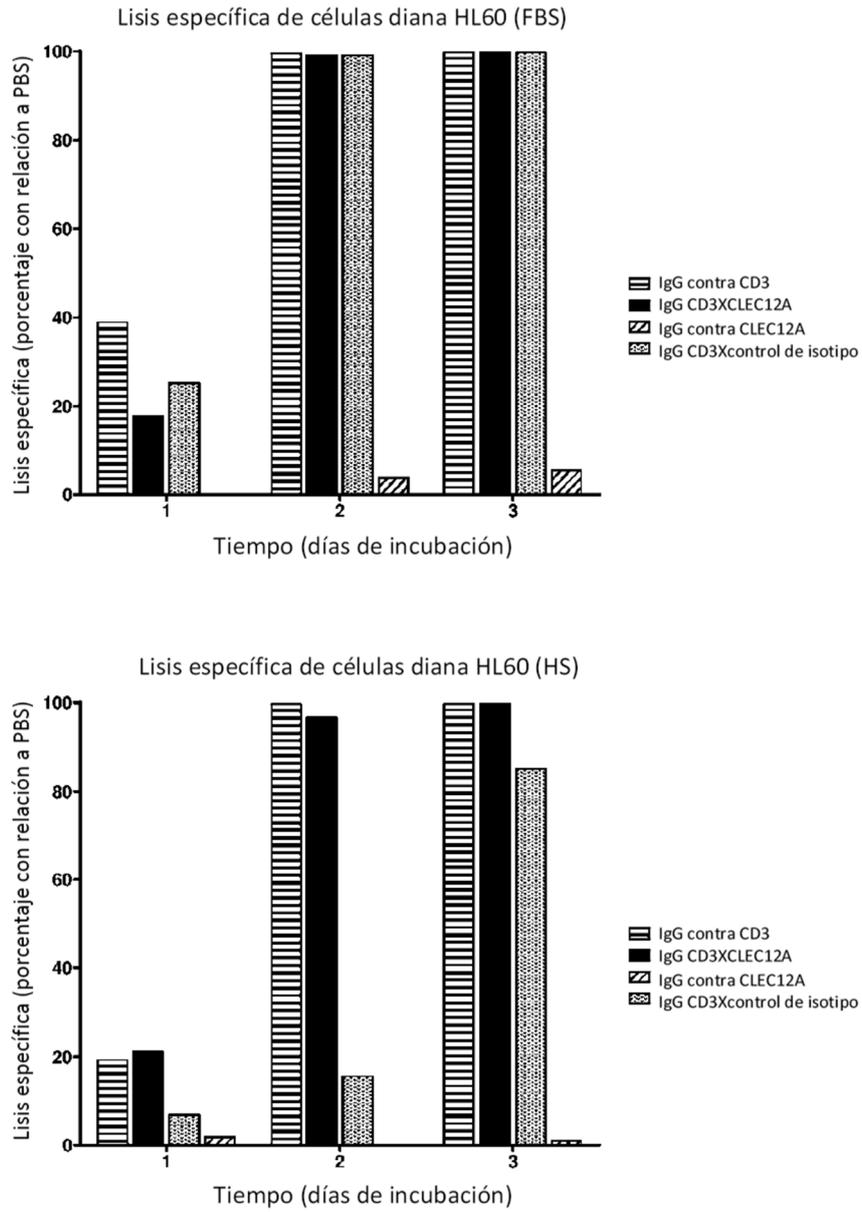


Figura 3

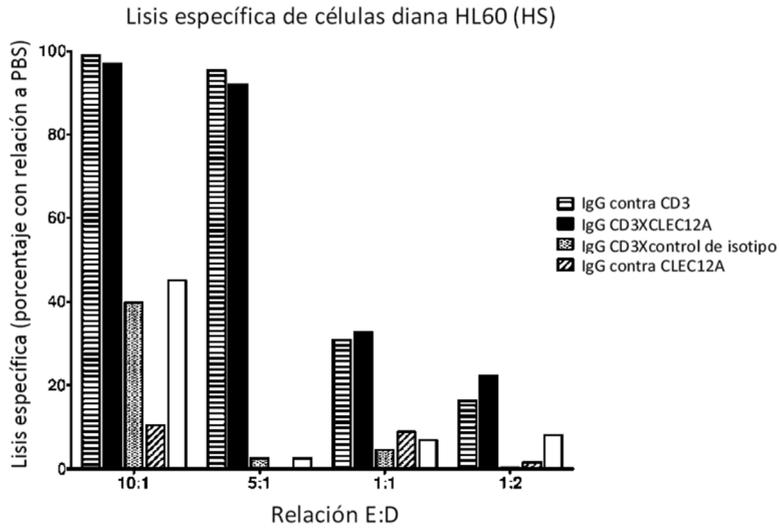


Figura 4

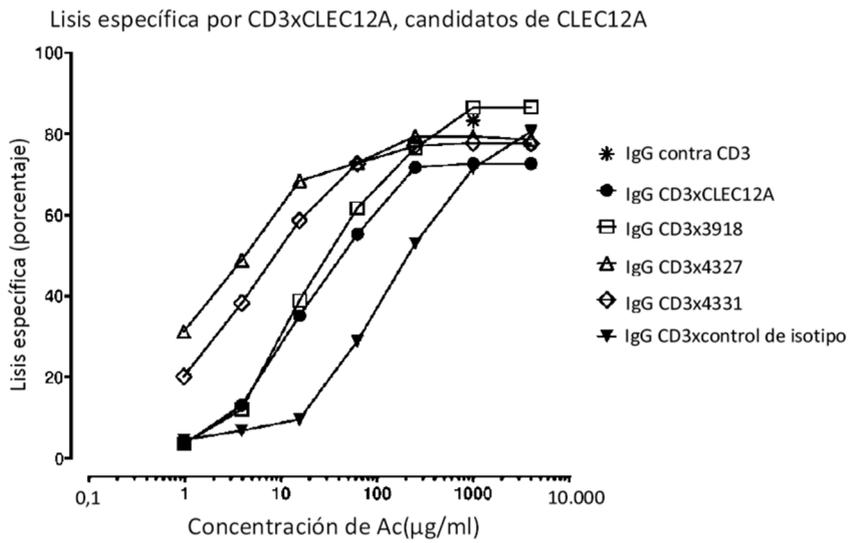


Figura 5

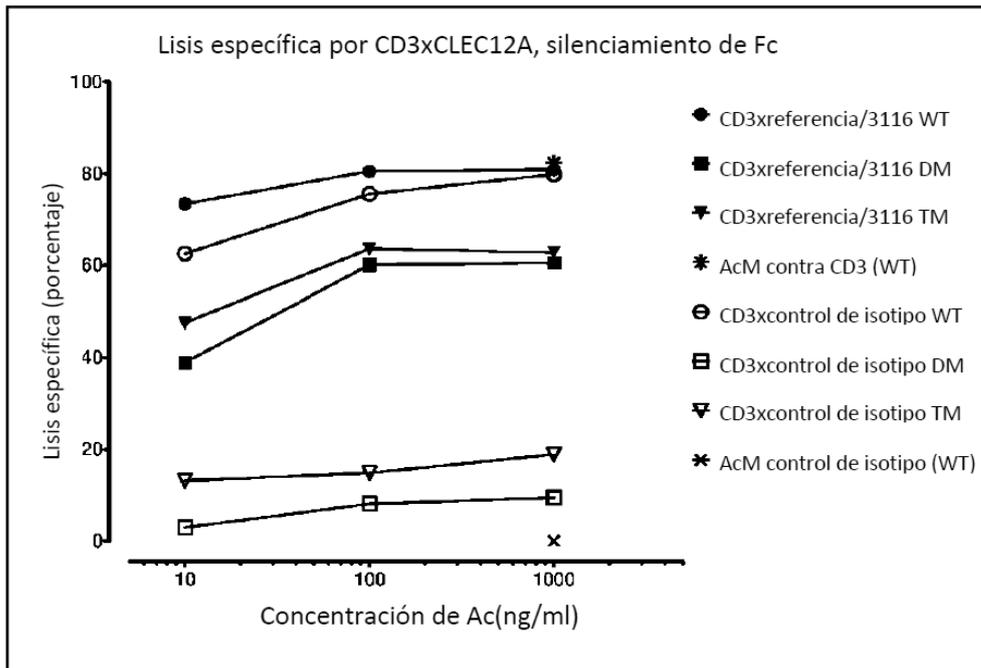


Figura 6

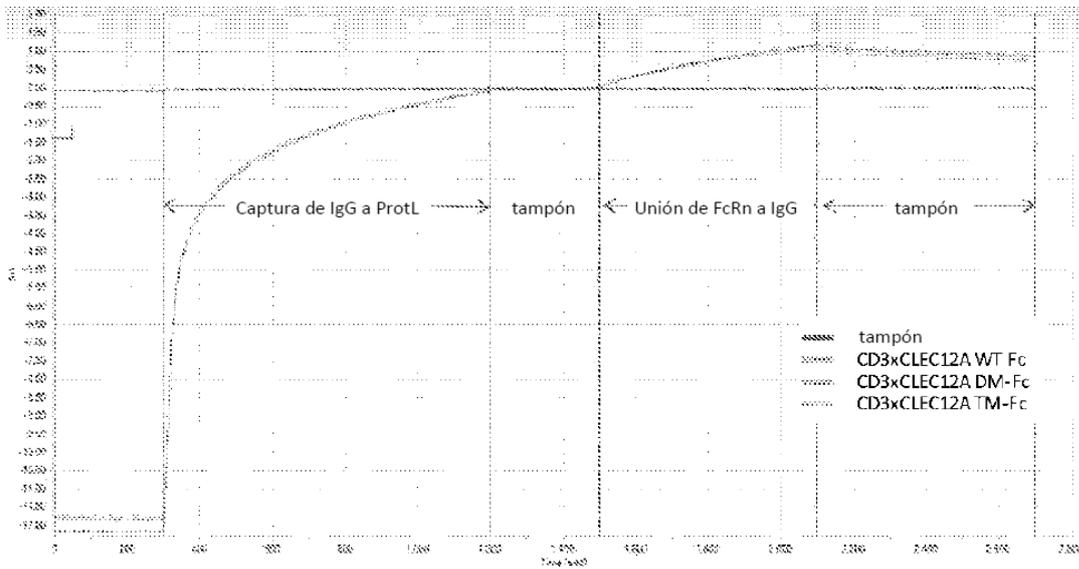


Figura 7

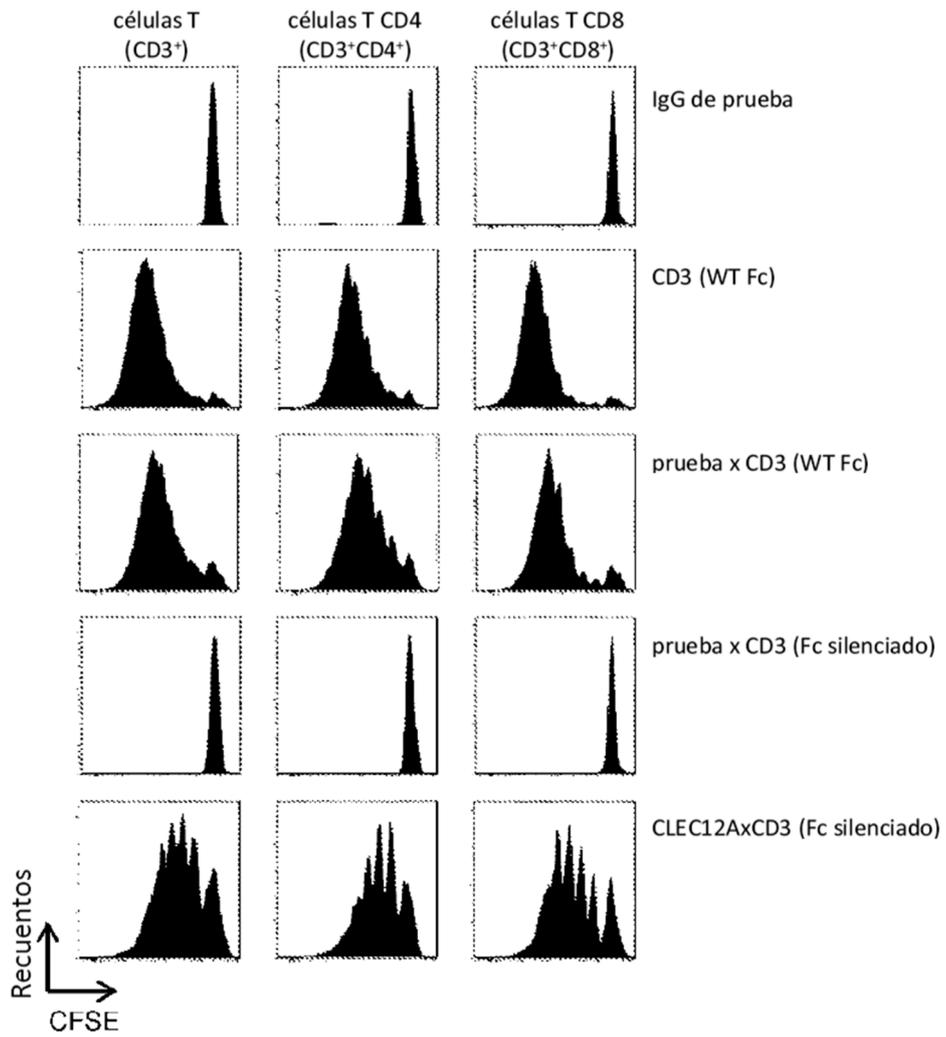


Figura 8

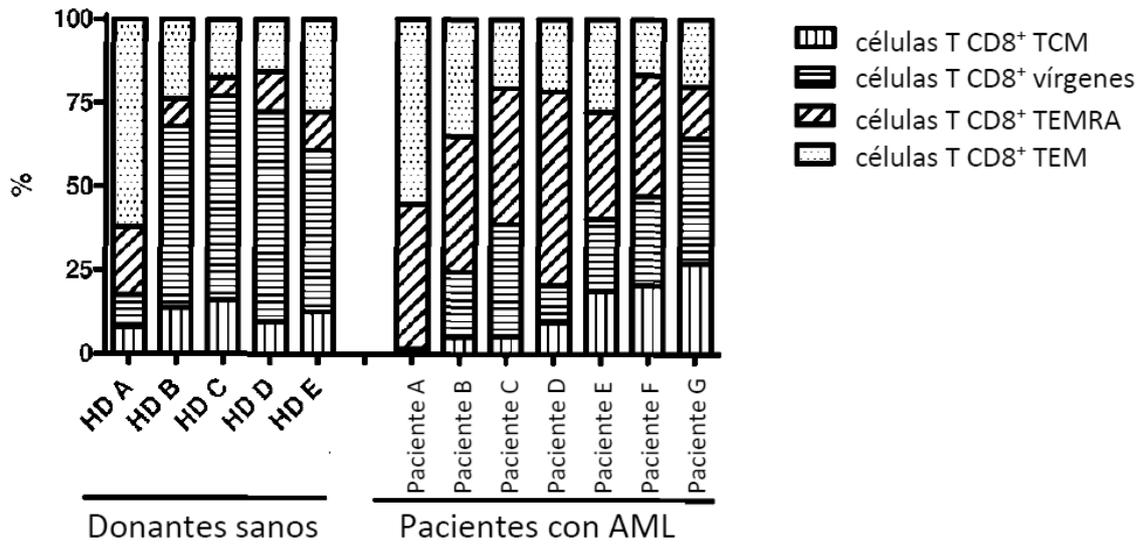


Figura 9

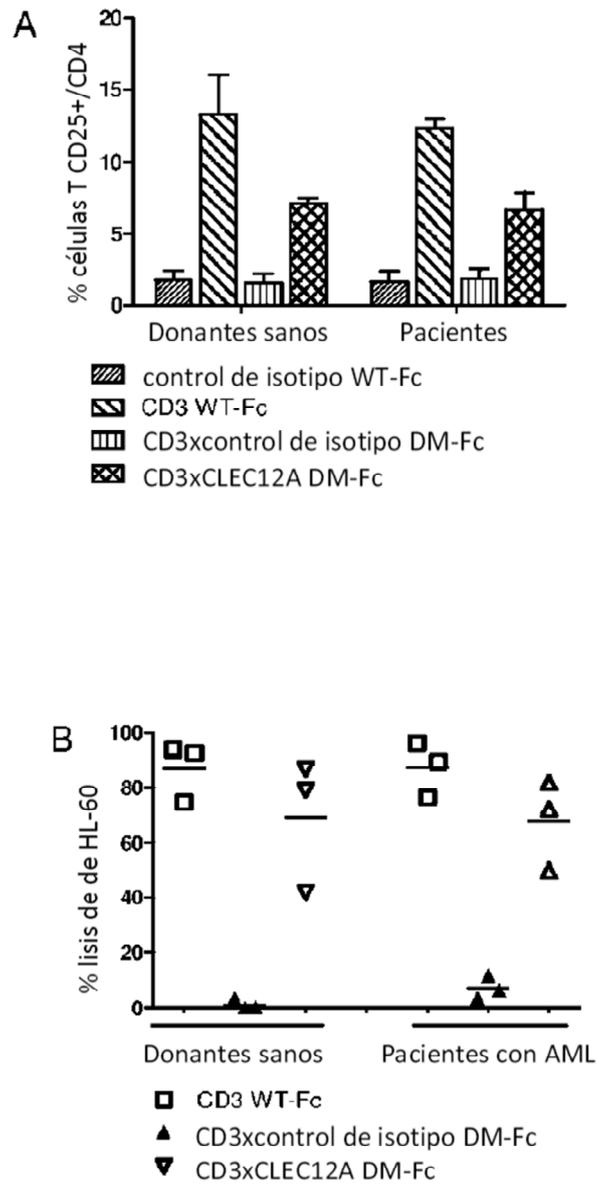


Figura 10

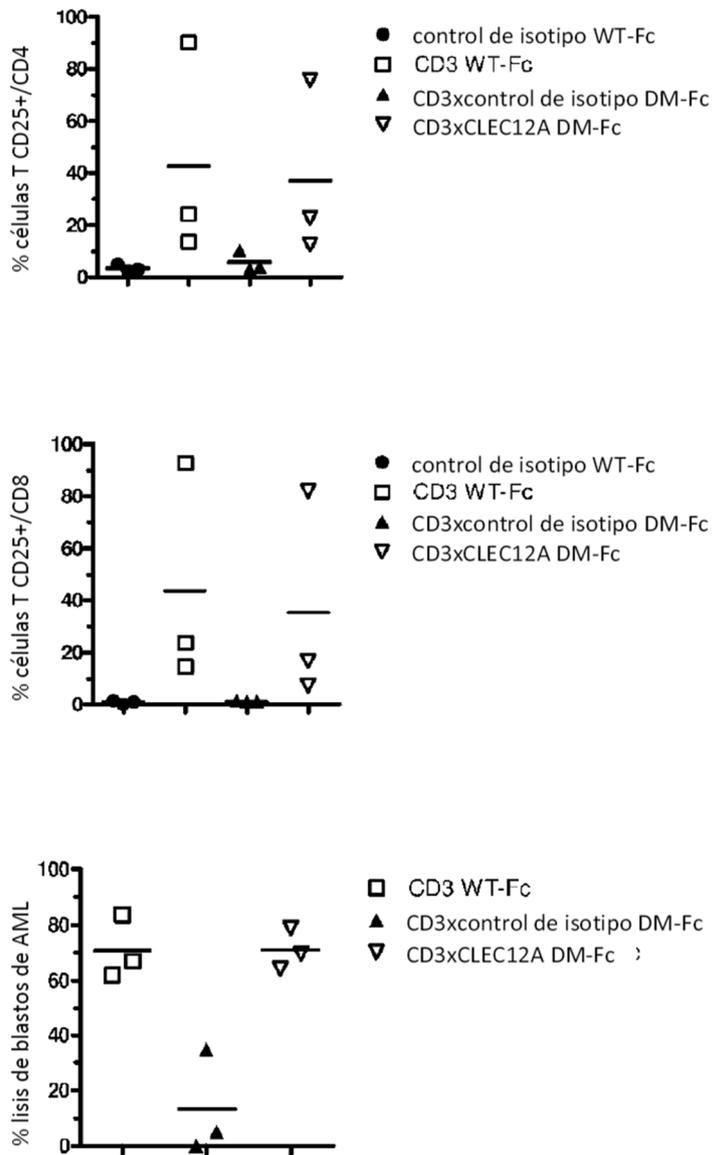


Figura 11

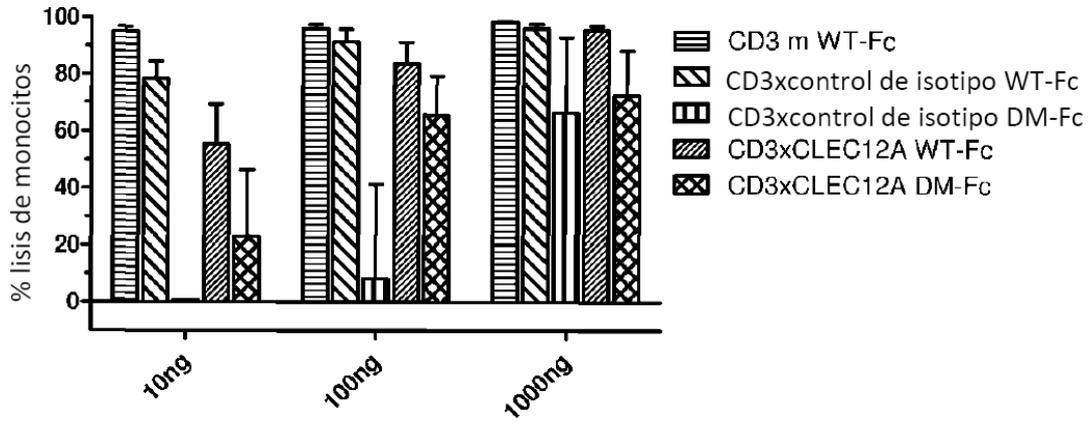


Figura 12

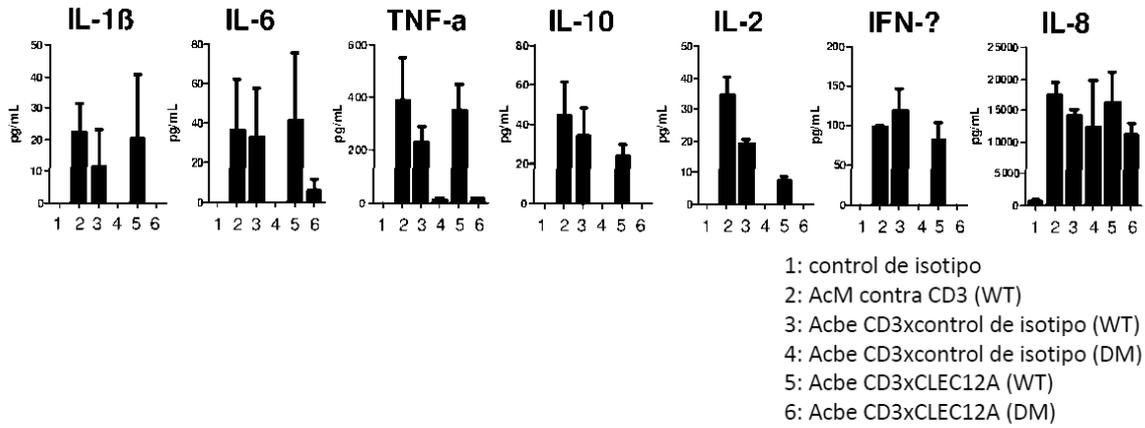


Figura 13

Figura 14A

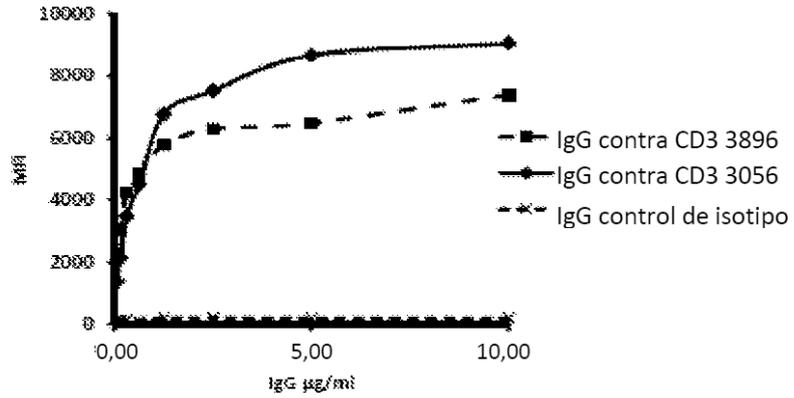


Figura 14B

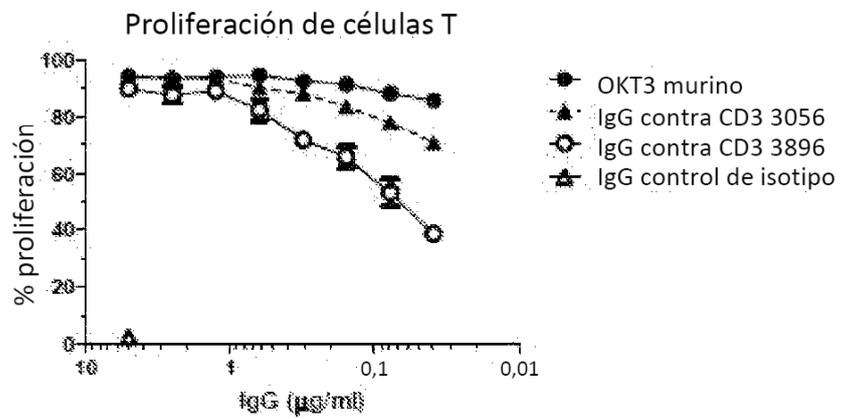


Figura 15

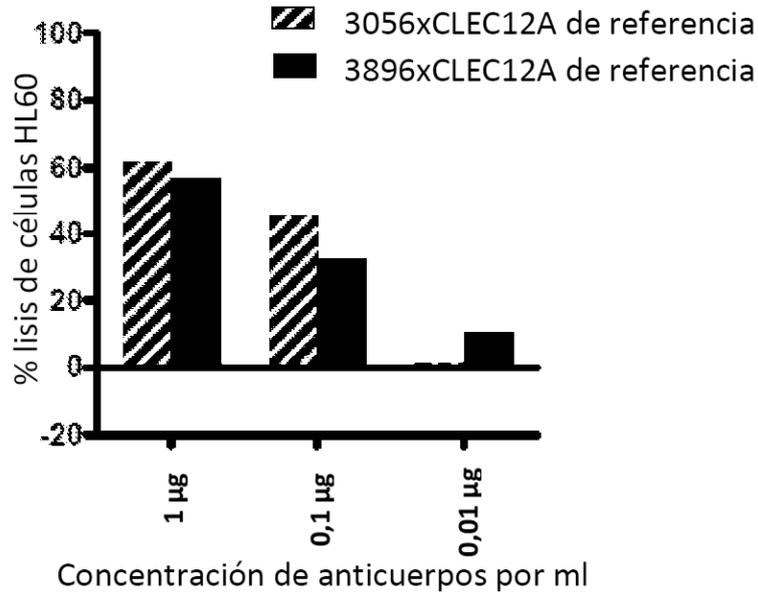


Figura 16

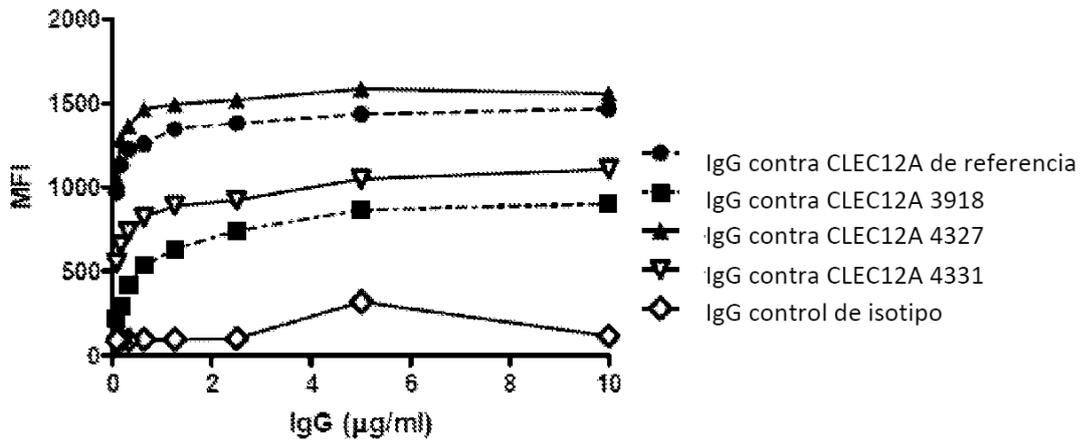
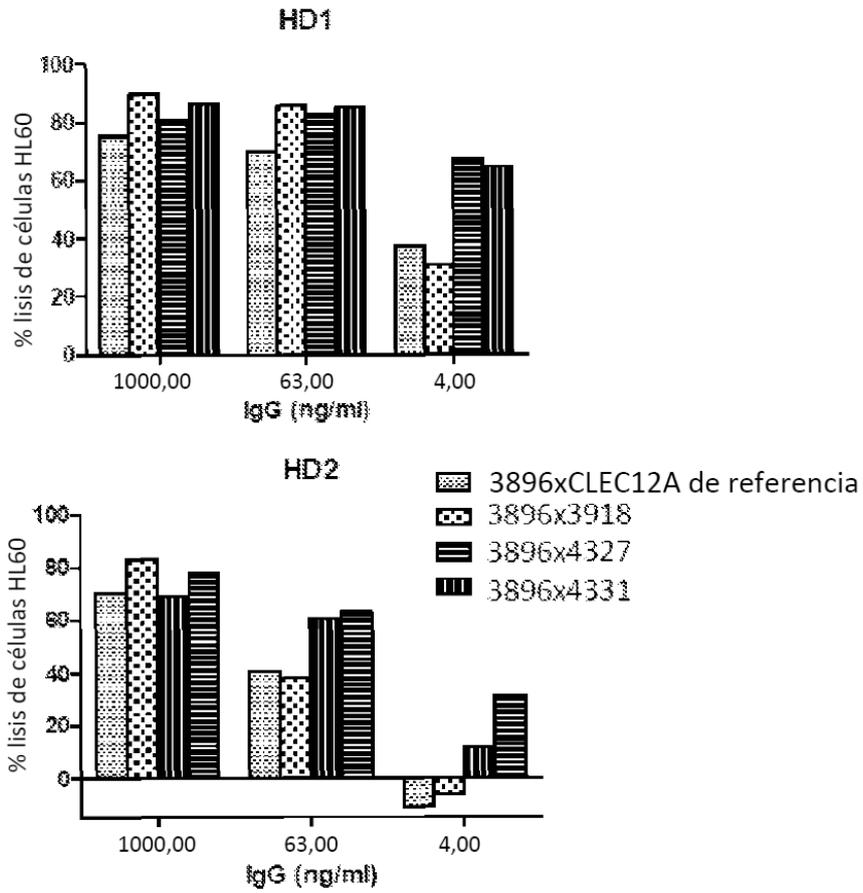
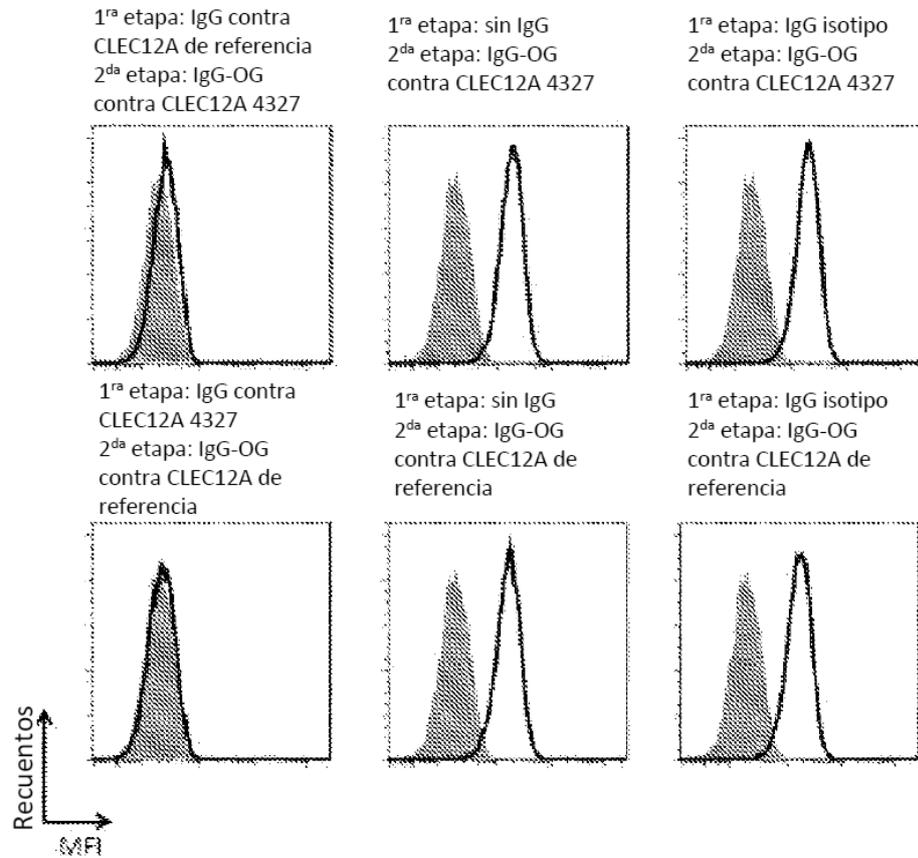


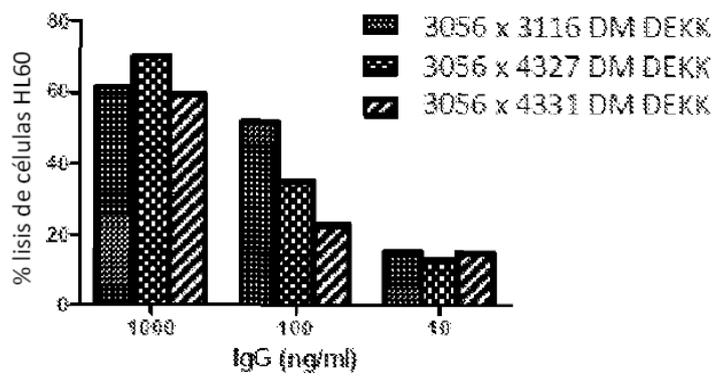
Figura 17



**Figura 18**



**Figura 19**



**Figura 20**

**3056**

VH (VDJ):

caggtgcagctggtgcagctctggcggcggagtggtgcagcccggcagaagcctgagactgagctgcgtgg  
 ccagcggcttcaccttcagcagctacggcatgcactgggtccgccaggcccctggcaagggactggaatg  
 ggtggccgcatctggtacaacggccggaagcaggactacgccacagcgtgaagggccggttcaccatc  
 agccgggacaacagcaagaacacctgtacctgcagatgaacagcctccgggcccaggacaccgccgtgt  
 actactgtaccggggcaccggctacaattggttcgacccttggggccagggcaccctggtcaccgtctc  
 cagt

QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMSHWVRQAPGKGLEWVAATWYNGRKQDYADSVKGRFTI  
 SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGTEYNWDFWQGTTLVTSS

VL/O12 (VJ):

Gacatccagatgaccagctctccatcctccctgtctgcactctgtaggagacagagtcaccatcacttgccgggca  
 agtcagagcattagcagctacttaaatggtatcagcagaaaccagggaaagcccctaagctcctgatctatgct  
 gcatccagtttgcaaagtgggtcccatcaaggttcagtgccagtggtctgggacagatctcactctcaccatc  
 agcagctgcaacctgaagattttgcaacttactactgtcaacagagttacagtaccctccaacgttcggccaa  
 gggaccaaggtggagatcaaac

DIQMTQSPSSLSASVGRVITITCRASQSTISSYINWYQQKPKAPKLLIYASSTLQSGVPSRFSGSGSGTD  
 FTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPPTFCQGTKVEIK

**3896**

VH:

caggtgcagctggtggagctctggcggcggagtggtgcagcccggcagaagcctgagactgagctgcgccc  
 ccagcggcttcaccttcagaagctacggcatgcactgggtccgccaggcccctggcaagggactggaatg  
 ggtggccatcatctggtacagcggcagcaagaagaactacgccacagcgtgaagggccggttcaccatc  
 agccgggacaacagcaagaacacctgtacctgcagatgaacagcctccgggcccaggacaccgccgtgt  
 actactgtgccggggcaccggctacaattggttcgacccttggggccagggcaccctggtcaccgtctc  
 cagt

QVQLVESGGGVVPGRSLRLSCAASGFTFRSYGMSHWVRQAPGKGLEWVAITWYSGSKEKNYADSVKGRFTI  
 SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGTEYNWDFWQGTTLVTSS

VL:

O12

**CLEC12A DE REFERENCIA (3116)**

VH:

caggtgcagctgcaggaatctggaccggactggtcaagcccagcgagacactgagcctgacctgtgtgg  
tgtccggcggcagcatcagcagcagcaattgggtggtcttgggtccgacagccccctggcaagggcctgga  
atggatcggcgagatctaccacagcggcagccccgactacaaccccagcctgaagtccagagtgaccatc  
agcgtggacaagagccggaaccagttcagcctgaagctgagcagcgtgacagccgcgataaccgctgt  
actactgcgccaagtgtccaccggcggtttttcgaactactggggccagggcacactggtcaccgtctc  
cagt

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCVVS~~SSSISSSN~~NWSVVRQPPGKLEWIG~~SIYHS~~SSPDYNPSLKSRTI  
SVDKSRNQFSLKLSVTAADTAVYYCAK~~VSTGGFFDY~~WQGTLVTSS

VL:

O12

**3918**

VH:

caggtgcagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaggtctcctgcaagg  
cttctggatacaccttcaccggctactatataactgcaactgggtgcgacagggccccctggacaagggcttgagt  
gatgggatggatcaaccctaacagtggtggcacaactatgcacagaagtttcagggcagggctcagatg  
accagggacacgtccatcagcacagcctacatggagctgagcaggtgagatctgacgacacggcctgt  
attactgtgcaagagatggttacttcgctgacgcctttgattattggggccaaggtaccctggtcaccgt  
ctccagt

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY~~FTTGY~~MHVVRQAPGQGLEWMG~~INFN~~SSGTNYAQKFQGRVTM  
TRDTSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCAR~~NGYFADAFDY~~WQGTLVTVSS

VL:

O12

**4327**

VH:

caggtgcagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaggtttcctgcaagg  
catctggatacaccttcaccagctactatataactgcaactgggtgcgacagggccccctggacaagggcttgagt  
gatgggaataatcaaccctagtggtgtagcacaagctacgcacagaagttccagggcagagtaccatg  
accagggacacgtccacgagcacagctctacatggagctgagcagcctgagatctgaggacacggcctgt  
attactgtgcaagggcactactggtgatgggttgactactggggccaaggtaccctggtcaccgtctc  
cagt

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY~~FTTSY~~MHVVRQAPGQGLEWMG~~IIN~~SSGTSYAQKFQGRVTM  
TRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCAK~~GTGDNFFDY~~WQGTLVTVSS

ES 2 692 951 T3

VL:

O12

**4331**

VH:

gaggtccagctgggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaggtttcctgcaagg  
catctggatacaccttcaccagctactatatgcaactgggtgcgacaggccctggacaaggcttgagtg  
gatgggaataatcaaccctagtggtagcacaagctacgcacagaagttccagggcagagtcaccatg  
accagggacacgtccacgagcacagctctacatggagctgagcagcctgagatctgaggacacggccgtgt  
attactgtgcaaggggcaattatggtgatgagtttgactactggggccaaggtaccctggtcaccgtctc  
cagt

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG**YTF**TSYMHWVRQAPGQGLEWMG**IINFS**GGSTSYAQKRFQGRVTM  
TRDTSSTVYMELSSLRSEDTAVYYC**ARGNYGDEFDYWGQ**GLTVTVSS

VL:

O12