

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 695 047**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C07K 16/32 (2006.01)
C07K 16/42 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.04.2008** E 12163656 (7)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.08.2018** EP 2520590

54 Título: **Dominio de unión específico entre especies**

30 Prioridad:

03.04.2007 EP 07006990
03.04.2007 EP 07006988
24.04.2007 US 913668 P
13.03.2008 EP 08004741

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.12.2018

73 Titular/es:

AMGEN RESEARCH (MUNICH) GMBH (100.0%)
Staffelseestrasse 2
81477 München, DE

72 Inventor/es:

KLINGER, MATTHIAS;
RAUM, TOBIAS;
RAU, DORIS;
MANGOLD, SUSANNE;
KISCHEL, ROMAN;
LUTTERBÜSE, RALF;
HOFFMANN, PATRICK y
KUFER, PETER

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones:

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

ES 2 695 047 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

Dominio de unión específico entre especies

La presente invención se refiere a un polipéptido que comprende un primer dominio de unión humano que es un anticuerpo capaz de unirse a un epítipo de CD3 (épsilon) humano y de primate distinto de chimpancé y un segundo dominio de unión capaz de unirse a un antígeno de la superficie celular que es CD33, así como a un proceso para la producción del polipéptido mencionado. La invención se refiere además a ácidos nucleicos que codifican el polipéptido, a vectores que comprenden los mismos y a células huésped que comprenden el vector. En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el polipéptido mencionado y usos médicos del polipéptido.

El reconocimiento por las células T está mediado por receptores de células T (TcR) alfa beta y gamma delta distribuidos clonotípicamente que interaccionan con las moléculas cargadas con péptido del péptido MHC (pMHC) (Davis y Bjorkman, *Nature* 334 (1988), 395-402). Las cadenas específicas de antígeno del TcR no poseen dominios de señalización, pero en su lugar están acopladas al aparato de señalización conservado con múltiples subunidades de CD3 (Call, *Cell* 111 (2002), 967-979, Alarcon, *Immunol. Rev.* 191 (2003), 38-46, Malissen *Immunol. Rev.* 191 (2003), 7-27). El mecanismo por el cual la unión de TcR está comunicada directamente con el aparato de señalización sigue siendo una cuestión fundamental en la biología de las células T (Alarcon, loc. cit.; Davis, *Cell* 110 (2002), 285-287). Parece claro que las respuestas de células T sostenidas implican unión de correceptor, oligomerización de TcR, y una organización de orden superior de los complejos TcR-pMHC en la sinapsis inmunológica (Davis y van der Merwe, *Curr. Biol.* 11 (2001), R289-R291, Davis, *Nat. Immunol.* 4 (2003), 217-224). Sin embargo, se produce una señalización de TcR muy temprana en ausencia de estos eventos y puede implicar un cambio conformacional inducido por ligando en CD3 épsilon (Alarcon, loc. cit., Davis (2002), loc. cit., Gil, *J. Biol. Chem.* 276 (2001), 11174-11179, Gil, *Cell* 109 (2002), 901-912). Las subunidades épsilon, gamma, delta y zeta del complejo de señalización se asocian entre sí para formar un heterodímero de CD3 épsilon-gamma, un heterodímero de CD3 épsilon-delta, y un homodímero de CD3 zeta-zeta (Call, loc. cit.). Varios estudios han revelado que las moléculas de CD3 son importantes para la expresión apropiada en la superficie celular del TcR alfa beta y el desarrollo normal de las células T (Berkhout, *J. Biol. Chem.* 263 (1988), 8528-8536, Wang, *J. Exp. Med.* 188 (1998), 1375-1380, Kappes, *Curr. Opin. Immunol.* 7 (1995), 441-447). La estructura en disolución de los fragmentos del ectodominio del heterodímero de CD3 épsilon gamma de ratón mostró que las subunidades épsilon gamma son ambas dominios de Ig del conjunto C2 que interaccionan entre sí para formar una configuración en dímero inhabitual lado a lado (Sun, *Cell* 105 (2001), 913-923). Aunque el tallo rico en cisteína parece jugar un papel importante en el direccionamiento de la dimerización de CD3 (Su, loc. cit., Borroto, *J. Biol. Chem.* 273 (1998), 12807-12816), la interacción mediante los dominios extracelulares de CD3 épsilon y CD3 gamma es suficiente para el ensamblaje de estas proteínas con TcR beta (Manolios, *Eur. J. Immunol.* 24 (1994), 84-92, Manolios y Li, *Immunol. Cell Biol.* 73 (1995), 532-536). Aunque todavía es controvertido, la estequiometría dominante del TcR comprende lo más probablemente un TcR alfa beta, un heterodímero de CD3 épsilon gamma, un heterodímero de CD3 épsilon delta y un homodímero de CD3 zeta zeta (Call, loc. cit.). Dado el papel central del heterodímero de CD3 épsilon gamma humano en la respuesta inmune, se ha elucidado recientemente la estructura cristalina de este complejo unido al anticuerpo terapéutico OKT3 (Kjer-Nielsen, *PNAS* 101, (2004), 7675-7680).

Varias estrategias terapéuticas modulan la inmunidad de las células T tomando como diana la señalización de TcR, particularmente los anticuerpos monoclonales (mAb) anti-CD3 humano que se usan ampliamente clínicamente en regímenes inmunosupresores. El mAb de ratón específico de CD3 OKT3 fue el primer mAb aprobado para uso en los seres humanos (Sgro, *Toxicology* 105 (1995), 23-29) y se usa ampliamente clínicamente como un agente inmunosupresor en el proceso de trasplante (Chatenoud, *Clin. Transplant* 7 (1993), 422-430, Chatenoud, *Nat. Rev. Immunol.* 3 (2003), 123-132, Kumar, *Transplant. Proc.* 30 (1998), 1351-1352), diabetes tipo 1 (Chatenoud (2003), loc. cit.), y psoriasis (Utset, *J. Rheumatol.* 29 (2002), 1907-1913). Además, los mAb anti-CD3 pueden inducir una señalización parcial en las células T y anergia clonal (Smith, *J. Exp. Med.* 185 (1997), 1413-1422). OKT3 se ha descrito en la bibliografía como un mitógeno potente para las células T (Van Wauve, *J. Immunol.* 124 (1980), 2708-18) así como un agente letal potente para las células T (Wong, *Transplantation* 50 (1990), 683-9). OKT3 presenta estas dos actividades de una forma dependiente del tiempo; después de la activación temprana de las células T dando lugar a la liberación de citocinas, después de una administración adicional, OKT3 bloquea posteriormente todas las funciones conocidas de las células T. Es debido a este bloqueo posterior de la función de las células T que OKT3 ha encontrado dicha aplicación amplia como un inmunosupresor en regímenes de terapia para la reducción o incluso supresión del rechazo de tejido de aloinjerto.

OKT3 revierte el rechazo de tejido de aloinjerto lo más probablemente bloqueando la función de todas las células T, que juegan un papel importante en el rechazo agudo. OKT3 reacciona con y bloquea la función del complejo CD3 en la membrana de las células T humanas, que está asociado con la estructura de reconocimiento de antígenos de las células T (TCR) y es esencial para la transducción de la señal. El descubrimiento de a qué subunidad del TCR/CD3 se une OKT3 ha sido el objeto de múltiples estudios. Aunque algunas evidencias han apuntado a una especificidad de OKT3 para la subunidad épsilon del complejo TCR/CD3 (Tunnacliffe, *Int. Immunol.* 1 (1989), 546-50; Kjer-Nielsen, *PNAS* 101, (2004), 7675-7680), las evidencias adicionales han mostrado que la unión de OKT3 al complejo TCR/CD3 requiere que estén presentes otras subunidades de este complejo (Salmeron, *J. Immunol.* 147 (1991), 3047-52).

Otros anticuerpos bien conocidos específicos de la molécula de CD3 se listan en Tunnacliffe, *Int. Immunol.* 1 (1989), 546-50. Como se ha indicado anteriormente, dichos anticuerpos específicos de CD3 son capaces de inducir varias

respuestas de células T tales como producción de linfocinas (Von Wussow, J. Immunol. 127 (1981), 1197; Palacios, J. Immunol. 128 (1982), 337), proliferación (Van Wauve, J. Immunol. 124 (1980), 2708-18) e inducción de células T supresoras (Kunicka, en "Lymphocyte Typing II" 1 (1986), 223). Esto es, dependiendo de las condiciones experimentales, el anticuerpo monoclonal específico de CD3 puede bien inhibir o inducir citotoxicidad (Leewenberg, J. Immunol. 134 (1985), 3770; Phillips, J. Immunol. 136 (1986) 1579; Platsoucas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (1981), 4500; Itoh, Cell. Immunol. 108 (1987), 283-96; Mentzer, J. Immunol. 135 (1985), 34; Landegren, J. Exp. Med. 155 (1982), 1579; Choi (2001), Eur. J. Immunol. 31, 94-106; Xu (2000), Cell Immunol. 200, 16-26; Kimball (1995), Transpl. Immunol. 3, 212-221).

WO 2007/033230 describe anticuerpos frente a la secuencia EMGGITQTPYKVSISGT de CD3 que corresponde a los residuos 6-22 de CD3épsilon humana. Da Costa et al. (2000), Cancer Chemother Pharmacol 46 (Supl): S33-S36 describen el reclutamiento inmune por anticuerpos biespecíficos para el tratamiento de la enfermedad de Hodgkin, p. ej., anticuerpos biespecíficos que reconocen el antígeno CD30 asociado con Hodgkin con un brazo y el antígeno CD3 o CD28 en los linfocitos T o el antígeno CD16 en las células asesinas naturales con el segundo brazo.

BD Biosciences proporciona con el número de catálogo 556610 un clon de anticuerpo frente a CD3 de ratón designado como SP34. Se describe que reacciona con la forma humana de la subunidad épsilon de 20 kDa del complejo antígeno CD3/receptor de célula T. Se describe además que el anticuerpo reacciona de manera cruzada con babuino, rhesus y cynomolgus. Con respecto a su uso, se describe que es efectivo para la tinción por inmunofluorescencia indirecta de tejido de primate no humano para análisis por citometría de flujo.

Aunque se ha reportado que muchos de los anticuerpos frente a CD3 descritos en la técnica reconocen la subunidad épsilon de CD3 del complejo CD3, la mayor parte de ellos se une de hecho a epítopos conformacionales y, así, sólo reconocen CD3 épsilon en el contexto nativo del TCR. Los epítopos conformacionales se caracterizan por la presencia de dos o más residuos de aminoácidos discretos que están separados en la secuencia primaria, pero que se juntan en la superficie de la molécula cuando el polipéptido se pliega en la proteína/antígeno nativo (Sela, (1969) Science 166, 1365 y Laver, (1990) Cell 61, 553-6). Los epítopos conformacionales a los que se unen los anticuerpos frente a CD3 épsilon descritos en la técnica pueden separarse en dos grupos. En el grupo principal, dichos epítopos están formados por dos subunidades de CD3, p. ej., de la cadena de CD3 épsilon y la cadena de CD3 gamma o CD3 delta. Por ejemplo, se ha encontrado en varios estudios que los anticuerpos monoclonales frente a CD3 épsilon más ampliamente usados OKT3, WT31, UCHT1, 7D6 y Leu-4 no se unían a células transfectadas únicamente con la cadena de CD3-épsilon. Sin embargo, estos anticuerpos tiñeron células transfectadas doblemente con una combinación de CD3 épsilon más bien CD3 gamma o CD3 delta (Tunncliffe, loc. cit.; Law, Int. Immunol. 14 (2002), 389-400; Salmeron, J. Immunol. 147 (1991), 3047-52; Coulie, Eur. J. Immunol. 21 (1991), 1703-9). En un segundo grupo más pequeño, el epítipo conformacional está formado en la subunidad CD3 épsilon en sí misma. Un miembro de este grupo es, por ejemplo, el mAb APA 1/1 que se ha producido frente a CD3 épsilon desnaturalizada (Risueno, Blood 106 (2005), 601-8). Tomados conjuntamente, la mayor parte de los anticuerpos frente a CD3 épsilon descritos en la técnica reconocen epítopos conformacionales localizados en dos o más subunidades de CD3. Los residuos de aminoácidos discretos que forman la estructura tridimensional de estos epítopos pueden estar localizados de esta manera bien en la subunidad CD3 épsilon en sí misma o en la subunidad CD3 épsilon y otras subunidades de CD3 tales como CD3 gamma o CD3 delta.

Otro problema con respecto a los anticuerpos frente a CD3 es que se ha encontrado que muchos anticuerpos frente a CD3 son específicos de especie. Los anticuerpos monoclonales anti-CD3 - como se considera válido generalmente para cualesquiera otros anticuerpos monoclonales- funcionan mediante el reconocimiento altamente específico de sus moléculas diana. Reconocen sólo un único sitio, o epítipo, en su molécula CD3 diana. Por ejemplo, uno de los anticuerpos monoclonales usado más ampliamente y mejor caracterizado específico para el complejo CD3 es OKT-3. Este anticuerpo reacciona con CD3 de chimpancé, pero no con el homólogo de CD3 de otros primates, tales como macacos, o con CD3 de perro (Sandusky et al., J. Med. Primatol. 15 (1986), 441-451). El anticuerpo monoclonal anti-CD3 UCHT-1 también es reactivo con CD3 de chimpancé, pero no con CD3 de macacos (datos propios). Por otra parte, también hay ejemplos de anticuerpos monoclonales que reconocen antígenos de macaco, pero no sus equivalentes humanos. Un ejemplo de este grupo es el anticuerpo monoclonal FN-18 dirigido frente a CD3 de macacos (Uda et al., J. Med. Primatol. 30 (2001), 141-147). De forma interesante, se ha encontrado que los linfocitos periféricos de aproximadamente el 12 % de los monos cynomolgus carecen de reactividad con el anticuerpo monoclonal anti-CD3 de mono rhesus (FN-18) debido a un polimorfismo del antígeno CD3 en macacos. Uda et al. describieron una sustitución de dos aminoácidos en la secuencia de CD3 de monos cynomolgus, que no son reactivos con anticuerpos FN-18, comparado con CD3 derivado de animales, que son reactivos con anticuerpos FN-18 (Uda et al., J Med Primatol. 32 (2003), 105-10; Uda et al., J Med Primatol. 33 (2004), 34-7).

Esta capacidad discriminatoria, es decir, la especificidad de especie, inherente a los anticuerpos monoclonales frente a CD3 y fragmentos de los mismos es un impedimento significativo para su desarrollo como agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades humanas. Con el fin de obtener la aprobación comercial, cualquier nueva medicación candidata debe pasar a través de un ensayo riguroso. Este ensayo puede subdividirse en fases preclínicas y clínicas: Mientras la última - subdividida adicionalmente en las fases clínicas I, II y III conocidas generalmente - se realiza en pacientes humanos, la primera se realiza en animales. El objetivo del ensayo preclínico es probar que el candidato a fármaco tiene la actividad deseada y, lo más importante, que es seguro. Sólo cuando se ha establecido la seguridad en animales y posible efectividad del candidato a fármaco en el ensayo preclínico, este candidato a fármaco se

aprobará para el ensayo clínico en seres humanos por la autoridad reguladora respectiva. Los candidatos a fármacos pueden ensayarse para determinar su seguridad en animales de las siguientes tres maneras, (i) en una especie relevante, es decir, una especie en la que los candidatos a fármacos pueden reconocer los antígenos ortólogos, (ii) en un animal transgénico que contiene los antígenos humanos y (iii) por el uso de un subrogado para el candidato a fármaco que pueda unirse a los antígenos ortólogos presentes en el animal. Las limitaciones de los animales transgénicos son que esta tecnología está limitada típicamente a roedores. Entre los roedores y el hombre hay diferencias significativas en la fisiología y los resultados de seguridad no pueden extrapolarse fácilmente a los seres humanos. Las limitaciones de un subrogado para el candidato a fármaco son la diferente composición de materia comparado con el candidato a fármaco real y, frecuentemente, los animales usados son roedores con la limitación que se ha discutido anteriormente. Por lo tanto, los datos preclínicos generados en roedores tienen un poder predictivo limitado con respecto al candidato a fármaco. La estrategia de la elección para el ensayo de seguridad es el uso de una especie relevante, preferiblemente un primate inferior. La limitación ahora de las moléculas de unión a CD3 adecuadas para la intervención terapéutica en el hombre descrita en la técnica es que la especie relevante son primates superiores, en particular, chimpancés. Los chimpancés están considerados como una especie en peligro de extinción y debido a su naturaleza semejante a la humana, el uso de dichos animales para el ensayo de la seguridad de fármacos se ha prohibido en Europa y está altamente restringido en otros lugares.

La presente invención se refiere a un polipéptido que comprende un dominio de unión, que es un anticuerpo capaz de unirse a un epítipo de la cadena CD3 ϵ humana y de *Callithrix jacchus*, *Saguinus oedipus* o *Saimiri sciureus*, en donde el epítipo es parte de una secuencia de aminoácidos comprendida en el grupo que consiste en SEQ ID NOS:2, 4, 6 u 8 y comprende al menos la secuencia de aminoácidos Gln-Asp-Gly-Asn-Glu, en donde el primer dominio de unión comprende una región VL que comprende CDR-L1 como se representa en SEQ ID NO:153, CDR-L2 como se representa en SEQ ID NO:154 y CDR-L3 como se representa en SEQ ID NO:155 y una región VH que comprende CDR-H 1 como se representa en SEQ ID NO:174, CDR-H2 como se representa en SEQ ID NO:175 y CDR-H3 como se representa en SEQ ID NO:176, y en donde el polipéptido comprende además un segundo dominio de unión capaz de unirse a un antígeno de la superficie celular que es CD33. Las secuencias como se muestran en SEQ ID NO. 2, 4, 6 y 8 y los fragmentos funcionales de las mismas son epítopos de CD3 independientes del contexto.

La ventaja de la presente invención es el suministro de un polipéptido que comprende un dominio de unión que es un anticuerpo que presenta especificidad entre especies para la cadena CD3 ϵ (épsilon) humana y de primates distintos del chimpancé, que puede usarse para la evaluación preclínica de la seguridad, actividad y/o perfil farmacocinético de estos dominios de unión en primates y - de forma idéntica - como fármacos en los seres humanos. La misma molécula puede usarse en estudios preclínicos en animales, así como en estudios clínicos en seres humanos. Esto da lugar a resultados altamente comparables y a una potencia predictiva muy incrementada de los estudios en animales comparado con moléculas subrogadas específicas de especie. En la presente invención, se identificó sorprendentemente un fragmento de polipéptido N-terminal de 1-27 residuos de aminoácidos del dominio extracelular de CD3 épsilon, que - a diferencia de todos los demás epítopos conocidos de CD3 épsilon descritos en la técnica - mantiene su integridad estructural tridimensional cuando se extrae de su entorno nativo en el complejo CD3 (y se fusiona con una secuencia de aminoácidos heteróloga tal como EpCAM o una parte Fc de inmunoglobulina).

La independencia del contexto del epítipo de CD3 proporcionada en esta invención corresponde a los primeros 27 aminoácidos N-terminales de CD3 épsilon o fragmentos funcionales de esta cadena de 27 aminoácidos. La expresión "independiente de contexto", tal y como se usa en la presente memoria en relación con el epítipo de CD3, significa que la unión de las moléculas de unión/anticuerpo inventivas descritas en la presente memoria no da lugar a un cambio o modificación de la conformación, secuencia o estructura que rodea al determinante antigénico o epítipo. Por el contrario, el epítipo de CD3 reconocido por una molécula de unión a CD3 convencional (p. ej., como se describe en WO 99/54440 o WO 04/106380) está localizado en la cadena CD3 épsilon C-terminal respecto a los aminoácidos 1-27 N-terminales del epítipo independiente de contexto, en donde sólo adopta la conformación correcta si se incluye en el resto de la cadena épsilon y se mantiene en la posición correcta por heterodimerización de la cadena épsilon bien con la cadena CD3 gamma o delta.

Las moléculas de unión anti-CD3 como parte de una molécula de unión biespecífica como se proporciona en la presente memoria y generadas (y dirigidas) frente a un epítipo de CD3 independiente de contexto proporcionan una mejora clínica sorprendente con respecto a la redistribución de las células T y, así, un perfil de seguridad más favorable. Sin pretender la vinculación a ninguna teoría, como el epítipo de CD3 es independiente de contexto, mediante la formación de un subdominio autónomo autosuficiente sin mucha influencia sobre el resto del complejo CD3, las moléculas de unión a CD3 proporcionadas en la presente memoria inducen menos cambios alostéricos en la conformación de CD3 que las moléculas de unión a CD3 convencionales (como las moléculas proporcionadas en WO 99/54440), que reconocen epítopos de CD3 dependientes de contexto.

La independencia de contexto del epítipo de CD3 de las moléculas de unión a CD3 de la invención como parte de una molécula de unión biespecífica está asociada con menos redistribución de las células T durante la fase inicial del tratamiento con moléculas de unión a CD3 de la invención lo que da como resultado un mejor perfil de seguridad de las moléculas de unión a CD3 de la invención comparado con las moléculas de unión a CD3 convencionales conocidas en la técnica, que reconocen epítopos de CD3 dependientes de contexto. Particularmente, como la redistribución de las células T durante la fase inicial del tratamiento con moléculas de unión a CD3 es un factor de riesgo importante para los eventos adversos en el SNC, las moléculas de unión a CD3 de la invención, por el reconocimiento de un

epítipo de CD3 independiente de contexto en lugar de uno dependiente de contexto, tienen una ventaja de seguridad sustancial sobre las moléculas de unión a CD3 conocidas en la técnica. Los pacientes con dichos eventos adversos en el SNC relacionados con la redistribución de las células T durante la fase inicial del tratamiento con moléculas de unión a CD3 convencionales padecen habitualmente confusión y desorientación, en algunos casos también incontinencia urinaria. La confusión es un cambio en el estado mental en el que el paciente no es capaz de pensar con su nivel de claridad habitual. El paciente tiene habitualmente dificultades para concentrarse y el pensamiento no es sólo borroso y poco claro, sino que está frecuentemente significativamente ralentizado. Los pacientes con eventos adversos en el SNC relacionados con la redistribución de las células T durante la fase inicial del tratamiento con moléculas de unión a CD3 convencionales también pueden padecer pérdida de memoria. Frecuentemente, la confusión da lugar a la pérdida de la capacidad de reconocer gente y/o lugares, o decir la hora y la fecha. La sensación de desorientación es común en la confusión, y se altera la capacidad de toma de decisiones. Los eventos adversos en el SNC relacionados con la redistribución de las células T durante la fase inicial del tratamiento con moléculas de unión a CD3 convencionales puede comprender además habla confusa y/o dificultades para encontrar palabras. Este trastorno puede alterar tanto la expresión como la comprensión del lenguaje, así como la lectura y escritura. Además, los eventos adversos en el SNC relacionados con la redistribución de las células T durante la fase inicial del tratamiento con moléculas de unión a CD3 convencionales pueden estar acompañados de incontinencia urinaria, también vértigo y mareo, en algunos pacientes.

El mantenimiento de la estructura tridimensional en el fragmento de polipéptido de 27 aminoácidos N-terminal de CD3 épsilon mencionado puede usarse para la generación de dominios de unión, preferiblemente humanos, que son capaces de unirse al fragmento de polipéptido N-terminal de CD3 épsilon *in vitro* y al (subunidad épsilon de CD3 del) complejo CD3 nativo en las células T *in vivo* con la misma afinidad de unión. Estos datos indican fuertemente que el fragmento N-terminal como se describe en la presente memoria forma una conformación terciaria, que es similar a su estructura que existe normalmente *in vivo*. Se realizó un ensayo muy sensible para determinar la importancia de la integridad estructural de los aminoácidos 1-27 del fragmento de polipéptido N-terminal de CD3 épsilon. Los aminoácidos individuales de los aminoácidos 1-27 del fragmento de polipéptido N-terminal de CD3 épsilon se cambiaron a alanina (escaneo de alanina) para ensayar la sensibilidad de los aminoácidos 1-27 del fragmento de polipéptido N-terminal de CD3 épsilon respecto a alteraciones menores. Se usaron moléculas de anticuerpo específicas de CD3 como parte de una molécula de unión biespecífica de la invención para ensayar la unión a los mutantes de alanina de los aminoácidos 1-27 del fragmento de polipéptido N-terminal de CD3 épsilon (véase el Ejemplo 5 adjunto). Los intercambios individuales de los primeros cinco residuos de aminoácidos en el extremo N-terminal del fragmento y dos de los aminoácidos en las posiciones 23 y 25 de los aminoácidos 1-27 del fragmento de polipéptido N-terminal de CD3 épsilon fueron críticos para la unión de las moléculas de anticuerpo. La sustitución de los residuos de aminoácidos en la región de la posición 1-5 que comprende los residuos Q (Glutamina en la posición 1), D (Ácido aspártico en la posición 2), G (Glicina en la posición 3), N (Asparagina en la posición 4), y E (Ácido glutámico en la posición 5) a Alanina suprimió la unión de las moléculas de unión, preferiblemente humanas, de la invención a dicho fragmento. Mientras, para al menos algunas de las moléculas de unión, preferiblemente humanas, de la invención, dos residuos de aminoácidos en el extremo C del fragmento mencionado, T (Treonina at en la posición 23) e I (Isoleucina en la posición 25) redujeron la energía de unión a las moléculas de unión, preferiblemente humanas, de la invención.

Inesperadamente, se ha encontrado que las moléculas de unión, preferiblemente humanas, así aisladas no sólo reconocen el fragmento N-terminal de CD3 épsilon humana, sino también los fragmentos homólogos correspondientes de CD3 épsilon de varios primates, incluyendo Monos del Nuevo Mundo (Tití, *Callithrix jacchus*; *Saguinus oedipus*; *Saimiri sciureus*) y Monos del Viejo Mundo (*Macaca fascicularis*, también conocido como *Mono Cynomolgus*; o *Macaca mulatta*, también conocido como *Mono Rhesus*). Así, se detectó la especificidad para múltiples primates de las moléculas de unión a CD3 de la invención. Los siguientes análisis de secuencias confirmaron que los seres humanos y los primates comparten una cadena de secuencia altamente homóloga en el extremo N del dominio extracelular de CD3 épsilon.

Se ha encontrado en la presente invención como se define en las reivindicaciones que es posible generar moléculas de unión, preferiblemente humanas, específicas de CD3 épsilon en donde la molécula idéntica puede usarse en ensayo preclínico en animales, así como en estudios clínicos e incluso en terapia en seres humanos. Esto se debe a la identificación inesperada de moléculas de unión, preferiblemente humanas, que, además de unirse a CD3 épsilon humana (y debido a la similitud genética probablemente al equivalente de chimpancé), también se unen a los homólogos de dichos antígenos de primates distintos de chimpancé, incluyendo Monos del Nuevo Mundo y Monos del Viejo Mundo. Como se muestra en los siguientes Ejemplos, dichas moléculas de unión, preferiblemente humanas, específicas de CD3 épsilon pueden integrarse en anticuerpos de cadena única biespecíficos con el fin de generar agentes terapéuticos frente a varias enfermedades, incluyendo, pero no limitado a, cáncer o trastornos inmunológicos. Así, desaparece la necesidad de construir un dominio de unión a CD3 épsilon subrogado o un anticuerpos de cadena única biespecífico incluyendo los mismos para ensayo en una especie filogenética distante (de los seres humanos). Como resultado, la misma molécula puede usarse en ensayo preclínico en animales como la que se pretende administrar a los seres humanos en el ensayo clínico, así como después de su aprobación comercial y administración del fármaco terapéutico. La capacidad para usar la misma molécula para el ensayo preclínico en animales como en la administración posterior a los seres humanos prácticamente elimina, o al menos reduce en gran medida, el peligro de que los datos obtenidos en el ensayo preclínico en animales tengan una aplicabilidad limitada al caso humano.

Brevemente, la obtención de datos de seguridad preclínicos en animales usando la misma molécula que la que se administrará realmente a los seres humanos contribuye mucho en asegurar la aplicabilidad de los datos a un escenario humano relevante. Por el contrario, en las estrategias convencionales usando moléculas subrogadas, dichas moléculas subrogadas tienen que adaptarse molecularmente al sistema de ensayo en animales usado para la evaluación preclínica de la seguridad. Así, la molécula que se va a usar en terapia humana es diferente de hecho en secuencia y también probablemente en estructura de la molécula subrogada usada en el ensayo preclínico en los parámetros farmacocinéticos y/o actividad biológica, con la consecuencia de que los datos obtenidos en el ensayo preclínico en animales tienen aplicabilidad/transferabilidad limitada al caso humano. El uso de moléculas subrogadas requiere la construcción, producción, purificación y caracterización de una construcción completamente nueva. Esto da lugar a costes y tiempo de desarrollo adicionales, necesarios para obtener esa molécula. En resumen, los subrogados tienen que desarrollarse separadamente además del fármaco real que se va a usar en la terapia humana, de manera que tienen que llevarse a cabo dos líneas de desarrollo para dos moléculas. Por lo tanto, una ventaja principal de la molécula de unión humana o de construcciones basadas en anticuerpo que presentan especificidad entre especies descritas en la presente memoria es que puede usarse la molécula idéntica para terapia en los seres humanos y en el ensayo preclínico en animales.

Se prefiere que las moléculas de unión de la invención capaces de unirse a un epítipo de la cadena CD3 épsilon humana y de primates distintos del chimpancé tengan un origen humano. Además, debido al origen humano de las moléculas de unión humanas de la invención, la generación de una reacción inmune frente a dichas moléculas de unión se excluye hasta el máximo grado posible después de la administración de las moléculas de unión a pacientes humanos.

Otra ventaja principal de las moléculas de unión, preferiblemente humanas, específicas de CD3 épsilon como parte de una molécula de unión biespecífica de la invención es su aplicabilidad para el ensayo preclínico en varios primates. El comportamiento de un candidato a fármaco en animales debería ser, idealmente, indicativo del comportamiento esperado de este candidato a fármaco después de la administración a los seres humanos. Como resultado, los datos obtenidos de dicho ensayo preclínico deberían tener, por lo tanto, generalmente un alto poder predictivo para el caso humano. Sin embargo, como se ha aprendido del resultado trágico del ensayo clínico de Fase I reciente respecto a TGN1412 (un anticuerpo monoclonal frente a CD28), un candidato a fármaco puede actuar de manera diferente en una especie de primate que en los seres humanos: Mientras en el ensayo preclínico de dicho anticuerpo no se observaron o sólo se observaron efectos adversos limitados en estudios en animales realizados con monos cynomolgus, seis pacientes humanos desarrollaron fallo orgánico múltiple después de la administración de dicho anticuerpo (Lancet 368 (2006), 2206-7). Los resultados de estos eventos negativos no deseados sugieren que puede no ser suficiente limitar el ensayo preclínico a sólo una especie (de primate). El hecho de que las moléculas de unión humanas específicas de CD3 épsilon de la invención se unan a una serie de Monos del Nuevo Mundo y del Viejo Mundo puede ayudar a superar los problemas encontrados en el caso mencionado anteriormente. De acuerdo con esto, la presente invención, como se define en las reivindicaciones, proporciona medios y métodos para minimizar las diferencias entre especies respecto a los efectos cuando se están desarrollando y ensayando fármacos para terapia humana.

Con el dominio de unión, preferiblemente humano, a CD3 épsilon específico entre especies como parte de una molécula de unión biespecífica de la invención, tampoco es ya necesario adaptar el animal de ensayo al candidato a fármaco pretendido para administración a los seres humanos, tal como, p. ej., la creación de animales transgénicos. Las moléculas de unión, preferiblemente humanas, específicas de CD3 épsilon (o anticuerpos de cadena única biespecíficos que contienen las mismas), que presentan especificidad entre especies según los usos y los métodos de la invención pueden usarse directamente para el ensayo preclínico en primates distintos de chimpancés, sin ninguna manipulación genética de los animales. Como es muy conocido para los expertos en la técnica, las estrategias en las que el animal de ensayo se adapta al candidato a fármaco siempre presentan el riesgo de que los resultados obtenidos en el ensayo preclínico de seguridad sean menos representativos y predictivos para los seres humanos debido a la modificación del animal. Por ejemplo, en los animales transgénicos, las proteínas codificadas por los transgenes frecuentemente están altamente sobreexpresadas. Así, los datos obtenidos para la actividad biológica de un anticuerpo frente a este antígeno proteico pueden estar limitados en su valor predictivo para los seres humanos en los que la proteína se expresa a niveles mucho menores, más fisiológicos.

Una ventaja adicional de los usos de las moléculas de unión, preferiblemente humanas, específicas de CD3 épsilon (o anticuerpos de cadena única biespecíficos que contienen las mismas) que presentan especificidad entre especies es el hecho de que se evitan los chimpancés, como una especie en peligro de extinción, para el ensayo en animales. Los chimpancés son los parientes más cercanos a los seres humanos y se agruparon recientemente en la familia de los homínidos sobre la base de los datos de secuenciación genómica (Wildman et al., PNAS 100 (2003), 7181). Por lo tanto, se considera generalmente que los datos obtenidos con chimpancés son altamente predictivos para los seres humanos. Sin embargo, debido a su estado de especie en peligro de extinción, el número de chimpancés que puede usarse para experimentos médicos está altamente restringido. Como se ha indicado anteriormente, el mantenimiento de los chimpancés para el ensayo en animales es, por lo tanto, problemático tanto desde un punto de vista de coste como ético. Los usos de moléculas de unión, preferiblemente humanas, específicas de CD3 épsilon de la invención (o anticuerpos de cadena única biespecíficos que contienen las mismas) evita tanto las objeciones éticas como la carga financiera durante el ensayo preclínico sin perjudicar la calidad, es decir, aplicabilidad, de los datos obtenidos en el ensayo en animales. A la vista de esto, los usos de moléculas de unión, preferiblemente humanas, específicas

de CD3 épsilon (o anticuerpos de cadena única biespecíficos que contienen las mismas) proporciona una alternativa razonable para los estudios en chimpancés.

Una ventaja adicional de las moléculas de unión, preferiblemente humanas, específicas de CD3 épsilon de la invención (o anticuerpos de cadena única biespecíficos que contienen las mismas) es la capacidad de extraer múltiples muestras de sangre cuando se usa como parte de un ensayo preclínico en animales, por ejemplo, en el curso de estudios farmacocinéticos en animales. Las múltiples extracciones de sangre pueden obtenerse muchos más fácilmente con un primate distinto del chimpancé que con animales inferiores, p. ej., un ratón. La extracción de múltiples muestras de sangre permite el ensayo continuo de los parámetros sanguíneos para la determinación de los efectos biológicos inducidos por la molécula de unión, preferiblemente humana (o anticuerpo de cadena única biespecífico) de la invención. Además, la extracción de múltiples muestras de sangre permite al investigador evaluar el perfil farmacocinético de la molécula de unión, preferiblemente humana (o anticuerpo de cadena única biespecífico que contiene la misma) como se define en la presente memoria. Además, los efectos secundarios potenciales, que pueden inducirse por dicha molécula de unión, preferiblemente humana, (o anticuerpo de cadena única biespecífico que contiene la misma) reflejados en los parámetros sanguíneos pueden medirse en diferentes muestras de sangre extraídas durante el curso de la administración de dicho anticuerpo. Esto permite la determinación del perfil de toxicidad potencial de la molécula de unión, preferiblemente humana (o anticuerpo de cadena única biespecífico que contiene la misma) como se define en la presente memoria.

Las ventajas de las moléculas de unión, preferiblemente humanas (o anticuerpos de cadena única biespecíficos) como se define en la presente memoria que presentan especificidad entre especies pueden resumirse brevemente como sigue:

En primer lugar, las moléculas de unión, preferiblemente humanas (o anticuerpos de cadena única biespecíficos) como se define en la presente memoria usadas en el ensayo preclínico son las mismas que las usadas en terapia humana. Así, ya no es necesario desarrollar dos moléculas independientes, que pueden diferenciarse en sus propiedades farmacocinéticas y actividad biológica. Esto es altamente ventajoso ya que, p. ej., los resultados farmacocinéticos son más directamente transferibles y aplicables al entorno humano que, p. ej., en las estrategias con subrogados convencionales.

En segundo lugar, los usos de las moléculas de unión, preferiblemente humanas (o anticuerpos de cadena única biespecíficos) como se define en la presente memoria para la preparación de agentes terapéuticos en el ser humano son menos costosos y trabajosos que las estrategias con subrogados.

En tercer lugar, las moléculas de unión, preferiblemente humanas (o anticuerpos de cadena única biespecíficos) como se define en la presente memoria pueden usarse para el ensayo preclínico no sólo en una especie de primate, sino en una serie de diferentes especies de primates, limitando de esta manera el riesgo de diferencias potenciales entre especies entre primates y seres humanos.

En cuarto lugar, se evita el chimpancé, como una especie en peligro de extinción, para el ensayo en animales.

En quinto lugar, pueden extraerse múltiples muestras de sangre para estudios farmacocinéticos exhaustivos.

En sexto lugar, debido al origen humano de las moléculas de unión, preferiblemente humanas, según una realización preferida de la invención, la generación de una reacción inmune frente a dichas moléculas de unión se minimiza cuando se administran a pacientes humanos. Se excluye la inducción de una respuesta inmune con anticuerpos específicos para un candidato a fármaco derivado de una especie no humana como, p. ej., un ratón que da lugar al desarrollo de anticuerpo humano antiratón (HAMA) frente a las moléculas terapéuticas de origen murino.

El término "proteína" es muy conocido en la técnica y describe compuestos biológicos. Las proteínas comprenden una o más cadenas de aminoácidos (polipéptidos), en las que los aminoácidos están unidos entre sí mediante un enlace peptídico. El término "polipéptido", tal y como se usa en la presente memoria, describe un grupo de moléculas, que consisten en más de 30 aminoácidos. Según la invención, el grupo de polipéptidos comprende "proteínas" siempre que las proteínas consistan en un único polipéptido. También, en línea con la definición, el término "polipéptido" describe fragmentos de proteínas siempre que estos fragmentos consistan en más de 30 aminoácidos. Los polipéptidos pueden formar además multímeros tales como dímeros, trímeros y oligómeros superiores, es decir, que consisten en más de una molécula de polipéptido. Las moléculas de polipéptido que forman dichos dímeros, trímeros etc. pueden ser idénticas o no idénticas. Las estructuras de orden superior correspondientes de dichos multímeros se denominan, consecuentemente, homo o heterodímeros, homo o heterotrímeros etc. Un ejemplo de un heteromultímero es una molécula de anticuerpo, que, en su forma natural, consiste en dos cadenas de polipéptido ligeras idénticas y dos cadenas de polipéptido pesadas idénticas. Los términos "polipéptido" y "proteína" también se refieren a polipéptidos/proteínas modificados naturalmente en donde la modificación se efectúa, p. ej., por modificaciones posteriores a la traducción como glicosilación, acetilación, fosforilación y semejantes. Dichas modificaciones son muy conocidas en la técnica.

Tal y como se usa en la presente memoria, "ser humano" y "hombre" se refiere a la especie *Homo sapiens*. Respecto a los usos médicos de las construcciones descritas en la presente memoria, los pacientes humanos van a ser tratados con la misma molécula.

El término "origen humano", tal y como se usa en el contexto con las moléculas de la invención, describe moléculas derivables de bibliotecas humanas o que tienen una estructura/secuencia correspondiente al equivalente humano. De acuerdo con esto, las proteínas que tienen una secuencia de aminoácidos correspondiente con la secuencia humana análoga, p. ej., un fragmento de anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos en la región marco correspondiente a las secuencias de la línea germinal humana, se entienden como moléculas de origen humano.

Tal y como se usa en la presente memoria, un "primate distinto del chimpancé" o " primate distinto del chimp" o variantes gramaticales de las mismas, se refiere a cualquier primate distinto del chimpancé, es decir, distinto de un animal que pertenece al género *Pan*, e incluyendo las especies *Pan paniscus* y *Pan troglodytes*, también conocidas como *Anthropopithecus troglodytes* o *Simia satyrus*. Un "primate", "especie de primate", "primates" o variantes gramaticales de las mismas, indica/n un orden de mamíferos euterianos dividido en dos subórdenes de prosimios y antropoides y que comprende hombre, simios, monos y lémures. Específicamente, "primates", tal y como se usa en la presente memoria, comprende el suborden *Strepsirrhini* (prosimios distintos del tarsero), incluyendo el infraorden *Lemuriformes* (incluso él mismo las superfamilias *Cheirogaleidae* y *Lemuroidae*), el infraorden *Chiromyiformes* (incluso él mismo la familia *Daubentoniidae*) y el infraorden *Lorisiformes* (incluso él mismo las familias *Lorisiidae* y *Galagidae*). Los "primates", tal y como se usan en la presente memoria, también comprenden el suborden *Haplorrhini*, incluyendo el infraorden *Tarsiiformes* (incluso él mismo la familia *Tarsiidae*), el infraorden *Simiiformes* (incluso él mismo los *Platyrrhini*, o monos del Nuevo Mundo, y el *Catarrhini*, incluyendo los *Cercopithecoidea*, o Monos del Viejo Mundo).

La especie de primate distinto del chimpancé puede entenderse que, dentro del significado de la invención, sea un lémur, un tarsero, un gibón, un tití (que pertenece a los Monos del Nuevo Mundo de la familia *Cebidae*) o un Mono del Viejo Mundo (que pertenece a la superfamilia *Cercopithecoidea*).

Tal y como se usa en la presente memoria, un "Mono del Viejo Mundo" comprende cualquier mono que se encuentra en la superfamilia *Cercopithecoidea*, ella misma subdividida en las familias: la *Cercopithecinae*, que son principalmente africanos, pero incluye el género diverso de macacos que son asiáticos y norafricanos; y la *Colobinae*, que incluye la mayor parte de los géneros asiáticos, pero también los monos colobos africanos.

Específicamente, dentro de la subfamilia *Cercopithecinae*, un primate ventajoso distinto del chimpancé puede ser de la Tribu *Cercopithecini*, dentro del género *Allenopithecus* (Mono del Pantano de Allen, *Allenopithecus nigroviridis*); dentro del género *Miopithecus* (Talapoin Angoleño, *Miopithecus talapoin*; Talapoin de Gabón, *Miopithecus ogouensis*); dentro del género *Erythrocebus* (Mono Patas, *Erythrocebus patas*); dentro del género *Chlorocebus* (Mono Verde, *Chlorocebus sabaceus*; Grivet, *Chlorocebus aethiops*; Cercopiteco de las Montañas Bale, *Chlorocebus djamdjamensis*; Mono Tántalo, *Chlorocebus tantalus*; Mono Vervet, *Chlorocebus pygerythrus*; Malbrouck, *Chlorocebus cynosuros*); o dentro del género *Cercopithecus* (Mono Dryas o Mono Salongo, *Cercopithecus dryas*; Mono de Diana, *Cercopithecus diana*; Mono Roloway, *Cercopithecus roloway*; Mono de Nariz Blanca, *Cercopithecus nictitans*; Mono Azul, *Cercopithecus mitis*; Mono Plateado, *Cercopithecus doggetti*; Mono Dorado, *Cercopithecus kandti*; Mono de Sykes, *Cercopithecus albogularis*; Mono de Mona, *Cercopithecus mona*; Mono de Mona de Campbell, *Cercopithecus campbelli*; Mono de Mona de Lowe, *Cercopithecus lowei*; Mono de Mona con Cresta, *Cercopithecus pogonias*; Mono de Mona de Wolf, *Cercopithecus wolffi*; Mono de Mona de Dent, *Cercopithecus denti*; Mono Menor de Nariz Blanca, *Cercopithecus petaurista*; Mono de Garganta Blanca, *Cercopithecus erythrogaster*; Mono de Sclater, *Cercopithecus sclateri*; Mono de Orejas Rojas, *Cercopithecus erythrotis*; Mono de Hocico Azul, *Cercopithecus cephus*; Mono de Cola Roja, *Cercopithecus ascanius*; Mono de L'Hoest, *Cercopithecus lhoesti*; Mono de Preuss, *Cercopithecus preussi*; Mono de Cola Sol, *Cercopithecus solatus*; Mono de Hamlyn o Mono de Cara de Búho, *Cercopithecus hamlyni*; Mono de De Brazza, *Cercopithecus neglectus*).

Alternativamente, un primate distinto del chimpancé ventajoso, también dentro de la subfamilia *Cercopithecinae* pero dentro de la Tribu *Papionini*, puede estar dentro del género *Macaca* (Macaco Barbary, *Macaca sylvanus*; Macaco con Cola de León, *Macaca silenus*; Macaco con Cola de Cerdo Sureño o Beruk, *Macaca nemestrina*; Macaco con Cola de Cerdo Norteño, *Macaca leonina*; Macaco de la isla Pagai o Bokkoi, *Macaca pagensis*; Macaco de Siberut, *Macaca siberu*; Macaco de Moor, *Macaca maura*; Macaco con Botas, *Macaca ochreata*; Macaco de Tonkean, *Macaca tonkeana*; Macaco de Heck, *Macaca hecki*; Macaco de Gorontalo, *Macaca nigrescens*; Macaco con Cresta de las Célebes o "Simio" Negro, *Macaca nigra*; mono *Cynomolgus* o Macaco Cangrejero o Macaco de Cola Larga o Kera, *Macaca fascicularis*; Macaco con Cola de Muñón o Macaco Oso, *Macaca arctoides*; Macaco Rhesus, *Macaca mulatta*; Macaco de la Roca de Formosán, *Macaca cyclopis*; Macaco Japonés, *Macaca fuscata*; Macaco de Toque, *Macaca sinica*; Macaco Coronado, *Macaca radiata*; Macaco de Berberia, *Macaca sylvanus*; Macaco de Assam, *Macaca assamensis*; Macaco Tibetano o Macaco de Milne-Edwards, *Macaca thibetana*; Macaco Arunachal o Munzala, *Macaca munzala*); dentro del género *Lophocebus* (Mangabeye de Mejilla Gris, *Lophocebus albigena*; *Lophocebus albigena albigena*; *Lophocebus albigena osmani*; *Lophocebus albigena johnstoni*; Mangabeye de Cresta Negra, *Lophocebus aterrimus*; Mangabeye de Opdenbosch, *Lophocebus opdenboschi*; Mangabeye de Altiplanicie, *Lophocebus kipunji*); dentro del género *Papio* (Babuino Hamadryas, *Papio hamadryas*; Babuino de Guinea, *Papio papio*; Babuino Oliva, *Papio anubis*; Babuino Amarillo, *Papio cynocephalus*; Babuino Chacma, *Papio ursinus*); dentro del género *Theropithecus* (Gelada, *Theropithecus gelada*); dentro del género *Cercocebus* (Mangabeye Gris, *Cercocebus atys*; *Cercocebus atys atys*; *Cercocebus atys lunulatus*; Mangabeye de Collar Blanco, *Cercocebus torquatus*; Mangabeye Ágil, *Cercocebus agilis*; Mangabeye de Vientre Dorado, *Cercocebus chrysogaster*; Mangabeye del Río Tana, *Cercocebus galeritus*; Mangabeye del Sanje, *Cercocebus sanjei*); o dentro del género *Mandrillus* (Mandrill, *Mandrillus sphinx*; Dril, *Mandrillus leucophaeus*).

El más preferido es *Macaca fascicularis* (también conocido como mono Cynomolgus y, por lo tanto, denominado en los Ejemplos "Cynomolgus") y *Macaca mulatta* (mono rhesus, denominado "rhesus").

5 Dentro de la subfamilia *Colobinae*, un primate distinto del chimpancé ventajoso puede ser del grupo africano, dentro del género *Colobus* (Colobo Negro, *Colobus satanas*; Colobo de Angola, *Colobus angolensis*; Colobo Rey, *Colobus polikomus*; Colobo Ursina, *Colobus vellerosus*; Guereza Manto, *Colobus guereza*); dentro del género *Ptilocolobus* (Colobo Rojo Occidental, *Ptilocolobus badius*; *Ptilocolobus badius badius*; *Ptilocolobus badius temminckii*; *Ptilocolobus badius waldroneae*; Colobo de Pennant, *Ptilocolobus pennantii*; *Ptilocolobus pennantii pennantii*; *Ptilocolobus pennantii epieni*; *Ptilocolobus pennantii bouvieri*; Colobo Rojo de Preuss, *Ptilocolobus preussi*; Colobo Rojo de Thollon, *Ptilocolobus tholloni*; Colobo Rojo Centroafricano, *Ptilocolobus foai*; *Ptilocolobus foai foai*; *Ptilocolobus foai ellioti*; *Ptilocolobus foai oustaleti*; *Ptilocolobus foai semlikiensis*; *Ptilocolobus foai parmentierorum*; Colobo Rojo de Uganda, *Ptilocolobus tephrosceles*; Colobo Rojo de Uzungwa, *Ptilocolobus gordonorum*; Colobo Rojo de Zanzíbar, *Ptilocolobus kirkii*; Colobo Rojo del Río Tana, *Ptilocolobus rufomitratu*); o dentro del género *Procolobus* (Colobo Oliva, *Procolobus verus*).

15 Dentro de la subfamilia *Colobinae*, un primate distinto del chimpancé ventajoso puede ser, alternativamente, del grupo Langur (mono de la hoja), dentro del género *Semnopithecus* (Langur Gris de Nepal, *Semnopithecus schistaceus*; Langur Gris de Cashemira, *Semnopithecus ajax*; Langur Gris de Tarai, *Semnopithecus hector*; Langur Gris de las Planicies Norteñas, *Semnopithecus entellus*; Langur Gris de Pies Negros, *Semnopithecus hypoleucus*; Langur Gris de las Planicies Sureñas, *Semnopithecus dussumieri*; Langur Gris Moñudo, *Semnopithecus priam*); dentro del grupo *T. vetulus* o el género *Trachypithecus* (Langur de Cara Morada, *Trachypithecus vetulus*; Langur Nilgiri, *Trachypithecus johnii*); dentro del grupo *T. cristatus* o el género *Trachypithecus* (Lutung de Java, *Trachypithecus auratus*; Mono de la Hoja Plateado o Lutung Plateado, *Trachypithecus cristatus*; Lutung de Indochina, *Trachypithecus germaini*; Lutung de Tenasserim, *Trachypithecus barbei*); dentro del grupo *T. obscurus* del género *Trachypithecus* (Mono de la Hoja Oscuro o Mono de la Hoja con Anteojos, *Trachypithecus obscurus*; Mono de la Hoja de Phayre, *Trachypithecus phayrei*); dentro del grupo *T. pileatus* del género *Trachypithecus* (Langur Capuchino, *Trachypithecus pileatus*; Langur de Shortridge, *Trachypithecus shortridgei*; Langur Dorado de Gee, *Trachypithecus geei*); dentro del grupo *T. francoisi* del género *Trachypithecus* (Langur de Francois, *Trachypithecus francoisi*; Langur de Hatinh, *Trachypithecus hatinhensis*; Langur de Cabeza Blanca, *Trachypithecus poliocephalus*; Langur Laosiano, *Trachypithecus laotum*; Langur de Delacour, *Trachypithecus delacouri*; Langur Negro de Indochina, *Trachypithecus ebenus*); o dentro del género *Presbytis* (Suriil de Sumatra, *Presbytis melalophos*; Suriil con Bandas, *Presbytis femoralis*; Suriil de Sarawak, *Presbytis chrysomelas*; Suriil de Muslos Blancos, *Presbytis siamensis*; Suriil de Frente Blanca, *Presbytis frontata*; Suriil de Java, *Presbytis comata*; Langur de Thomas, *Presbytis thomasi*; Langur de Hose, *Presbytis hosei*; Mono de la Hoja Marrón, *Presbytis rubicunda*; Langur de Mentawai o Joja, *Presbytis potenziani*; Suriil de la Isla Natuna, *Presbytis natunae*).

25 Dentro de la subfamilia *Colobinae*, un primate distinto del chimpancé ventajoso puede ser, alternativamente, del grupo con Nariz Rara, dentro del género *Pygathrix* (Douc de Canillas Rojas, *Pygathrix nemaus*; Douc de Canillas Negras, *Pygathrix nigripes*; Douc de Canillas Grises, *Pygathrix cinerea*); dentro del género *Rhinopithecus* (Mono con Nariz Chata Dorado, *Rhinopithecus roxellana*; Mono con Nariz Chata negro, *Rhinopithecus bieti*; Mono con Nariz Chata Gris, *Rhinopithecus brelichii*; Langur con Nariz Chata de Tonkin, *Rhinopithecus avunculus*); dentro del género *Nasalis* (Mono Narigudo, *Nasalis larvatus*); o dentro del género *Simias* (Langur de Cola de Cerdo, *Simias concolor*).

35 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "tití" indica cualquiera de los Monos del Nuevo Mundo del género *Callithrix*, que pertenecen, por ejemplo, a los titís atlánticos del subgénero *Callithrix* (sic!) (Tití Común, *Callithrix (Callithrix) jacchus*; Tití de Pincel Negro, *Callithrix (Callithrix) penicillata*; Tití de Wied, *Callithrix (Callithrix) kuhlii*; Tití de Cabeza Blanca, *Callithrix (Callithrix) geoffroyi*; Tití de Cabeza Beige, *Callithrix (Callithrix) flaviceps*; Tití de Orejas Blancas, *Callithrix (Callithrix) aurita*); que pertenecen a los titís del Amazonas subgénero *Mico* (Tití del Río Acari, *Callithrix (Mico) acariensis*; Tití Manicore, *Callithrix (Mico) manicorensis*; Tití Plateado, *Callithrix (Mico) argentata*; Tití Blanco, *Callithrix (Mico) leucippe*; Tití de Emilia, *Callithrix (Mico) emiliae*; Tití de Cabeza Negra, *Callithrix (Mico) nigricaps*; Tití de Marca, *Callithrix (Mico) marcai*; Tití de Cola negra, *Callithrix (Mico) melanura*; Tití de Santarem, *Callithrix (Mico) humeralifera*; Tití de Maues, *Callithrix (Mico) mauesi*; Tití Dorado y Blanco, *Callithrix (Mico) chrysoleuca*; Tití de Hershkovitz, *Callithrix (Mico) intermedia*; Tití de Satéré, *Callithrix (Mico) saterei*); Tití Enano de Roosmalen que pertenece al subgénero *Callibella* (*Callithrix (Callibella) humilis*); o el Tití Pigmeo que pertenece al subgénero *Cebuella* (*Callithrix (Cebuella) pygmaea*).

Otros géneros de los Monos del Nuevo Mundo comprenden tamarinos del género *Saguinus* (que comprende el grupo *S. oedipus*, el grupo *S. midas*, el grupo *S. nigricollis*, el grupo *S. mystax*, el grupo *S. bicolor* y el grupo *S. inustus*) y monos ardilla del género *Saimiri* (p. ej., *Saimiri sciureus*, *Saimiri oerstedii*, *Saimiri ustus*, *Saimiri boliviensis*, *Saimiri vanzolini*).

55 El término "dominio de unión" caracteriza, en conexión con la presente invención, a un dominio de un polipéptido que se une/interacciona específicamente con una estructura/antígeno/epitopo diana dado. Así, el dominio de unión es un "sitio de interacción con antígenos". El término "sitio de interacción con antígenos" define, según la presente invención, un resto de un polipéptido, que es capaz de interaccionar específicamente con un antígeno específico o un grupo específico de antígenos, p. ej., el antígeno idéntico en diferentes especies. Dicha unión/interacción también se entiende para definir un "reconocimiento específico". El término "que reconoce específicamente" significa, según esta invención, que la molécula de anticuerpo es capaz de interaccionar específicamente con y/o unirse al menos a dos,

preferiblemente al menos a tres, más preferiblemente al menos a cuatro aminoácidos de un antígeno, p. ej., el antígeno CD3 humano como se define en la presente memoria. Dicha unión puede ejemplificarse por la especificidad de un "principio de cerradura y llave". Así, los restos específicos en la secuencia de aminoácidos del dominio de unión y el antígeno se unen entre sí como resultado de su estructura primaria, secundaria o terciaria, así como el resultado de modificaciones secundarias de dicha estructura. La interacción específica del sitio de interacción con antígenos con su antígeno específico puede dar como resultado también una unión simple de dicho sitio al antígeno. Además, la interacción específica del sitio de interacción con antígenos con su antígeno específico puede dar como resultado alternativamente al inicio de una señal, p. ej., debido a la inducción de un cambio en la conformación del antígeno, una oligomerización del antígeno, etc. Un ejemplo preferido de un dominio de unión, en línea con la presente invención, es un anticuerpo. El dominio de unión puede ser un anticuerpo monoclonal o policlonal o derivar de un anticuerpo monoclonal o policlonal.

El término "anticuerpo" comprende derivados o fragmentos funcionales del mismo que todavía retienen la especificidad de unión. Las técnicas para la producción de anticuerpos son muy conocidas en la técnica y se describen, p. ej., en Harlow y Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988 y Harlow y Lane "Using Antibodies: A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999. El término "anticuerpo" también comprende inmunoglobulinas (Ig) de diferentes clases (es decir, IgA, IgG, IgM, IgD e IgE) y subclases (tales como IgG1, IgG2 etc.). Estos anticuerpos pueden usarse, por ejemplo, para la inmunoprecipitación, purificación por afinidad e inmunolocalización de los polipéptidos o proteínas de fusión de la invención, así como para la monitorización de la presencia y cantidad de dichos polipéptidos, por ejemplo, en cultivos de células u organismos procariontes o eucariotes recombinantes.

La definición del término "anticuerpo" también incluye realizaciones tales como anticuerpos quiméricos, de cadena única y humanizados, así como fragmentos de anticuerpo, como, entre otros, fragmentos Fab. Los fragmentos o derivados de anticuerpos comprenden además fragmentos F(ab')₂, Fv, scFv o anticuerpos de dominio único, anticuerpos de dominio variable único o dominio variable único de inmunoglobulina que comprenden meramente un dominio variable, que podría ser VH o VL, que se une específicamente a un antígeno o epítipo independientemente de otras regiones o dominios V; véase, por ejemplo, Harlow y Lane (1988) y (1999), loc. cit. Dicho dominio variable único de inmunoglobulina engloba no sólo un polipéptido de dominio variable único de anticuerpo aislado, sino también polipéptidos mayores que comprenden uno o más monómeros de una secuencia de polipéptido de dominio variable único de anticuerpo.

En la técnica se conocen varios procedimientos y pueden usarse para la producción de dichos anticuerpos y/o fragmentos. Así, los derivados (de anticuerpo) pueden producirse por peptidomimética. Además, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena única (véase, entre otros, la Patente US 4.946.778) pueden adaptarse para producir anticuerpos de cadena única específicos para polipéptido(s) elegido(s). También, pueden usarse animales transgénicos para expresar anticuerpos humanizados específicos para polipéptidos y proteínas de fusión de esta invención. Para la preparación de anticuerpos monoclonales, puede usarse cualquier técnica, que proporcione anticuerpos producidos por cultivos de líneas celulares continuas.

Los ejemplos de dichas técnicas incluyen la técnica del hibridoma (Kohler y Milstein Nature 256 (1975), 495-497), la técnica del trioma, la técnica del hibridoma de células B humanas (Kozbor, Immunology Today 4 (1983), 72) y la técnica del hibridoma de EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc. (1985), 77-96). La resonancia de plasmón superficial, como se emplea en el sistema BIAcore, puede usarse para incrementar la eficiencia de anticuerpos de fago que se unen a un epítipo de un polipéptido diana, tal como CD3 épsilon (Schier, Human Antibodies Hybridomas 7 (1996), 97-105; Malmberg, J. Immunol. Methods 183 (1995), 7-13). También se prevé, en el contexto de esta invención, que el término "anticuerpo" comprenda construcciones de anticuerpo, que pueden expresarse en un huésped como se describe en la presente memoria más adelante, p. ej., construcciones de anticuerpo que pueden transfectarse y/o transducirse, entre otros, mediante virus o vectores plasmídicos.

El término "interacción específica", tal y como se usa según la presente invención, significa que la molécula (dominio) de unión no reacciona o no reacciona significativamente de manera cruzada con polipéptidos que tienen una estructura similar a los que se une la molécula de unión, y que podría expresarse por las mismas células que el polipéptido de interés. Puede ensayarse la reactividad cruzada de un panel de moléculas de unión bajo investigación, por ejemplo, evaluando la unión de dicho panel de moléculas de unión bajo condiciones convencionales (véase, p. ej., Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988 y Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999). Los ejemplos para la interacción específica de un dominio de unión con un antígeno específico comprenden la especificidad de un ligando para su receptor. Dicha definición comprende particularmente la interacción de ligandos, que inducen una señal después de la unión a su receptor específico. Los ejemplos de dicha interacción, que está también particularmente comprendida por dicha definición, es la interacción de un determinante antigénico (epítipo) con el dominio de unión (sitio de unión antigénico) de un anticuerpo.

El término "especificidad entre especies" o "especificidad interespecies", tal y como se usa en la presente memoria, significa la unión de un dominio de unión descrito en la presente memoria a la misma molécula diana en los seres humanos y primates distintos de chimpancés. Así, "especificidad entre especies" o "especificidad interespecies" debe

entenderse como una reactividad interespecies frente a la misma molécula X expresada en diferentes especies, pero no frente a una molécula distinta de X. La especificidad entre especies de un anticuerpo monoclonal que reconoce, p. ej., CD3 épsilon humana, frente a CD3 épsilon de primate distinto del chimpancé, p. ej., CD3 épsilon de macaco, puede determinarse, por ejemplo, por análisis FACS. El análisis FACS se lleva a cabo de una manera tal que el anticuerpo monoclonal respectivo se ensaya para determinar la unión a células humanas y de primate distinto del chimpancé, p. ej., células de macaco, que expresan dichos antígenos CD3 épsilon humanos y de primate distinto del chimpancé, respectivamente. Un ensayo apropiado se muestra en los siguientes ejemplos.

Tal y como se usa en la presente memoria, CD3 épsilon indica una molécula expresada como parte del receptor de las células T y tiene el significado como se le asigna típicamente en la técnica anterior. En los seres humanos, engloba de forma individual o combinada independientemente, todas las subunidades conocidas de CD3, por ejemplo, CD3 épsilon, CD3 delta, CD3 gamma, CD3 zeta, CD3 alfa y CD3 beta. Los antígenos CD3 de primate distinto del chimpancé como se refieren en la presente memoria son, por ejemplo, CD3 de *Macaca fascicularis* y CD3 de *Macaca mulatta*. En *Macaca fascicularis*, engloba CD3 épsilon negativo para FN-18 y CD3 épsilon positivo para FN-18, CD3 gamma y CD3 delta. En *Macaca mulatta*, engloba CD3 épsilon, CD3 gamma y CD3 delta. Preferiblemente, dicho CD3, tal y como se usa en la presente memoria, es CD3 épsilon.

El CD3 épsilon humano está indicado en el No. de Acceso de GenBank NM_000733 y comprende la SEQ ID NO. 1. El CD3 gamma humano está indicado en el No. de Acceso de GenBank NM_000073. El CD3 delta humano está indicado en el No. de Acceso de GenBank NM_000732.

El CD3 épsilon "negativo para FN-18" de *Macaca fascicularis* (es decir, CD3 épsilon no reconocido por el anticuerpo monoclonal FN-18 debido a un polimorfismo como se ha mostrado anteriormente) está indicado en el No. de Acceso de GenBank AB073994.

El CD3 épsilon "positivo para FN-18" de *Macaca fascicularis* (es decir, CD3 épsilon reconocido por el anticuerpo monoclonal FN-18) está indicado en el No. de Acceso de GenBank AB073993. El CD3 gamma de *Macaca fascicularis* está indicado en el No. de Acceso de GenBank AB073992. El CD3 delta de *Macaca fascicularis* está indicado en el No. de Acceso de GenBank AB073991.

Las secuencias de ácido nucleico y las secuencias de aminoácidos de los homólogos respectivos de CD3 épsilon, gamma y delta de *Macaca mulatta* pueden identificarse y aislarse por técnicas recombinantes descritas en la técnica (Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3ª edición 2001). Esto se aplica mutatis mutandis a los homólogos de CD3 épsilon, gamma y delta de otros primates distintos del chimpancé, como se define en la presente memoria. La identificación de la secuencia de aminoácidos de *Callithrix jacchus*, *Saimiri sciureus* y *Saguinus oedipus* se describe en los ejemplos adjuntos. La secuencia de aminoácidos del dominio extracelular del CD3 épsilon de *Callithrix jacchus* se representa en la SEQ ID NO: 3, la de *Saguinus oedipus* se representa en la SEQ ID NO: 5 y la de *Saimiri sciureus* se representa en la SEQ ID NO: 7.

En línea con lo anterior, el término "epítipo" define un determinante antigénico, al que se une/identifica específicamente una molécula de unión como se ha definido anteriormente. El dominio o moléculas de unión pueden unirse a/interaccionar específicamente con epítopos conformacionales o continuos, que son únicos para la estructura diana, p. ej., la cadena CD3 épsilon humana y de primate distinto del chimpancé. Un epítipo conformacional o discontinuo se caracteriza, para los antígenos polipeptídicos, por la presencia de dos o más residuos de aminoácidos discretos que están separados en la secuencia primaria, pero que se juntan en la superficie de la molécula cuando el polipéptido se pliega en la proteína/antígeno nativo (Sela, (1969) Science 166, 1365 y Laver, (1990) Cell 61, 553-6). Los dos o más residuos de aminoácidos discretos que contribuyen al epítipo están presentes en secciones separadas de una o más cadenas de polipéptido. Estos residuos se juntan en la superficie de la molécula cuando la o las cadenas de polipéptido se pliegan en una estructura tridimensional para constituir el epítipo. Por el contrario, un epítipo continuo o lineal consiste en dos o más residuos de aminoácidos discretos, que están presentes en un único segmento lineal de una cadena de polipéptido. En la presente invención, un epítipo de CD3 "dependiente de contexto" se refiere a la conformación de dicho epítipo. Dicho epítipo dependiente de contexto, localizado en la cadena épsilon de CD3, sólo puede desarrollar su conformación correcta si está incluido en el resto de la cadena épsilon y se mantiene en la posición correcta por la heterodimerización de la cadena épsilon bien con la cadena gamma o delta de CD3. Por el contrario, un epítipo de CD3 independiente de contexto como se proporciona en la presente memoria se refiere a un polipéptido N-terminal de 1-27 residuos de aminoácidos o un fragmento funcional del mismo de CD3 épsilon. Este polipéptido N-terminal de 1-27 residuos de aminoácidos o un fragmento funcional del mismo mantiene su integridad de estructura tridimensional y conformación correcta cuando se saca de su entorno nativo en el complejo CD3. La independencia de contexto del polipéptido N-terminal de 1-27 residuos de aminoácidos o un fragmento funcional del mismo, que es parte del dominio extracelular de CD3 épsilon, representa, así, un epítipo que es completamente diferente de los epítopos de CD3 épsilon descritos en conexión con un método para la preparación de moléculas de unión humanas en WO 2004/106380. Dicho método usó solamente CD3 épsilon expresado recombinante. La conformación de este CD3 épsilon solamente expresado recombinante se diferenció de la adoptada en su forma natural, esto es, la forma en la que existe la subunidad épsilon de CD3 del complejo TCR/CD3 como parte de un complejo no covalente bien con la subunidad CD3 delta o CD3-gamma del complejo TCR/CD3. Cuando dicha proteína de CD3 épsilon solamente expresado recombinante se usa como un antígeno para la selección de anticuerpos a partir de una biblioteca de anticuerpos, los anticuerpos específicos para este antígeno se identifican a partir de la biblioteca,

aunque dicha biblioteca no contiene anticuerpos con especificidad para antígenos propios/autoantígenos. Esto se debe al hecho de que la proteína de CD3 épsilon solamente expresado recombinante no existe in vivo; no es un autoantígeno. Consecuentemente, las subpoblaciones de células B que expresan anticuerpos específicos para esta proteína no se han deplecionado in vivo; una biblioteca de anticuerpos construida a partir de dichas células B contendría material genético para anticuerpos específicos para la proteína de CD3 épsilon solamente expresado recombinante.

Sin embargo, como el polipéptido N-terminal de 1-27 residuos de aminoácidos independiente de contexto o un fragmento funcional del mismo es un epítipo, que se pliega en su forma nativa, los dominios de unión en línea con la presente invención no pueden identificarse por métodos basados en la estrategia descrita en WO 04/106380. Por lo tanto, podría verificarse en ensayos que las moléculas de unión como se describe en WO 2004/106380 no son capaces de unirse a los residuos de aminoácidos 1-27 N-terminales de la cadena CD3 épsilon. Por lo tanto, las moléculas de unión anti-CD3 o moléculas de anticuerpo anti-CD3 convencionales (p. ej., como se describe en WO 99/54440) se unen a la cadena CD3 épsilon en una posición que está localizada más cerca del extremo C que el polipéptido N-terminal de 1-27 residuos de aminoácidos independiente de contexto o un fragmento funcional proporcionado en la presente memoria. Las moléculas de anticuerpo OKT3 y UCHT-1 de la técnica anterior también tienen una especificidad para la subunidad épsilon del complejo TCR/CD3 entre los residuos de aminoácidos 35 a 85 y, de acuerdo con esto, el epítipo de estos anticuerpos también está localizado más cerca del extremo C. Además, UCHT-1 se une a la cadena CD3 épsilon en una región entre los residuos de aminoácidos 43 a 77 (Tunnacliffe, Int. Immunol. 1 (1989), 546-50; Kjer-Nielsen, PNAS 101, (2004), 7675-7680; Salmeron, J. Immunol. 147 (1991), 3047-52). Por lo tanto, las moléculas anti-CD3 de la técnica anterior no se unen a y no están dirigidas frente al epítipo de los residuos de aminoácidos 1-27 N-terminales independiente de contexto definido en la presente memoria (o un fragmento funcional del mismo).

Para la generación de un dominio de unión, preferiblemente humano, comprendido en un polipéptido de la invención, p. ej., en un anticuerpo de cadena única biespecífico como se define en la presente memoria, pueden usarse p. ej., anticuerpos monoclonales que se unen a CD3 épsilon tanto humano como de primate distinto del chimpancé (p. ej., CD3 épsilon de macaco).

En una realización preferida del polipéptido de la invención, el primate distinto del chimpancé es un mono del viejo mundo. En una realización más preferida del polipéptido, el mono del viejo mundo es un mono del género Papio género Macaco. Lo más preferiblemente, el mono del género Macaco es macaco de Assam (*Macaca assamensis*), macaco Barbary (*Macaca sylvanus*), macaco Coronado (*Macaca radiata*), macaco con Botas o con Botas de Sulawesi (*Macaca ochreata*), macaco con cresta de Sulawesi (*Macaca nigra*), macaco de la roca de Formosán (*Macaca cyclopsis*), macaco de las nieves japonés o macaco japonés (*Macaca fuscata*), mono Cynomologus o macaco cangrejero o macaco de cola larga o macaco de Java (*Macaca fascicularis*), macaco de cola de león (*Macaca silenus*), macaco de cola de cerdo (*Macaca nemestrina*), macaco Rhesus (*Macaca mulatta*), macaco tibetano (*Macaca thibetana*), macaco de Tonkean (*Macaca tonkeana*), macaco de Toque (*Macaca sinica*), macaco con cola de muñón o macaco de cara roja o mono oso (*Macaca arctoides*), o macaco de Moor (*Macaca maurus*). Lo más preferiblemente, el mono del género Papio es *Hamadryas Baboon*, *Papio hamadryas*; Babuino de Guinea, *Papio papio*; Babuino Oliva, *Papio anubis*; Babuino Amarillo, *Papio cynocephalus*; Babuino Chacma, *Papio ursinus*.

En una realización alternativamente preferida del polipéptido de la invención, el primate distinto del chimpancé es un mono del nuevo mundo. En una realización más preferida del polipéptido, el mono del nuevo mundo es un mono del género Callithrix (titi), del género Saguinus o del género Saimiri. Lo más preferiblemente, el mono del género Callithrix es *Callithrix jacchus*, el mono del género Saguinus es *Saguinus oedipus* y el mono del género Saimiri es *Saimiri sciureus*.

Como se ha descrito en la presente memoria anteriormente, el polipéptido de la invención se une con el primer dominio de unión que es un anticuerpo a un epítipo de la cadena CD3 ϵ (épsilon) humana y de primate distinto del chimpancé, en donde el epítipo es parte de una secuencia de aminoácidos comprendida en el grupo que consiste en 27 residuos de aminoácidos como se representa en las SEQ ID NO. 2, 4, 6, u 8 o un fragmento funcional de la misma.

En línea con la presente invención, se prefiere para el polipéptido de la invención que dicho epítipo sea parte de una secuencia de aminoácidos que comprende 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6 o 5 aminoácidos.

Más preferiblemente, en donde dicho epítipo comprende al menos la secuencia de aminoácidos Gln-Asp-Gly-Asn-Glu (Q-D-G-N-E).

En la presente invención, un fragmento funcional de los residuos de aminoácidos 1-27 N-terminales significa que dicho fragmento funcional todavía es un epítipo independiente de contexto que mantiene su integridad estructural tridimensional cuando se saca de su entorno nativo en el complejo CD3 (y se fusiona con una secuencia de aminoácidos heteróloga tal como EpCAM o una parte Fc de una inmunoglobulina, p. ej., como se muestra en el Ejemplo 3.1). El mantenimiento de la estructura tridimensional en el polipéptido de 27 aminoácidos N-terminal o fragmento funcional del mismo de CD3 épsilon puede usarse para la generación de dominios de unión que se unen al fragmento del polipéptido de CD3 épsilon N-terminal *in vitro* y al complejo (subunidad CD3 épsilon del) CD3 nativo en

las células T *in vivo* con la misma afinidad de unión. En la presente invención, un fragmento funcional de los residuos de aminoácidos 1-27 N-terminales significa que las moléculas de unión a CD3 proporcionadas en la presente memoria todavía pueden unirse a dichos fragmentos funcionales de una manera independiente de contexto. El experto en la técnica es consciente de los métodos para el mapeo de epítomos para determinar qué residuos de aminoácidos de un epítomo son reconocidos por dichas moléculas de unión anti-CD3 (p. ej., escaneo de alanina).

El polipéptido de la invención comprende un (primer) dominio de unión como se define en la reivindicación 1 o 2 y un segundo dominio de unión capaz de unirse a un antígeno de la superficie celular que es CD33.

El término "antígeno de la superficie celular", tal y como se usa en la presente memoria, indica una molécula que está presentada en la superficie de una célula. En la mayor parte de los casos, esta molécula estará localizada en o sobre la membrana plasmática de la célula de manera que al menos parte de esta molécula permanece accesible desde el exterior de la célula en forma terciaria. Un ejemplo no limitativo de una molécula de la superficie celular que está localizada en la membrana plasmática es una proteína transmembrana que comprende, en su conformación terciaria, regiones de hidrofobicidad e hidrofobicidad. Aquí, al menos una región hidrofóbica permite que la molécula de la superficie celular esté incluida, o insertada, en la membrana plasmática hidrofóbica de la célula mientras las regiones hidrofílicas se extienden en ambos lados de la membrana plasmática en el citoplasma y el espacio extracelular, respectivamente. Los ejemplos no limitativos de moléculas de la superficie celular que están localizadas sobre la membrana plasmática son proteínas que se han modificado en un residuo de cisteína para portar un grupo palmitoilo, proteínas modificadas en un residuo de cisteína C-terminal para portar un grupo farnesilo o proteínas que se han modificado en el extremo C para portar un anclaje de glicosil fosfatidil inositol ("GPI"). Estos grupos permiten la unión covalente de proteínas a la superficie exterior de la membrana plasmática, donde permanecen accesibles para el reconocimiento por moléculas extracelulares tales como anticuerpos. Los ejemplos de antígenos de la superficie celular incluyen EGFR, EGFRvIII, MCSP, Anhidrasa carbónica IX (CAIX), CD30, CD33, Her2/neu, IgE, CD44v6 y Muc-1. La proteína de la superficie celular a la que es capaz de unirse el polipéptido de la invención es CD33. Adicionalmente, los ejemplos de anticuerpos de la superficie celular correspondientes comprenden antígenos que son característicos para una enfermedad o dolencia específica, es decir, cáncer, enfermedades autoinmunes o enfermedades infecciosas incluyendo infecciones virales. De acuerdo con esto, el término "antígenos de la superficie celular" incluye explícitamente proteínas virales tales como proteínas virales nativas, no procesadas expuestas en la superficie de células infectadas (descrito, entre otras, para las proteínas de la cubierta del virus de la hepatitis B, C y VIH-1).

Una función de defensa de las células T citotóxicas es la destrucción de células infectadas por virus, por lo tanto, la propiedad única de las moléculas de unión biespecíficas de la invención para activar y redirigir las células T citotóxicas independientemente de su especificidad autóctona tiene un gran impacto en el campo amplio de las infecciones virales crónicas. Para la mayoría de estas infecciones, la eliminación de células persistentemente infectadas es la única posibilidad de cura. Las terapias con células T adoptivas se están desarrollando actualmente frente a infecciones crónicas por CMV y EBV (Rooney, C.M., et al., Use of gene-modified virus-specific T lymphocytes to control Epstein-Barr-virus-related lymphoproliferation. *Lancet*, 1995. 345 (8941): p. 9-13; Walter, E.A., et al., Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. *N Engl J Med*, 1995. 333 (16): p. 1038-44).

La infección crónica de la hepatitis B es claramente una de las indicaciones más interesantes y provechosas. En todo el mundo, entre 350 y 400 millones de personas están infectadas con VHB. El tratamiento actual de la hepatitis crónica con VHB se basa en interferón gamma y análogos de nucleósido o nucleótido, una terapia a largo plazo con efectos secundarios considerables tales como inducción de brotes de hepatitis, fiebre, mialgias, trombocitopenia y depresión. Aunque ahora hay más de 4 regímenes terapéuticos aprobados, la eliminación del virus se consigue raramente. Una inflamación persistente en la hepatitis B crónica da lugar a cirrosis hepática y carcinoma hepatocelular en más del 25 % de los pacientes. Además, hasta el 40 % de los pacientes con hepatitis B crónica morirá por complicaciones graves, representando de 0,6 a 1,0 millón de muertes al año en todo el mundo.

VHB, el prototipo de los Hepadnavirus, es un virus con cubierta cuyo genoma circular relajado (rc) se transcribe de forma inversa en un pregenoma de ARN. Después de la infección, el ADN rc se importa en el núcleo de los hepatocitos donde se finaliza en un ADN circular cerrado covalentemente (ADNccc) que contiene cuatro marcos de lectura superpuestos. Sirve como un molde para la transcripción para el ARN pregenómico y tres ARN subgenómicos. El pregenoma de ARN funciona como ARNm para la traducción del núcleo viral y la proteína polimerasa. Las células infectadas producen continuamente proteína de superficie de VHB (HBsAg) a partir del ADNccc incluso cuando se para la replicación de VHB. HBsAg consiste en las proteínas pequeñas de superficie (S) con muy pocas partes de proteínas de superficie medias y grandes (L). Tanto S como L de VHB están dirigidas a la membrana del Retículo Endoplasmático (RE) de donde son transportadas en vesículas de membrana a través del orgánulo trans de golgi a la membrana plasmática (Gorelick, F.S. y C. Shugrue, *Exiting the endoplasmic reticulum*. *Mol Cell Endocrinol*, 2001. 177 (1-2): p. 13-8). Las proteínas S y L se expresan permanentemente en la superficie de los hepatocitos que replican VHB como se ha mostrado recientemente (Chu, C.M. e Y.F. Liaw, Membrane staining for hepatitis B surface antigen on hepatocytes: a sensitive and specific marker of active viral replication in hepatitis B. *J Clin Pathol*, 1995. 48(5): p. 470-3).

Los virus prototipo que exponen proteínas de la cubierta en la superficie celular son el virus de la Hepatitis B (VHB), virus de la Hepatitis C (VHC) y VIH-1 representando ambos una carga enorme de enfermedad globalmente. Para la indicación del virus VIH-1, se ha mostrado recientemente que las células T modificadas por un TCR quimérico con una construcción de anticuerpo Fv dirigida a la proteína de la cubierta gp120 puede matar a las células diana infectadas con VIH-1 (Masiero, S., et al., T-cell engineering by a chimeric T-cell receptor with antibody-type specificity for the HIV-1 gp120. *Gene Ther*, 2005. 12 (4): p. 299-310). De los virus hepadna, el virus de la hepatitis B (VHB) expresa el complejo proteico de la cubierta HBsAg que se produce continuamente a partir de ADNccc episomal incluso cuando disminuye la replicación de VHB.

La expresión como proteínas S y L de VHB intactas en la superficie celular las hace accesibles para anticuerpos que son el distintivo de la seroconversión cuando los pacientes se recuperan de la fase aguda de las infecciones y cambian de HBsAg circulantes a antiHB. Si la seroconversión no se produce, hasta el 30 % de los hepatocitos continúa expresando la proteína S de VHB también después de una terapia antiviral altamente activa de larga duración. Así, más allá del reconocimiento específico por los linfocitos T de los péptidos de VHB procesados intracelularmente y presentados por moléculas de MHC en la superficie celular, son posibles otras formas de compromiso de las células T dirigidas a la proteína de superficie intacta, tal como los antígenos S y L accesibles en el exterior de la membrana celular. Usando fragmentos de anticuerpo de cadena única que reconocen las proteínas de la cubierta pequeña (S) y grande (L) del virus de la hepatitis B, se han generado receptores de células T artificiales que permiten el direccionamiento de células T injertadas a hepatocitos infectados y, después del contacto con el antígeno, la activación de estas células T para secretar citocinas y matar a los hepatocitos infectados.

La limitación de esta estrategia es, (i) que es necesario manipular las células T in vitro, (ii) los retrovirus usados para transferir los receptores de las células T pueden causar mutagénesis insercional en las células T, y (iii) que una vez que las células T se han transferido, la respuesta citotóxica no puede limitarse.

Para superar estas limitaciones, pueden generarse moléculas de anticuerpo de cadena única biespecíficas que comprenden un primer dominio con una especificidad de unión para el antígeno CD3 épsilon humano y de primate distinto del chimpancé (como se proporciona en la presente memoria en el contexto de esta invención), así como un segundo dominio con una especificidad de unión para las proteínas de cubierta de VHB o VHC de hepatocitos infectados.

En la presente invención se prefiere además que el segundo dominio de unión se una a un antígeno de la superficie celular de un ser humano y/o un primate distinto del chimpancé que es CD33.

Para la generación del segundo dominio de unión del polipéptido de la invención, p. ej., anticuerpos de cadena única biespecíficos como se define en la presente memoria, pueden utilizarse anticuerpos monoclonales que se unen a ambos de los antígenos de la superficie celular respectivos humano y/o de primate distinto del chimpancé. Los dominios de unión apropiados para el polipéptido biespecífico como se define en la presente memoria p. ej., pueden derivar de anticuerpos monoclonales específicos entre especies por métodos recombinantes descritos en la técnica. Un anticuerpo monoclonal que se une a un antígeno de la superficie celular humano y al homólogo de dicho antígeno de la superficie celular en un primate distinto del chimpancé puede ensayarse por ensayos FACS como se ha mostrado anteriormente. Es evidente para los expertos en la técnica que los anticuerpos específicos entre especies también pueden generarse por técnicas de hibridoma descritas en la bibliografía (Milstein y Köhler, *Nature* 256 (1975), 495-7). Por ejemplo, alternativamente, pueden inmunizarse ratones con CD33 humano y de primate distinto del chimpancé. A partir de estos ratones, se aíslan células de hibridoma que producen anticuerpos específicos entre especies mediante la tecnología del hibridoma y se analizan por FACS como se ha mostrado anteriormente. La generación y análisis de los polipéptidos biespecíficos tales como anticuerpos de cadena única biespecíficos que presentan especificidad entre especies como se describe en la presente memoria se muestra en los siguientes ejemplos. Las ventajas de los anticuerpos de cadena única biespecíficos que presentan especificidad entre especies incluyen los puntos enumerados a continuación.

El polipéptido de la invención comprende como su primer dominio de unión una región VL que comprende CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 seleccionado de CDR-L1 como se representa en SEQ ID NO. 153, CDR-L2 como se representa en SEQ ID NO. 154 y CDR-L3 como se representa en SEQ ID NO. 155 y una región VH que comprende CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 seleccionado de CDR-H1 como se representa en SEQ ID NO. 174, CDR-H2 como se representa en SEQ ID NO. 175 y CDR-H3 como se representa en SEQ ID NO. 176.

En la técnica se entiende que las regiones variables, es decir, la cadena ligera variable ("L" o "VL") y la cadena pesada variable ("H" o "VH") proporcionan el dominio de unión de un anticuerpo. Estas regiones variables albergan las regiones determinantes de la complementariedad.

El término "región determinante de la complementariedad" (CDR) es muy conocido en la técnica para dictar la especificidad de antígeno de un anticuerpo. El término "CDR-L" o "L CDR" se refiere a CDR en la VL, mientras el término "CDR-H" o "H CDR" se refiere a las CDR en la VH.

Se prefiere además que el dominio de unión capaz de unirse a un epítipo de la cadena CD3ε humana y de primate distinto del chimpancé comprenda una región VL seleccionada del grupo que consiste en una región VL como se representa en SEQ ID NO. 161 o 165.

5 Alternativamente, se prefiere que el primer dominio de unión capaz de unirse a un epítipo de la cadena CD3ε humana y de primate distinto del chimpancé comprenda una región VH seleccionada del grupo que consiste en una región VH como se representa en SEQ ID NO. 177 o 181.

10 Más preferiblemente, el polipéptido de la invención se caracteriza por el primer dominio de unión capaz de unirse a un epítipo de la cadena CD3ε humana y de primate distinto del chimpancé, que comprende una región VL y una región VH seleccionadas del grupo que consiste en una región VL como se representa en SEQ ID NO. 179 o 183 y una región VH como se representa en SEQ ID NO. 177 o 181.

Según una realización preferida del polipéptido de la invención, las parejas de regiones VH y regiones VL están en el formato de un anticuerpo de cadena única (scFv). Las regiones VH y VL están organizadas en el orden VH-VL o VL-VH. Se prefiere que la región VH esté posicionado N-terminal respecto a una secuencia conectora. La región VL está posicionada C-terminal respecto a la secuencia conectora.

15 Una realización preferida del polipéptido de la invención descrito anteriormente se caracteriza porque el primer dominio de unión es capaz de unirse a un epítipo de la cadena CD3ε humana y de primate distinto del chimpancé que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 185 o 187.

La invención se refiere además a un polipéptido descrito anteriormente, en donde el segundo dominio de unión se une a un antígeno de la superficie celular que es CD33.

20 El término "antígeno tumoral", tal y como se usa en la presente memoria, puede entenderse como aquellos antígenos que se presentan en las células tumorales. Estos antígenos pueden presentarse en la superficie celular con una parte extracelular, que frecuentemente está combinada con una parte de la molécula transmembrana y citoplasmática. Estos antígenos pueden presentarse algunas veces sólo por células tumorales y nunca por las normales. Los antígenos tumorales pueden expresarse exclusivamente en células tumorales o podrían representar una mutación específica del tumor comparado con las células normales. En este caso, se denominan antígenos específicos de tumor. Son más comunes los antígenos que son presentados por las células tumorales y las células normales, y se denominan antígenos asociados a tumor. Estos antígenos asociados a tumor pueden estar sobreexpresados comparado con las células normales o ser accesibles para la unión por anticuerpos en las células tumorales debido a la estructura menos compacta del tejido tumoral comparado con el tejido normal. Los ejemplos no limitativos de antígenos tumorales tal y como se usa en la presente memoria son EGFR (Liu, Br. J. Cancer 82/12 (2000), 1991-1999; Bonner, Semin. Radiat. Oncol. 12 (2002), 11-20; Kiyota, Oncology 63/1 (2002), 92-98; Kuan, Brain Tumor Pathol. 17/2 (2000), 71-78), EGFRvIII (Kuan, Brain Tumor Pathol. 17/2 (2000), 71-78), Carboanhidrasa IX (MN/CA IX) (Uemura, Br. J. Cancer 81/4 (1999), 741-746; Longcaster, Cancer Res. 61/17 (2001), 6394-6399; Chia, J. Clin. Oncol. 19/16 (2001), 3660-3668; Beasley, Cancer Res. 61/13 (2001), 5262-5267), CD33 (Abutalib, Curr Pharm Biotechnol. 7 (2006), 343-69), MCSP (Campoli, Crit Rev Immunol. 24 (2004), 267-96), o IgE (Infuhr, Allergy 60 (2005), 977-85).

El antígeno tumoral en el contexto de la invención es CD33.

En una realización preferida de la invención, el polipéptido es una molécula de anticuerpo de cadena única biespecífica.

40 Los problemas descritos anteriormente en la presente memoria con respecto al desarrollo de moléculas subrogadas para los estudios preclínicos se agravan adicionalmente si el candidato a fármaco es un anticuerpo biespecífico, p. ej., un anticuerpo de cadena única biespecífico. Dicho anticuerpo biespecífico requiere que ambos antígenos reconocidos sean específicos entre especies con una especie animal dada para permitir el ensayo de seguridad en dicho animal.

45 Como también se ha indicado anteriormente en la presente memoria, la presente invención proporciona polipéptidos que comprenden un primer dominio de unión capaz de unirse a un epítipo de la cadena CD3ε humana y de primate distinto del chimpancé y un segundo dominio de unión capaz de unirse a un antígeno de la superficie celular que es CD33, en donde el segundo dominio de unión también se une preferiblemente a un antígeno de la superficie celular de un ser humano y un primate distinto del chimpancé. La ventaja de las moléculas de anticuerpo de cadena única biespecíficas como candidatos a fármacos que cumplen con los requerimientos del polipéptido preferido de la invención es el uso de dichas moléculas en el ensayo preclínico en animales, así como en los estudios clínicos e incluso para la terapia en el ser humano. En una realización preferida de los anticuerpos de cadena única biespecíficos específicos entre especies de la invención, el segundo dominio de unión que se une a un antígeno de la superficie celular es de origen humano. En una molécula biespecífica específica entre especies según la invención, el dominio de unión que se une a un epítipo de la cadena CD3 εpsilon humana y de primate distinto del chimpancé está localizado en el orden VH-VL o VL-VH en el extremo N o extremo C de la molécula biespecífica. Los ejemplos para moléculas biespecíficas específicas entre especies según la invención en diferentes organizaciones de la cadena VH y VL en el primer y el segundo dominio de unión se describen en los ejemplos adjuntos.

Tal y como se usa en la presente memoria, un "anticuerpo de cadena única biespecífico" indica una única cadena de polipéptido que comprende dos dominios de unión. Cada dominio de unión comprende una región variable de una cadena pesada de anticuerpo ("región VH"), en donde la región VH del primer dominio de unión se une específicamente a la molécula de CD3ε, y la región VH del segundo dominio de unión se une específicamente a un antígeno de la superficie celular, como se define con más detalle más adelante. Los dos dominios de unión están conectados opcionalmente entre sí por un espaciador polipeptídico corto. Un ejemplo no limitativo de un espaciador polipeptídico es Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (G-G-G-G-S) y repeticiones del mismo. Cada dominio de unión puede comprender adicionalmente una región variable de una cadena ligera de anticuerpo ("región VL"), estando conectadas la región VH y región VL en cada uno del primer y segundo dominios de unión entre sí mediante un conector polipeptídico, por ejemplo, del tipo descrito y reivindicado en EP 623679 B1, pero en ningún caso lo suficientemente largo como para permitir que la región VH y la región VL del primer dominio de unión y la región VH y la región VL del segundo dominio de unión se emparejen entre sí de manera que, conjuntamente, son capaces de unirse específicamente a la primera y segunda moléculas respectivas.

Según una realización preferida de la invención, una molécula de anticuerpo de cadena única biespecífica caracterizada anteriormente comprende un grupo de las siguientes secuencias como CDR H1, CDR H2, CDR H3, CDR L1, CDR L2 y CDR L3 en el segundo dominio de unión seleccionado del grupo que consiste en:

SEQ ID NOs: 382-384 y 387-389, SEQ ID NOs: 400-402 y 405-407, SEQ ID NOs: 418-420 y 423-425, SEQ ID NOs: 436-438 y 441-443, SEQ ID NOs: 454-456 y 459-461, SEQ ID NOs: 472-474 y 477-479, SEQ ID NOs: 490-492 y 495-497, SEQ ID NOs: y 508-510 y 513-515.

Una realización particularmente preferida de la invención se refiere al polipéptido caracterizado anteriormente, en donde la molécula de anticuerpo de cadena única biespecífica comprende una secuencia seleccionada de una secuencia de aminoácidos como se representa en cualquiera de SEQ ID NOs. 393, 395, 397, 411, 413, 415, 429, 431, 433, 447, 449, 451, 465, 467, 469, 483, 485, 487, 501, 503, 505, 519, 521 o 523; y

una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácido nucleico como se representa en cualquiera de SEQ ID NOs. 394, 396, 398, 412, 414, 416, 430, 432, 434, 448, 450, 452, 466, 468, 470, 484, 486, 488, 502, 504, 506, 520, 522 o 524.

En una realización preferida de la invención, los anticuerpos de cadena única biespecíficos son específicos entre especies para CD3 épsilon y para el antígeno de la superficie celular que es CD33 reconocido por su segundo dominio de unión. En una realización más preferida, estos anticuerpos de cadena única biespecíficos son específicos entre especies para CD3 épsilon humano y de primate distinto del chimpancé y para CD33 humano y de primate distinto del chimpancé. En una realización alternativa, la presente invención proporciona una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención descrito anteriormente.

La presente invención también se refiere a un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de la presente invención.

Los expertos en biología molecular conocen muchos vectores adecuados, cuya elección dependerá de la función deseada e incluyen plásmidos, cósmidos, virus, bacteriófagos y otros vectores usados convencionalmente en la ingeniería genética. Pueden usarse métodos que son muy conocidos para los expertos en la técnica para construir varios plásmidos y vectores; véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook et al. (loc cit.) y Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates y Wiley Interscience, N.Y. (1989), (1994). Alternativamente, los polinucleótidos y vectores de la invención pueden reconstituirse en liposomas para la administración a las células diana. Como se discute con más detalle más adelante, se usó un vector de clonación para aislar secuencias individuales de ADN. Las secuencias relevantes pueden transferirse en vectores de expresión en los que se requiere la expresión de un polipéptido particular. Los vectores de clonación típicos incluyen pBluescript SK, pGEM, pUC9, pBR322 y pGBT9. Los vectores de expresión típicos incluyen pTRE, pCAL-n-EK, pESP-1, pOP13CAT.

Preferiblemente, dicho vector comprende una secuencia de ácido nucleico que es una secuencia reguladora unida de forma operativa a dicha secuencia de ácido nucleico definida en la presente memoria.

El término "secuencia reguladora" se refiere secuencias de ADN, que son necesarias para efectuar la expresión de las secuencias codificadoras a las que están ligadas. La naturaleza de dichas secuencias de control difiere dependiendo del organismo huésped. En procariontes, las secuencias de control incluyen generalmente promotor, sitio de unión a ribosomas, y terminadores. En eucariotes, generalmente, las secuencias de control incluyen promotores, terminadores y, en algunos casos, potenciadores, transactivadores o factores de transcripción. El término "secuencia de control" se pretende que incluya, como mínimo, todos los componentes cuya presencia es necesaria para la expresión, y también pueden incluir componentes ventajosos adicionales.

El término "unido de forma operativa" se refiere a una yuxtaposición en donde los componentes así descritos están en una relación que les permite funcionar de su manera pretendida. Una secuencia de control "unida de forma operativa" a una secuencia codificadora está ligada en una manera tal que la expresión de la secuencia codificadora

se consigue bajo condiciones compatibles con las secuencias de control. En el caso de que la secuencia de control sea un promotor, es obvio para un experto en la técnica que se usa preferiblemente ácido nucleico bicatenario.

Así, el vector recitado es preferiblemente un vector de expresión. Un "vector de expresión" es una construcción que puede usarse para transformar un huésped seleccionado y proporciona la expresión de una secuencia codificadora en el huésped seleccionado. Los vectores de expresión pueden ser, por ejemplo, vectores de clonación, vectores binarios o vectores de integración. La expresión comprende la transcripción de la molécula de ácido nucleico preferiblemente en un ARNm que se puede traducir. Los elementos reguladores que aseguran la expresión en células procariotas y/o eucariotas son muy conocidos para los expertos en la técnica. En el caso de las células eucariotas, comprenden normalmente promotores que aseguran el inicio de la transcripción y opcionalmente señales poli-A que aseguran la terminación de la transcripción y la estabilización del transcrito. Los elementos reguladores posibles que permiten la expresión en células huésped procariotas comprenden, p. ej., el promotor P_L, *lac*, *trp* o *tac* en *E. coli*, y los ejemplos de elementos reguladores que permiten la expresión en células huésped eucariotas son el promotor AOX1 o GAL1 en levaduras o el promotor de CMV, SV40, RSV (virus del sarcoma de Rous), potenciador de CMV, potenciador de SV40 o un intrón de globina en células de mamíferos y otros animales.

Los elementos adicionales, que son responsables del inicio de la transcripción tales como elementos reguladores, también pueden comprender señales de terminación de la transcripción, tales como el sitio poli-A de SV40 o el sitio poli-A de tk, en 3' del polinucleótido. Además, dependiendo del sistema de expresión usado, pueden añadirse secuencias líder a la secuencia codificadora de la secuencia de ácido nucleico recitada capaces de dirigir el polipéptido a un compartimento celular o secretarlo en el medio y son muy conocidas en la técnica; véanse también los Ejemplos adjuntos. La o las secuencias líder están ensambladas en una fase apropiada con las secuencias de traducción, inicio y terminación, y preferiblemente, una secuencia líder capaz de dirigir la secreción de la proteína traducida, o una parte de la misma, en el espacio periplásmico o medio extracelular. Opcionalmente, la secuencia heteróloga puede codificar una proteína de fusión incluyendo un péptido de identificación N-terminal que confiere características deseadas, p. ej., estabilización o purificación simplificada del producto recombinante expresado; véase supra. En este contexto, los vectores de expresión adecuados son conocidos en la técnica, tales como el vector de expresión de ADNc Okayama-Berg pcDV1 (Pharmacia), pCDM8, pRc/CMV, pcDNA1, pcDNA3 (In-vitro gene), pEF-DHFR, pEF-ADA o pEF-neo (Mack et al. PNAS (1995) 92, 7021-7025 y Raum et al. Cancer Immunol Immunother (2001) 50(3), 141-150) o pSPORT1 (GIBCO BRL).

Preferiblemente, las secuencias de control de la expresión serán sistemas de promotor eucariota en vectores capaces de transformar células huésped eucariotas, pero también pueden usarse secuencias de control para huéspedes procariotas. Una vez el vector se ha incorporado en el huésped apropiado, el huésped se mantiene bajo condiciones adecuadas para un alto nivel de expresión de las secuencias de nucleótidos, y según se desee, puede seguir la recogida y purificación del polipéptido de la invención; véanse, p. ej., los ejemplos adjuntos.

Un sistema de expresión alternativo, que puede usarse para expresar una proteína que interacciona con el ciclo celular es un sistema de insectos. En uno de dichos sistemas, se usa el virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) como un vector para expresar genes extraños en células de *Spodoptera frugiperda* o en larvas de *Trichoplusia*. La secuencia codificadora de una molécula de ácido nucleico recitada puede clonarse en una región no esencial del virus, tal como el gen de la polihedrina, y ponerse bajo el control del promotor de la polihedrina. La inserción exitosa de dicha secuencia codificadora convertirá al gen de la polihedrina en inactivo y producirá virus recombinantes que carecen de la cubierta proteica. Los virus recombinantes se usan entonces para infectar células de *S. frugiperda* o larvas de *Trichoplusia* en las que se expresa la proteína de la invención (Smith, J. Virol. 46 (1983), 584; Engelhard, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 91 (1994), 3224-3227).

Los elementos reguladores adicionales pueden incluir potenciadores de la transcripción, así como de la traducción. Ventajosamente, los vectores de la invención descritos anteriormente comprenden un marcador seleccionable y/o puntuable.

Los genes de marcadores seleccionables útiles para la selección de células transformadas y, p. ej., tejido de plantas y plantas son muy conocidos para los expertos en la técnica y comprenden, por ejemplo, resistencia a antimetabolitos como la base de la selección para dhfr, que confieren resistencia a metotrexato (Reiss, Plant Physiol. (Life Sci. Adv.) 13 (1994), 143-149); npt, que confiere resistencia a los aminoglicósidos neomicina, kanamicina y paromicina (Herrera-Estrella, EMBO J. 2 (1983), 987-995) e hyg, que confiere resistencia a higromicina (Marsh, Gene 32 (1984), 481-485). Se han descrito genes seleccionables adicionales, concretamente trpB, que permite a las células utilizar indol en lugar de triptófano; hisD, que permite a las células utilizar histinol en lugar de histidina (Hartman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988), 8047); manosa-6-fosfato isomerasa que permite a las células utilizar manosa (WO 94/20627) y ODC (ornitina descarboxilasa) que confiere resistencia al inhibidor de la ornitina descarboxilasa, 2-(difluorometil)-DL-ornitina, DFMO (McConlogue, 1987, En: Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory ed.) o desaminasa de *Aspergillus terreus* que confiere resistencia a Blastidina S (Tamura, Biosci. Biotechnol. Biochem. 59 (1995), 2336-2338).

Los marcadores puntuables útiles también son conocidos para los expertos en la técnica y están disponibles comercialmente. Ventajosamente, dicho marcador es un gen que codifica luciferasa (Giacomin, Pl. Sci. 116 (1996), 59-72; Scikantha, J. Bact. 178 (1996), 121), proteína verde fluorescente (Gerdes, FEBS Lett. 389 (1996), 44-47) o β -

glucuronidasa (Jefferson, EMBO J. 6 (1987), 3901-3907). Esta realización es particularmente útil para un cribado simple y rápido de células, tejidos y organismos que contienen un vector recitado.

Como se ha descrito anteriormente, la molécula de ácido nucleico recitada puede usarse sola o como parte de un vector para expresar el polipéptido de la invención en células, para, p. ej., la purificación, pero también para propósitos de terapia génica. Las moléculas de ácido nucleico o vectores que contienen la o las secuencias de ADN que codifican uno cualquiera de los polipéptidos de la invención descritos anteriormente, se introducen en las células que, a su vez, producen el polipéptido de interés. La terapia génica, que se basa en introducir genes terapéuticos en células por técnicas ex-vivo o in-vivo es una de las aplicaciones más importantes de la transferencia génica. Los vectores, métodos o sistemas de administración génica adecuados para la terapia génica in-vitro o in-vivo se describen en la bibliografía y son conocidos para el experto en la técnica; véase, p. ej., Giordano, Nature Medicine 2 (1996), 534-539; Schaper, Circ. Res. 79 (1996), 911-919; Anderson, Science 256 (1992), 808-813; Verma, Nature 389 (1994), 239; Isner, Lancet 348 (1996), 370-374; Muhlhauser, Circ. Res. 77 (1995), 1077-1086; Onodera, Blood 91 (1998), 30-36; Verma, Gene Ther. 5 (1998), 692-699; Nabel, Ann. N.Y. Acad. Sci. 811 (1997), 289-292; Verzeletti, Hum. Gene Ther. 9 (1998), 2243-51; Wang, Nature Medicine 2 (1996), 714-716; WO 94/29469; WO 97/00957, US 5.580.859; US 5.589.466; o Schaper, Current Opinion in Biotechnology 7 (1996), 635-640. Las moléculas y vectores de ácido nucleico recitadas pueden diseñarse para la introducción directa o para la introducción mediante liposomas, o vectores virales (p. ej., adenovirales, retrovirales) en la célula. Preferiblemente, dicha célula es una célula de la línea germinal, célula embrionaria, o célula de huevo o derivada de las mismas, lo más preferiblemente dicha célula es una célula madre. Un ejemplo de una célula madre embrionaria puede ser, entre otras, una célula madre como se describe en Nagy, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993), 8424-8428.

La invención también proporciona una célula huésped transformada o transfectada con un vector de la invención. Dicha célula huésped puede producirse mediante la introducción del vector de la invención descrito anteriormente o de la molécula de ácido nucleico de la invención descrita anteriormente en una célula huésped. La presencia de al menos un vector o al menos una molécula de ácido nucleico en la célula huésped puede mediar la expresión de un gen que codifica las construcciones de anticuerpo de cadena única descritas anteriormente.

La molécula de ácido nucleico o vector de la invención descritos, que se introducen en la célula huésped, pueden bien integrarse en el genoma de la célula huésped o pueden mantenerse extracromosómicamente.

El huésped puede ser cualquier célula procariota o eucariota.

El término "procariota" se pretende que incluya todas las bacterias, que pueden transformarse o transfectarse con moléculas de ADN o ARN para la expresión de una proteína de la invención. Las células huésped procariotas pueden incluir bacterias gram negativas, así como gram positivas tales como, por ejemplo, E. coli, S. typhimurium, Serratia marcescens y Bacillus subtilis. El término "eucariota" se pretende que incluya células de levaduras, plantas superiores, insectos y preferiblemente de mamíferos. Dependiendo de la célula huésped empleada en un procedimiento de producción recombinante, la proteína codificada por el polinucleótido de la presente invención puede estar glicosilada o puede no estar glicosilada. Se prefiere especialmente el uso de un plásmido o un virus que contiene la secuencia codificadora del polipéptido de la invención y fusionada genéticamente al mismo una etiqueta FLAG N-terminal y/o una etiqueta His C-terminal. Preferiblemente, la longitud de dicha etiqueta FLAG es aproximadamente 4 a 8 aminoácidos, lo más preferiblemente 8 aminoácidos. Un polinucleótido descrito anteriormente puede usarse para transformar o transfectar la célula huésped usando cualquiera de las técnicas conocidas comúnmente para los expertos en la técnica. Además, los métodos para preparar genes fusionados, unidos de forma operativa y para expresarlos, p. ej., en células de mamíferos y bacterias son muy conocidos en la técnica (Sambrook, loc cit.).

Preferiblemente, la célula huésped es una bacteria o una célula de insecto, fúngica, de planta o animal.

Se prevé, particularmente, que la célula huésped recitada puede ser una célula de mamífero. Las células huésped particularmente preferidas comprenden células CHO, células COS, líneas celulares de mieloma como SP2/0 o NS/0. Como se ilustra en los ejemplos adjuntos, se prefieren particularmente las células CHO como huéspedes.

Más preferiblemente, dicha célula huésped es una célula humana o línea celular humana, p. ej., per.c6 (Kroos, Biotechnol. Prog., 2003, 19:163-168).

En una realización adicional, la presente invención se refiere así a un proceso para la producción de un polipéptido de la invención, comprendiendo dicho proceso cultivar una célula huésped de la invención bajo condiciones que permitan la expresión del polipéptido de la invención y la recuperación del polipéptido producido del cultivo.

Las células huésped transformadas pueden crecerse en fermentadores y cultivarse según técnicas conocidas en la técnica para conseguir un crecimiento celular óptimo. El polipéptido de la invención puede aislarse entonces del medio de crecimiento, lisados celulares o fracciones de membrana celular. El aislamiento y purificación, p. ej., de los polipéptidos de la invención expresados en microbios puede ser por cualquier medio convencional tal como, por ejemplo, separaciones cromatográficas preparativas y separaciones inmunológicas tales como aquellas que implican el uso de anticuerpos monoclonales o policlonales dirigidos, p. ej., frente a una etiqueta del polipéptido de la invención o como se describe en los ejemplos adjuntos.

Se sabe en la técnica que las condiciones para el cultivo de una célula huésped que permiten la expresión, dependen del sistema de huésped y del sistema/vector de expresión usado en dicho proceso. Los parámetros que se pueden modificar con el fin de conseguir condiciones que permitan la expresión de un polipéptido recombinante con conocidos en la técnica. Así, el experto en la técnica puede determinar las condiciones adecuadas en ausencia de un input inventivo adicional.

Una vez expresado, el polipéptido de la invención puede purificarse según procedimientos estándar de la técnica, incluyendo precipitación con sulfato de amonio, columnas de afinidad, cromatografía en columna, electroforesis en gel y semejantes; véase, Scopes, "Protein Purificación", Springer-Verlag, N.Y. (1982). Se prefieren los polipéptidos sustancialmente puros con una homogeneidad de al menos aproximadamente el 90 al 95 %, y son los más preferidos los que tienen una homogeneidad del 98 al 99 % o más, para usos farmacéuticos. Una vez purificado, parcialmente o a homogeneidad según se desee, el polipéptido de la invención puede usarse entonces terapéuticamente (incluyendo extracorpóreamente) o en el desarrollo y realización de procedimientos de ensayo. Además, los ejemplos de métodos para la recuperación del polipéptido de la invención de un cultivo se describen con detalle en los ejemplos adjuntos.

Además, la invención proporciona una composición que comprende un polipéptido de la invención o un polipéptido según se produce por el proceso descrito anteriormente. Preferiblemente, dicha composición es una composición farmacéutica.

Según la invención, el término "composición farmacéutica" se refiere a una composición para la administración a un paciente, preferiblemente un paciente humano. La composición farmacéutica particular preferida de esta invención comprende moléculas de unión dirigidas frente a y generadas frente a epítopos de CD3 independientes de contexto. Preferiblemente, la composición farmacéutica comprende formulaciones adecuadas de vehículos, estabilizantes y/o excipientes. En una realización preferida, la composición farmacéutica comprende una composición para la administración parenteral, transdérmica, intraluminal, intraarterial, intratecal y/o intranasal o por inyección directa en el tejido. Se prevé, en particular, que dicha composición se administre a un paciente mediante infusión o inyección. La administración de las composiciones adecuadas puede efectuarse por diferentes vías, p. ej., por administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, tópica o intradérmica. En particular, la presente invención proporciona la composición adecuada para una administración ininterrumpida. Como un ejemplo no limitativo, la administración ininterrumpida, es decir, continua puede llevarse a cabo por un pequeño sistema de bomba que porta el paciente para medir el flujo de agente terapéutico en el cuerpo del paciente. La composición farmacéutica que comprende las moléculas de unión dirigidas frente a y generadas frente a epítopos de CD3 independientes de contexto de la invención puede administrarse usando dichos sistemas de bomba. Dichos sistemas de bomba son conocidos generalmente en la técnica y se basan comúnmente en el intercambio periódico de cartuchos que contienen el agente terapéutico que se va a infundir. Cuando se intercambia el cartucho en dicho sistema de bomba, puede producirse una interrupción temporal del flujo de otra forma ininterrumpido del agente terapéutico en el cuerpo del paciente. En dicho caso, la fase de administración anterior al reemplazo del cartucho y la fase de administración posterior al reemplazo del cartucho se consideraría aun así dentro del significado de los medios y métodos farmacéuticos de la invención que conjuntamente forman una "administración ininterrumpida" de dicho agente terapéutico.

La administración continua o ininterrumpida de estas moléculas de unión dirigidas frente a y generadas frente a epítopos de CD3 independientes de contexto de esta invención puede ser intravenosa o subcutánea mediante un dispositivo de administración de fluido o sistema de bomba pequeño incluyendo un mecanismo de conducción de fluido fuera de un reservorio y un mecanismo accionador para accionar el mecanismo de conducción. Los sistemas de bomba para la administración subcutánea pueden incluir una aguja o una cánula para penetrar la piel de un paciente y administrar la composición adecuada en el cuerpo del paciente. Dichos sistemas de bomba pueden estar fijados o unidos directamente a la piel del paciente independientemente de una vena, arteria o vaso sanguíneo, permitiendo de esta manera un contacto directo entre el sistema de bomba y la piel del paciente. El sistema de bomba puede estar unido a la piel del paciente durante 24 horas hasta varios días. El sistema de bomba puede tener un tamaño pequeño con un reservorio para volúmenes pequeños. Como un ejemplo no limitativo, el volumen del reservorio para la composición farmacéutica adecuada que se va a administrar puede ser entre 0,1 y 50 ml.

La administración continua puede ser transdérmica mediante un parche que se porta en la piel y reemplazado a intervalos. Un experto en la técnica es consciente de sistemas de parches para la administración de fármacos adecuados para este propósito. Debe indicarse que la administración transdérmica es especialmente idónea para la administración ininterrumpida, ya que el intercambio de un primer parche gastado puede conseguirse ventajosamente simultáneamente con el posicionamiento de un segundo parche nuevo, por ejemplo, en la superficie de la piel inmediatamente adyacente al primer parche gastado e inmediatamente antes de la retirada del primer parche gastado. No surgen los problemas de la interrupción del flujo o fallo en la celda de potencia.

La composición de la presente invención, que comprende en particular moléculas de unión dirigidas frente a y generadas frente a epítopos de CD3 independientes de contexto, puede comprender además un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados son muy conocidos en la técnica e incluyen disoluciones, p. ej., disoluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones aceite/agua, varios tipos de agentes humectantes, disoluciones estériles, liposomas, etc. Las composiciones que comprenden dichos vehículos pueden formularse por métodos convencionales muy conocidos. Las formulaciones pueden comprender carbohidratos, disoluciones de tampón, aminoácidos y/o tensioactivos. Los carbohidratos pueden

ser azúcares no reductores, preferiblemente trehalosa, sacarosa, octasulfato, sorbitol o xilitol. Dichas formulaciones pueden usarse para administraciones continuas que pueden ser intravenosas o subcutáneas con y/o sin sistemas de bomba. Los aminoácidos pueden ser aminoácidos cargados, preferiblemente lisina, acetato de lisina, arginina, glutamato y/o histidina. Los tensioactivos pueden ser detergentes, preferiblemente con un peso molecular de >1,2 KD y/o un poliéter, preferiblemente con un peso molecular de >3 KD. Los ejemplos no limitativos de detergentes preferidos son Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80 o Tween 85. Los ejemplos no limitativos de poliéteres preferidos son PEG 3000, PEG 3350, PEG 4000 o PEG 5000. Los sistemas de tampón usados en la presente invención pueden tener un pH preferido de 5-9 y pueden comprender citrato, succinato, fosfato, histidina y acetato. Las composiciones de la presente invención pueden administrarse al sujeto a una dosis adecuada que puede determinarse, p. ej., por estudios de escalada de dosis por la administración de dosis crecientes del polipéptido de la invención que presenta especificidad entre especies descrito en la presente memoria a primates distintos de chimpancés, por ejemplo, macacos. Como se ha mostrado anteriormente, el polipéptido de la invención que presenta especificidad entre especies descrito en la presente memoria puede usarse ventajosamente en una forma idéntica en el ensayo preclínico en primates distintos de chimpancés y como fármaco en seres humanos. Estas composiciones también pueden administrarse en combinación con otros fármacos proteináceos y no proteináceos. Estos fármacos pueden administrarse simultáneamente con la composición que comprende el polipéptido de la invención como se define en la presente memoria o separadamente antes o después de la administración de dicho polipéptido en intervalos de tiempo y dosis definidos. El régimen de dosificación lo determinará el médico responsable y los factores clínicos. Como es muy conocido en las técnicas médicas, las dosificaciones para un paciente cualquiera dependerán de muchos factores, incluyendo el tamaño, área superficial corporal, edad del paciente, el compuesto particular que se va a administrar, sexo, tiempo y ruta de administración, salud general, y otros fármacos que se están administrando concurrentemente. Las preparaciones para la administración parenteral incluyen disoluciones, suspensiones y emulsiones estériles acuosas o no acuosas. Los ejemplos de disolventes no acuosos son propileno glicol, polietileno glicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen agua, disoluciones emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, incluyendo disolución salina y medios tamponados. Los vehículos parenterales incluyen disolución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, disolución de Ringer con lactato, o aceites fijados. Los vehículos intravenosos incluyen reponedores de fluidos y nutrientes, reponedores de electrolitos (tales como los basados en dextrosa de Ringer), y semejantes. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, gases inertes y semejantes. Además, la composición de la presente invención podría comprender vehículos proteináceos, como, p. ej., albúmina de suero o inmunoglobulina, preferiblemente de origen humano. Se prevé que la composición de la invención podría comprender, además del polipéptido de la invención definido en la presente memoria, agentes biológicamente activos adicionales, dependiendo del uso pretendido de la composición. Dichos agentes podrían ser fármacos que actúan en el sistema gastrointestinal, fármacos que actúan como citostáticos, fármacos que previenen la hiperuricemia, fármacos que inhiben inmunoreacciones (p. ej., corticosteroides), fármacos que modulan la respuesta inflamatoria, fármacos que actúan sobre el sistema circulatorio y/o agentes tales como citocinas conocidos en la técnica.

La actividad biológica de la composición farmacéutica definida en la presente memoria puede determinarse, por ejemplo, por ensayos de citotoxicidad, como se describe en los siguientes ejemplos, en WO 99/54440 o por Schlereth et al. (Cancer Immunol. Immunother. 20 (2005), 1 - 12). La "eficacia" o "eficacia *in vivo*", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a la respuesta a terapia por la composición farmacéutica de la invención, usando, p. ej., criterios de respuesta NCI estandarizados. El éxito o eficacia *in vivo* de la terapia usando una composición farmacéutica de la invención se refiere a la efectividad de la composición para su propósito pretendido, es decir, la capacidad de la composición de causar su efecto deseado, es decir, depleción de las células patológicas, p. ej., células tumorales. La eficacia *in vivo* puede monitorizarse por métodos estándar establecidos para las entidades de enfermedad respectivas incluyendo, pero no limitado a, recuentos de células sanguíneas blancas, diferenciales, Separación de Células Activada por Fluorescencia, aspiración de la médula ósea. Además, pueden usarse varios parámetros de química clínica específicos de la enfermedad y otros métodos estándar establecidos. Además, pueden usarse tomografía asistida por ordenador, rayos X, tomografía por resonancia magnética nuclear (p. ej., para la evaluación de la respuesta basada en los criterios del National Cancer Institute [Cheson BD, Horning SJ, Coiffier B, Shipp MA, Fisher RI, Connors JM, Lister TA, Vose J, Grillo-Lopez A, Hagenbeek A, Cabanillas F, Klippensten D, Hiddemann W, Castellino R, Harris NL, Armitage JO, Carter W, Hoppe R, Canellos GP. Report of an international workshop to standardize response criteria for non-Hodgkin's linfomas. NCI Sponsored International Working Group. J Clin Oncol. 1999 abr;17(4):1244]), escaneo por tomografía de emisión de positrón, recuentos de células sanguíneas blancas, diferenciales, Separación de Células Activada por Fluorescencia, aspiración de la médula ósea, biopsias/histologías de nódulos linfáticos, y varios parámetros de química clínica específicos de linfoma (p. ej., lactato deshidrogenasa) y otros métodos estándar establecidos.

Otro reto importante en el desarrollo de fármacos tales como la composición farmacéutica de la invención es la modulación predecible de las propiedades farmacocinéticas. Para este propósito, se establece un perfil farmacocinético del candidato a fármaco, es decir, un perfil de los parámetros farmacocinéticos que afectan la capacidad de un fármaco particular para tratar una afección dada. Los parámetros farmacocinéticos del fármaco que influyen en la capacidad de un fármaco para tratar una determinada entidad de enfermedad incluyen, pero no están limitados a: semivida, volumen de distribución, metabolismo hepático de primer paso y el grado de unión del suero

sanguíneo. La eficacia de un agente farmacéutico dado puede verse influida por cada uno de los parámetros mencionados anteriormente.

"Semivida" significa el tiempo en el que el 50 % de un fármaco administrado se elimina a través de procesos biológicos, p. ej., metabolismo, excreción, etc.

- 5 Por "metabolismo hepático de primer paso" se quiere decir la propensión de un fármaco de ser metabolizado después de un primer contacto con el hígado, es decir, durante su primer paso a través del hígado. "Volumen de distribución" significa el grado de retención de un fármaco a lo largo de varios compartimentos del cuerpo, como, p. ej., espacios intracelular y extracelular, tejidos y órganos, etc. y la distribución del fármaco dentro de estos compartimentos. "Grado de unión del suero sanguíneo" significa la propensión de un fármaco de interaccionar con y unirse a las proteínas del suero sanguíneo, tales como albúmina, lo que da lugar a una reducción o pérdida de la actividad biológica del fármaco.

10 Los parámetros farmacocinéticos también incluyen biodisponibilidad, tiempo de latencia (Tlag), Tmáx, velocidades de absorción, mayor inicio y/o C_{máx} para una cantidad dada de fármaco administrada. "Biodisponibilidad" significa la cantidad de un fármaco en el compartimento sanguíneo.

- 15 "Tiempo de latencia" significa el retraso de tiempo entre la administración del fármaco y su detección y mensurabilidad en la sangre o plasma.

- 20 "T_{máx}" es el tiempo después del cual se alcanza la máxima concentración en sangre del fármaco, y "C_{máx}" es la concentración en sangre máxima que se obtiene con un fármaco dado. El tiempo para alcanzar una concentración en sangre o tejido del fármaco que se requiere para su efecto biológico está influida por todos los parámetros. Los parámetros farmacocinéticos de los anticuerpos de cadena única biespecíficos, una realización preferida del polipéptido de la invención, que presentan especificidad entre especies, que pueden determinarse en estudios preclínicos en animales en primates distintos de chimpancés como se ha indicado anteriormente también se muestran, p. ej., en la publicación por Schlereth et al. (Cancer Immunol. Immunother. 20 (2005), 1 - 12).

- 25 El término "toxicidad", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a los efectos tóxicos de un fármaco manifestados en eventos adversos o eventos adversos graves. Estos eventos secundarios podrían referirse a la ausencia de tolerabilidad del fármaco en general y/o a una ausencia de tolerancia local después de la administración. La toxicidad también podría incluir efectos teratogénicos o carcinogénicos causados por el fármaco.

- 30 El término "seguridad", "seguridad in vivo" o "tolerabilidad", tal y como se usa en la presente memoria, define la administración de un fármaco sin inducir eventos adversos graves directamente después de la administración (tolerancia local) y durante un periodo más largo de aplicación del fármaco. La "seguridad", "seguridad in vivo" o "tolerabilidad" puede evaluarse, p. ej., a intervalos regulares durante el periodo de tratamiento y de seguimiento. Las mediciones incluyen evaluación clínica, p. ej., manifestaciones orgánicas y cribado de anomalías de laboratorio. Puede llevarse a cabo la evaluación clínica y registrarse/codificarse la desviación respecto a los valores normales según los estándares de NCI-CTC y/o MedDRA. Las manifestaciones orgánicas pueden incluir criterios tales como
- 35 alergias/inmunología, sangre/médula ósea, arritmia cardíaca, coagulación y semejantes, como se muestra, p. ej., en los Criterios de Terminología Común para eventos adversos v3.0 (CTCAE). Los parámetros de laboratorio que pueden ensayarse incluyen, por ejemplo, hematología, química clínica, perfil de coagulación y análisis de orina y examen de otros fluidos corporales tales como suero, plasma, fluido linfático o espinal, licor y semejantes. La seguridad puede evaluarse así, p. ej., por un examen físico, técnicas de imagen (es decir, ultrasonidos, rayos x, escaneos CT, Imagen por Resonancia Magnética (MRI), otras mediciones con dispositivos técnicos (es decir, electrocardiograma), signos vitales, mediante la medición de parámetros de laboratorio y registro de eventos adversos. Por ejemplo, los eventos adversos en primates distintos de chimpancés en los usos y métodos según la invención pueden examinarse por métodos histopatológicos y/o histoquímicos.

- 40 El término "dosis efectiva y no tóxica", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a una dosis tolerable del anticuerpo de cadena única biespecífico como se define en la presente memoria que es lo suficientemente alta como para causar la depleción de células patológicas, eliminación del tumor, encogimiento del tumor o estabilización de la enfermedad sin o esencialmente sin efectos tóxicos importantes. Dichas dosis efectivas y no tóxicas pueden determinarse, p. ej., por estudios de escalada de la dosis descritos en la técnica y deberían estar por debajo de la dosis que induce eventos secundarios adversos graves (toxicidad limitante de la dosis, DLT).

- 50 También se hace referencia a los términos anteriores, p. ej., en la Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals S6; ICH Harmonised Tripartite Guideline; reunión del ICH Steering Committee del 16 de julio, 1997.

- 55 Además, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de esta invención (es decir, un polipéptido que comprende al menos un dominio de unión que es un anticuerpo capaz de unirse a un epítipo de la cadena CD3 épsilon humana y de primate distinto del chimpancé, en donde el epítipo es parte de una secuencia de aminoácidos comprendida en el grupo que consiste en SEQ ID NOs. 2, 4, 6, u 8 según esta invención o producida según el proceso según la invención) y comprende además un segundo dominio de unión capaz de unirse a un antígeno de la superficie celular que es CD33 para la prevención, tratamiento o mejora de una enfermedad seleccionada de una enfermedad proliferativa. Preferiblemente, dicha composición farmacéutica comprende además formulaciones adecuadas de vehículos, estabilizantes y/o excipientes.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a un uso de un polipéptido de la invención para la preparación de una composición farmacéutica para la prevención, tratamiento o mejora de una enfermedad proliferativa.

En otra realización preferida del uso del polipéptido de la invención, dicha composición farmacéutica es adecuada para ser administrada en combinación con un fármaco adicional, es decir, como parte de una coterapia. En dicha coterapia, un agente activo puede incluirse opcionalmente en la misma composición farmacéutica que el polipéptido de la invención, o puede incluirse en una composición farmacéutica separada. En este último caso, dicha composición farmacéutica separada es adecuada para administración antes de, simultáneamente con o después de la administración de dicha composición farmacéutica que comprende el polipéptido de la invención. El fármaco o composición farmacéutica adicional puede ser un compuesto no proteínico o un compuesto proteínico. En el caso en el que el fármaco adicional sea un compuesto proteínico, es ventajoso que el compuesto proteínico sea capaz de proporcionar una señal de activación para las células efectoras inmunes.

Preferiblemente, dicho compuesto proteínico o compuesto no proteínico puede administrarse simultáneamente o no simultáneamente con el polipéptido de la invención, una molécula de ácido nucleico como se define en la presente memoria anteriormente, un vector como se define en la presente memoria anteriormente, o un huésped como se define en la presente memoria anteriormente.

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica de la invención para uso en un método para la prevención, tratamiento o mejora de una enfermedad proliferativa en un sujeto que lo necesita.

En otra realización preferida, dicha composición farmacéutica es adecuada para ser administrada en combinación con un fármaco adicional, es decir, como parte de una coterapia. En dicha coterapia, un agente activo puede incluirse opcionalmente en la misma composición farmacéutica que el polipéptido de la invención, o puede incluirse en una composición farmacéutica separada. En este último caso, dicha composición farmacéutica separada es adecuada para administración antes de, simultáneamente con o después de la administración de dicha composición farmacéutica que comprende el polipéptido de la invención. El fármaco o composición farmacéutica adicional puede ser un compuesto no proteínico o un compuesto proteínico. En el caso en el que el fármaco adicional sea un compuesto proteínico, es ventajoso que el compuesto proteínico sea capaz de proporcionar una señal de activación para las células efectoras inmunes.

Preferiblemente, dicho compuesto proteínico o compuesto no proteínico puede administrarse simultáneamente o no simultáneamente con el polipéptido de la invención, una molécula de ácido nucleico como se define en la presente memoria anteriormente, un vector como se define en la presente memoria anteriormente, o un huésped como se define en la presente memoria anteriormente.

Se prefiere para el método de la invención descrito anteriormente que dicho sujeto sea un ser humano.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un kit que comprende un polipéptido de la invención, una molécula de ácido nucleico de la invención, un vector de la invención, o un huésped de la invención.

Estos y otros aspectos se describen por la descripción y se elaboran en los Ejemplos de la presente invención. Las técnicas recombinantes y los métodos de inmunología se describen, p. ej., en Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3ª edición 2001; Lefkovits; *Immunology Methods Manual*; The Comprehensive Sourcebook of Techniques; Academic Press, 1997; Golemis; *Protein-Protein Interactions: A Molecular Cloning Manual*; Cold Spring Laboratory Press, 2002. La bibliografía adicional respecto a uno cualquiera de los anticuerpos, métodos, usos y compuestos que se van a emplear según la presente invención pueden conseguirse en bibliotecas y bases de datos públicas, usando, por ejemplo, dispositivos electrónicos. Por ejemplo, la base de datos pública "Medline", disponible en Internet, puede utilizarse, por ejemplo, en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/medline.html>. Las bases de datos adicionales y direcciones tales como <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> o las listadas en la página de inicio de los servicios de EMBL en <http://www.embl.de/services/index.html> son conocidas para el experto en la técnica y también pueden obtenerse usando, p. ej., <http://www.google.com>.

Las figuras muestran:

Figura 1

Fusión de los aminoácidos 1-27 N-terminales de CD3 épsilon de primate con una proteína heteróloga soluble.

Figura 2

La figura muestra los valores de absorción promedios de muestras en cuadruplicado medidas en un ensayo ELISA que detecta la presencia de una construcción que consiste en los aminoácidos 1-27 N-terminales de la cadena CD3 épsilon humana madura fusionados con la bisagra y parte Fc gamma de IgG1 humana y una etiqueta de 6 Histidinas C-terminal en un sobrenadante de células 293 transfectadas transitoriamente. La primera columna marcada "27 aa huCD3E" muestra el valor de absorción promedio para la construcción, la segunda columna marcada "SN irrel." muestra el valor promedio para un sobrenadante de células 293 transfectadas con una construcción irrelevante como

control negativo. La comparación de los valores obtenidos para la construcción con los valores obtenidos para el control negativo demuestra claramente la presencia de la construcción recombinante.

Figura 3

5 La figura muestra los valores de absorción promedios de muestras en cuadruplicado medidas en un ensayo ELISA que detecta la unión de las moléculas de unión anti-CD3 específicas entre especies en la forma de preparaciones
 10 crudas de anticuerpos de cadena única expresados periplasmáticamente a una construcción que comprende los aminoácidos 1-27 N-terminales de la cadena CD3 épsilon humana madura fusionados con la bisagra y parte Fc gamma de IgG1 humana y una etiqueta de 6 His C-terminal. Las columnas muestran de izquierda a derecha los valores de absorción promedios para las especificidades designadas como A2J HLP, I2C HLP E2M HLP, F7O HLP, G4H HLP, H2C HLP, E1L HLP, F12Q HLP, F6A HLP, y H1E HLP. La columna más a la derecha marcada "contr. neg." muestra el valor de absorción promedio para la preparación de cadena única de un anticuerpo murino anti-CD3 humano como control negativo. La comparación de los valores obtenidos para las especificidades anti-CD3 con los valores obtenidos para el control negativo demuestra claramente la fuerte unión de las especificidades anti-CD3 a los aminoácidos 1-27 N-terminales de la cadena CD3 épsilon humana madura.

15 Figura 4

Fusión de los aminoácidos 1-27 N-terminales de CD3 épsilon de primate a una proteína heteróloga unida a membrana.

Figura 5

20 Superposiciones de histogramas de diferentes transfectantes ensayados en un ensayo FACS que detecta la presencia de proteínas de fusión transmembrana recombinantes que consisten en EpCAM de cynomolgus y los aminoácidos 1-27 N-terminales de la cadena CD3 épsilon humana, de tití, de tamarín, de mono ardilla y de suido doméstico, respectivamente. Las superposiciones de histogramas de izquierda a derecha y desde la parte superior a la inferior muestran los resultados para los transfectantes que expresan las construcciones que comprenden 27 mer humano, 27 mer de tití, 27 mer de tamarín, 27 mer de mono ardilla y 27 mer de suido, respectivamente. En las superposiciones individuales la línea delgada representa una muestra incubada con PBS con 2 % de FCS en lugar de anticuerpo anti-Flag M2 como control negativo y la línea en negrita muestra una incubada con el anticuerpo anti-Flag M2. Para cada construcción, la superposición de los histogramas muestra la unión del anticuerpo anti-Flag M2 a los transfectantes, que demuestra claramente la expresión de las construcciones recombinantes en los transfectantes.

Figura 6

30 Superposiciones de histogramas de diferentes transfectantes ensayados en un ensayo FACS que detecta la unión de las moléculas de unión anti-CD3 específicas entre especies en la forma de preparaciones crudas de anticuerpos de cadena única expresados periplasmáticamente a los aminoácidos 1-27 N-terminales de la cadena CD3 épsilon humana, de tití, de tamarín y de mono ardilla, respectivamente, fusionados con EpCAM de cynomolgus.

Figura 6A:

35 Las superposiciones de histogramas de izquierda a derecha y desde la parte superior a la inferior muestran los resultados para los transfectantes que expresan la 1-27 CD3-EpCAM que comprende el 27 mer humano ensayado con las moléculas de unión específicas de CD3 designadas H2C HLP, F12Q HLP, E2M HLP y G4H HLP, respectivamente.

Figura 6B:

40 Las superposiciones de histogramas de izquierda a derecha y desde la parte superior a la inferior muestran los resultados para los transfectantes que expresan el 1-27 CD3-EpCAM que comprende el 27 mer de tití ensayado con las moléculas de unión específicas de CD3 designadas H2C HLP, F12Q HLP, E2M HLP y G4H HLP, respectivamente.

Figura 6C:

45 Las superposiciones de histogramas de izquierda a derecha y desde la parte superior a la inferior muestran los resultados para los transfectantes que expresan el 1-27 CD3-EpCAM que comprende el 27 mer de tamarín ensayado con las moléculas de unión específicas de CD3 designadas H2C HLP, F12Q HLP, E2M HLP y G4H HLP, respectivamente.

Figura 6D:

50 Las superposiciones de histogramas de izquierda a derecha y desde la parte superior a la inferior muestran los resultados para los transfectantes que expresan el 1-27 CD3-EpCAM que comprende el 27 mer de mono ardilla ensayado con las moléculas de unión específicas de CD3 designadas H2C HLP, F12Q HLP, E2M HLP y G4H HLP, respectivamente.

Figura 6E:

Las superposiciones de histogramas de izquierda a derecha y desde la parte superior a la inferior muestran los resultados para los transfectantes que expresan el 1-27 CD3-EpCAM que comprende el 27 mer de suido ensayado con las moléculas de unión específicas de CD3 designadas H2C HLP, F12Q HLP, E2M HLP y G4H HLP, respectivamente.

En las superposiciones individuales, la línea delgada representa una muestra incubada con una preparación de cadena única de un anticuerpo murino anti-CD3 humano como control negativo y la línea en negrita muestra una muestra incubada con las moléculas de unión anti-CD3 respectivas indicadas. Considerando la ausencia de unión a los transfectantes de 27 mer de suido y los niveles de expresión de las construcciones mostrados en la Figura 5, las superposiciones de los histogramas muestran una unión específica y fuerte de las especificidades anti-CD3 ensayadas de los anticuerpos de cadena única biespecíficos humanos completamente específicos entre especies a células que expresan las proteínas de fusión transmembrana recombinantes que comprenden los aminoácidos 1-27 N-terminales de la cadena CD3 épsilon humana, de tití, de tamarín y de mono ardilla, respectivamente, fusionada con EpCAM de cynomolgus y muestran, por lo tanto, especificidad entre especies en múltiples primates de las moléculas de unión anti-CD3.

Figura 7

Ensayo FACS para la detección de CD3 épsilon humano en células T murinas EL4 transfectadas. El análisis gráfico muestra una superposición de histogramas. La línea en negrita muestra células transfectadas incubadas con el anticuerpo anti-CD3 humano UCHT-1. La línea delgada representa células incubadas con control de isotipo IgG1 de ratón. La unión del anticuerpo anti CD3 UCHT1 muestra claramente la expresión de la cadena CD3 épsilon humana en la superficie celular de las células T murinas EL4 transfectadas.

Figura 8

Unión de anticuerpos anti CD3 específicos entre especies a mutantes de alanina en un experimento de escaneo de alanina. En las Figuras individuales, las columnas muestran de izquierda a derecha los valores de unión calculados en unidades arbitrarias en escala logarítmica para el transfectante de tipo salvaje (WT) y para todos los mutantes de alanina desde la posición 1 a 27. Los valores de unión se calculan usando la siguiente fórmula:

$$\text{valor_Muestra}(x,y) = \frac{\text{Muestra}(x,y) - \text{Contr_neg}(x)}{(\text{UCHT} - 1(x) - \text{Contr_neg}(x)) * \frac{\text{WT}(y) - \text{Contr_neg}(wt)}{\text{UCHT} - 1(wt) - \text{Contr_neg}(wt)}}$$

En esta ecuación, *valor_Muestra* significa el valor en unidades arbitrarias de la unión representando el grado de unión de un anticuerpo anti-CD3 específico a un mutante de alanina específico, como se muestra en la Figura, *Muestra* significa la media geométrica del valor de la fluorescencia obtenido para un anticuerpo anti-CD3 específico ensayado en un transfectante de escaneo de alanina específico, *Contr_neg*, significa la media geométrica del valor de la fluorescencia obtenido para el control negativo ensayado en un mutante de alanina específico, *UCHT-1* significa la media geométrica del valor de la fluorescencia obtenido para el anticuerpo UCHT-1 ensayado en un mutante de alanina específico, *WT* significa la media geométrica del valor de la fluorescencia obtenido para un anticuerpo anti-CD3 específico ensayado en el transfectante de tipo salvaje, *x* especifica el transfectante específico, *y* especifica el anticuerpo anti-CD3 respectivo y *wt* especifica que el transfectante respectivo es el de tipo salvaje. Las posiciones de mutantes de alanina individuales están marcadas con el código de una única letra del aminoácidos de tipo salvaje y el número de la posición.

Figura 8A:

La figura muestra los resultados para el anticuerpo anti CD3 específico entre especies A2J HLP, expresado como una molécula de IgG quimérica. Se observa una actividad de unión reducida para las mutaciones a alanina en la posición 4 (asparagina), en la posición 23 (treonina) y en la posición 25 (isoleucina). Se observa una pérdida completa de la unión para las mutaciones a alanina en la posición 1 (glutamina), en la posición 2 (aspartato), en la posición 3 (glicina) y en la posición 5 (glutamato).

Figura 8B:

La figura muestra los resultados para el anticuerpo anti CD3 específico entre especies E2M HLP, expresado como una molécula de IgG quimérica. Se observa una actividad de unión reducida para las mutaciones a alanina en la posición 4 (asparagina), en la posición 23 (treonina) y en la posición 25 (isoleucina). Se observa una pérdida completa de la unión para las mutaciones a alanina en la posición 1 (glutamina), en la posición 2 (aspartato), en la posición 3 (glicina) y en la posición 5 (glutamato).

Figura 8C:

La figura muestra los resultados para el anticuerpo anti CD3 específico entre especies H2C HLP, expresado como una molécula de IgG quimérica. Se observa una actividad de unión reducida para las mutaciones a alanina en la posición 4 (asparagina). Se observa una pérdida completa de la unión para las mutaciones a alanina glutamina en la posición 1 (glutamina), en la posición 2 (aspartato), en la posición 3 (glicina) y en la posición 5 (glutamato).

Figura 8D:

muestra los resultados para el anticuerpo anti CD3 específico entre especies F12Q HLP, ensayado como un anticuerpo de cadena única expresado periplasmáticamente. Se observa una pérdida completa de la unión para las mutaciones a alanina en la posición 1 (glutamina), en la posición 2 (aspartato), en la posición 3 (glicina) y en la posición 5 (glutamato).

Figura 9

Ensayo FACS que detecta la unión de la molécula de unión anti-CD3 específica entre especies H2C HLP a CD3 humano con y sin etiqueta His6 N-terminal.

Se realizan superposiciones de histogramas de la línea celular EL4 transfectada con la cadena CD3 épsilon humana de tipo salvaje (histograma izquierdo) o la cadena CD3 épsilon humana con etiqueta His6 N-terminal (histograma derecho) ensayadas en un ensayo FACS que detecta la unión de la molécula de unión específica entre especies H2C HLP. Las muestras se incuban con un control de isotipo apropiado como control negativo (línea delgada), anticuerpo anti-CD3 humano UCHT-1 como control positivo (línea discontinua) y anticuerpo anti-CD3 específico entre especies H2C HLP en la forma de una molécula de IgG quimérica (línea en negrita).

Las superposiciones de histogramas muestran una unión comparable del anticuerpo UCHT-1 a ambos transfectantes comparado con el control de isotipo lo que demuestra la expresión de ambas construcciones recombinantes. Las superposiciones de histogramas también muestran la unión de la molécula de unión anti-CD3 H2C HLP sólo a la cadena CD3 épsilon humana de tipo salvaje pero no a la cadena CD3 épsilon humana con His6. Estos resultados demuestran que es esencial un extremo N libre para la unión de la molécula de unión anti-CD3 específica entre especies H2C HLP.

Figura 10

Unión en saturación de EGFR-21-63 LH x H2C en PBMC humanas positivas para CD3 para determinar el valor KD de la unión de CD3 en células por análisis FACS. El ensayo se realiza como se describe en el Ejemplo 7.

Figura 11

Análisis por FACS de la unión de construcciones de cadena única biespecíficas específicas entre especies designadas a células CHO transfectadas con EGFR humano, línea de células T CD3+ humanas HPB-ALL, células CHO transfectadas con EGFR de cynomolgus y una línea de células T de macaco 4119 LnPx. La tinción para FACS se realiza como se describe en el Ejemplo 12. La línea delgada representa células incubadas con 2 µg/ml de proteína purificada que se incuban posteriormente con el anticuerpo anti-his y el anticuerpo de detección marcado con PE. La línea delgada del histograma refleja el control negativo: células incubadas sólo con el anticuerpo anti-his y el anticuerpo de detección.

Figura 12

Actividad citotóxica inducida por construcciones de cadena única específicas entre especies designadas dirigidas a líneas celulares diana indicadas. A) Se usan PBMC humanas CD4-/CD56- estimuladas como células efectoras, células CHO transfectadas con EGFR humano como células diana. B) Se usa la línea de células T de macaco 4119 LnPx como células efectoras, células CHO transfectadas con EGFR de cynomolgus como células diana. El ensayo se realiza como se describe en el Ejemplo 13.

Figura 13

Actividad citotóxica inducida por construcciones de cadena única específicas entre especies designadas dirigidas a líneas celulares diana indicadas. A) Se usan PBMC humanas CD4-/CD56- estimuladas como células efectoras, células CHO transfectadas con EGFR humano como células diana. B) Se usa la línea de células T de macaco 4119 LnPx como células efectoras, células CHO transfectadas con EGFR de cynomolgus como células diana. El ensayo se realiza como se describe en el Ejemplo 13.

Figura 14

Análisis por FACS de la unión de construcciones de cadena única biespecíficas específicas entre especies designadas a células CHO transfectadas con el MCSP D3 humano, línea de células T CD3+ humanas HPB-ALL, células CHO transfectadas con MCSP D3 de cynomolgus y una línea de células T de macaco 4119 LnPx. La tinción para FACS se

realiza como se describe en el Ejemplo 17. La línea gruesa representa células incubadas con 2 µg/ml de proteína purificada que se incuban posteriormente con el anticuerpo anti-his y el anticuerpo de detección marcado con PE. La línea delgada del histograma refleja el control negativo: células incubadas sólo con el anticuerpo anti-his y el anticuerpo de detección.

5 **Figura 15**

10 Análisis por FACS de la unión de construcciones de cadena única biespecíficas específicas entre especies designadas a células CHO transfectadas con el MCSP D3 humano, línea de células T CD3+ humanas HPB-ALL, células CHO transfectadas con MCSP D3 de cynomolgus y una línea de células T de macaco 4119 LnPx. La tinción para FACS se realiza como se describe en el Ejemplo 17. La línea gruesa representa células incubadas con 2 µg/ml de proteína purificada que se incuban posteriormente con el anticuerpo anti-his y el anticuerpo de detección marcado con PE. La línea delgada del histograma refleja el control negativo: células incubadas sólo con el anticuerpo anti-his y el anticuerpo de detección.

15 **Figura 16**

15 Análisis por FACS de la unión de construcciones de cadena única biespecíficas específicas entre especies designadas a células CHO transfectadas con el MCSP D3 humano, línea de células T CD3+ humanas HPB-ALL, células CHO transfectadas con MCSP D3 de cynomolgus y una línea de células T de macaco 4119 LnPx. La tinción para FACS se realiza como se describe en el Ejemplo 17. La línea gruesa representa células incubadas con 2 µg/ml de proteína monomérica purificada que se incuban posteriormente con el anticuerpo anti-his y el anticuerpo de detección marcado con PE. La línea delgada del histograma refleja el control negativo: células incubadas sólo con el anticuerpo anti-his y el anticuerpo de detección.

20 **Figura 17**

25 Actividad de citotoxicidad inducida por construcciones de cadena única específicas de MCSP específicas entre especies designadas redirigidas a líneas celulares diana indicadas. A) Se usan PBMC humanas CD4-/CD56-estimuladas como células efectoras, células CHO transfectadas con MCSP D3 humano como células diana. B) Se usa la línea de células T de macaco 4119 LnPx como células efectoras, células CHO transfectadas con MCSP D3 de cynomolgus como células diana. El ensayo se realiza como se describe en el Ejemplo 18.

30 **Figura 18**

30 Actividad de citotoxicidad inducida por construcciones de cadena única específicas de MCSP específicas entre especies designadas redirigidas a líneas celulares diana indicadas. A) y B) Se usa la línea de células T de macaco 4119 LnPx como células efectoras, células CHO transfectadas con MCSP D3 de cynomolgus como células diana. El ensayo se realiza como se describe en el Ejemplo 18.

35 **Figura 19**

35 Actividad de citotoxicidad inducida por construcciones de cadena única específicas de MCSP específicas entre especies designadas redirigidas a líneas celulares diana indicadas. A) y B) Se usan PBMC humanas CD4-/CD56-estimuladas como células efectoras, células CHO transfectadas con MCSP D3 humano como células diana. El ensayo se realiza como se describe en el Ejemplo 18.

40 **Figura 20**

40 Actividad de citotoxicidad inducida por construcciones de cadena única específicas de MCSP específicas entre especies designadas redirigidas a líneas celulares diana indicadas. A) Se usan PBMC humanas CD4-/CD56-estimuladas como células efectoras, células CHO transfectadas con MCSP D3 humano como células diana. B) Se usa la línea de células T de macaco 4119 LnPx como células efectoras, células CHO transfectadas con MCSP D3 de cynomolgus como células diana. El ensayo se realiza como se describe en el Ejemplo 18.

45 **Figura 21**

45 Actividad de citotoxicidad inducida por construcciones de cadena única específicas de MCSP específicas entre especies designadas redirigidas a líneas celulares diana indicadas. A) Se usan PBMC humanas CD4-/CD56-estimuladas como células efectoras, células CHO transfectadas con MCSP D3 humano como células diana. B) Se usa la línea de células T de macaco 4119 LnPx como células efectoras, células CHO transfectadas con MCSP D3 de cynomolgus como células diana. El ensayo se realiza como se describe en el Ejemplo 18.

50 **Figura 22**

50 Estabilidad en plasma de anticuerpos de cadena única biespecíficos para MCSP y CD3 específicos entre especies ensayada por la medición de la actividad de citotoxicidad inducida por muestras de las construcciones de cadena única designadas incubadas con 50 % de plasma humano a 37 °C y 4 °C durante 24 horas, respectivamente, o con la adición de 50 % de plasma humano inmediatamente antes del ensayo de la citotoxicidad o sin la adición de plasma.

Se usan células CHO transfectadas con MCSP humano como línea celular diana y se usan PBMC humanas CD4-/CD56- estimuladas como células efectoras. El ensayo se realiza como se describe en el Ejemplo 19.

Figura 23

5 Caída inicial y recuperación (es decir, redistribución) de los recuentos absolutos de células T (cuadrados abiertos), en la sangre periférica de pacientes con B-NHL (números de patente 1, 7, 23, 30, 31, y 33 de la Tabla 4), que no tenían esencialmente células B diana positivas para CD19 circulantes (triángulos llenos), durante la fase inicial de la infusión intravenosa con la molécula de unión de CD3 CD19xCD3 que reconoce un epítipo de CD3 convencional dependiente de contexto. Los recuentos celulares absolutos se proporcionan en 1.000 células por microlitro de sangre. El primer punto de datos muestra los recuentos en la línea base inmediatamente antes del inicio de la infusión. La dosis CD19xCD3 se proporciona entre paréntesis al lado del número del paciente.

Figura 24

15 (A) Redistribución repetida de células T (cuadrados abiertos) en el paciente con B-NHL #19 (Tabla 4) que no tenía células B diana positivas para CD19 circulantes (triángulos llenos) y que desarrolló síntomas en el SNC bajo una infusión intravenosa continua con CD19xCD3 a una dosis inicial de 5 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$ durante un día seguido de un incremento súbito de dosis hasta 15 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$. Los recuentos de células absolutos se proporcionan en 1.000 células por microlitro de sangre. El primer punto de datos muestra los recuentos en la línea base inmediatamente antes del inicio de la infusión. Después de la recuperación de las células T circulantes desde el primer episodio de redistribución desencadenado por el inicio del tratamiento a 5 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$, el incremento por etapas de la dosis desde 5 a 15 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$ desencadenó un segundo episodio de redistribución de las células T que estuvo asociado con el desarrollo de síntomas en el SNC dominados por confusión y desorientación.

20 (B) Redistribución repetida de células T en un paciente con B-NHL, que desarrolló síntomas en el SNC bajo una infusión en bolo intravenosa repetida con CD19xCD3 a 1,5 $\mu\text{g}/\text{m}^2$. Los recuentos de células absolutos se proporcionan en 1.000 células por microlitro de sangre. El tiempo de la infusión para cada administración en bolo fue 2 a 4 horas. Las flechas verticales indican el inicio de las infusiones en bolo. Los puntos de datos al comienzo de cada administración en bolo muestran los recuentos de células T inmediatamente antes del inicio de la infusión en bolo. Cada infusión en bolo desencadenó un episodio de redistribución de células T seguido de la recuperación de los recuentos de células T antes de la siguiente infusión en bolo. Finalmente, el tercer episodio de redistribución de células T estuvo asociado con el desarrollo de síntomas en el SNC en este paciente.

Figura 25

30 Patrón de la redistribución compleja de células T (cuadrados abiertos) en el paciente con B-NHL #20 (Tabla 4) sin células B diana positivas para CD19 circulantes (triángulos llenos), durante el inicio del periodo de aumento de la infusión de CD19xCD3, es decir, incremento gradual uniforme de la velocidad de flujo desde casi cero a 15 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$ durante las primeras 24 horas de tratamiento. Los recuentos de células absolutos se proporcionan en 1.000 células por microlitro de sangre. El primer punto de datos muestra los recuentos en la línea base inmediatamente antes del inicio de la infusión. La dosis de CD19xCD3 se proporciona entre paréntesis al lado del número del paciente. Las células T que reaparecen en la sangre circulante después de la redistribución inicial desencadenada por la primera exposición a CD19xCD3 están inducidas parcialmente a volver a desaparecer de la sangre circulante de nuevo por los niveles aún crecientes de CD19xCD3 durante la fase de aumento de la infusión.

Figura 26

40 Recuentos de células T y B durante el tratamiento con CD19xCD3 del paciente con B-NHL #13 (Tabla 4) que tenía un número significativo de células B diana positivas para CD19 circulantes (linfoma) (triángulos llenos). Los recuentos de células absolutos se proporcionan en 1.000 células por microlitro de sangre. El primer punto de datos muestra los recuentos en la línea base inmediatamente antes del inicio de la infusión. La dosis de CD19xCD3 se proporciona entre paréntesis al lado del número del paciente. Las células T (cuadrados abiertos) desaparecen completamente de la circulación después del inicio de la infusión de CD19xCD3 y no reaparecen hasta que las células B positivas para CD19 circulantes (linfoma) (triángulos llenos) se deplecionan de la sangre periférica.

Figura 27

50 Redistribución repetida de células T (cuadrados abiertos) en el paciente con B-NHL #24 (Tabla 4), que no tenía esencialmente células B diana positivas para CD19 circulantes (triángulos llenos) y desarrolló síntomas en el SNC después del inicio de la infusión de CD19xCD3 sin HSA adicional como se requiere para la estabilización del fármaco (panel superior). Después de la primera recuperación de las T células circulantes desde la redistribución inicial, el flujo no uniforme del fármaco debido a la ausencia de HSA estabilizante desencadenó un segundo episodio de redistribución de células T que estuvo asociado con el desarrollo de síntomas en el SNC dominados por confusión y desorientación. Cuando el mismo paciente volvió a comenzar correctamente con la disolución de CD19xCD3 que contenía HSA adicional para la estabilización del fármaco, no se observó redistribución repetida de células T (panel inferior) y el paciente no desarrolló de nuevo ningún síntoma en el SNC. Los recuentos de células absolutos se proporcionan en 1.000 células por microlitro de sangre. El primer punto de datos muestra los recuentos en la línea

base inmediatamente antes del inicio de la infusión. La dosis de CD19xCD3 se proporciona entre paréntesis al lado del número del paciente.

Figura 28

5 Modelo de adhesión de células T a células endoteliales inducida por la unión monovalente a epítomos de CD3 dependientes de contexto. La interacción monovalente de una molécula de unión a CD3 convencional a su epítipo dependiente de contexto en CD3 épsilon puede dar lugar a un cambio alostérico en la conformación de CD3 seguido del reclutamiento de Nck2 al dominio citoplasmático de CD3 épsilon (Gil et al. (2002) Cell 109: 901). Como Nck2 está unido directamente a integrinas mediante PINCH e ILK (Legate et al. (2006) Nat Rev Mol Cell Biol 7: 20), el reclutamiento de Nck2 al dominio citoplasmático de CD3 épsilon después de un cambio alostérico en la conformación de CD3 a través de la unión de una molécula de unión a CD3 convencional (como la CD19xCD3 del ejemplo 20) a su epítipo en CD3 épsilon dependiente de contexto, puede incrementar la adhesividad de las células T a las células endoteliales mediante el cambio transitorio de las integrinas en la superficie de las células T a su isoforma más adhesiva mediante una señalización de dentro a afuera.

Figura 29

15 Actividad citotóxica del material de ensayo CD33-AF5 VH-VL x I2C VH-VL usado para el estudio in vivo en monos cynomolgus como se describe en el Ejemplo 21. La lisis específica de células diana positivas para CD33 se determinó en un ensayo estándar de liberación de ⁵¹Cromo a concentraciones crecientes de CD33-AF5 VH-VL x I2C VH-VL. La duración del ensayo fue 18 horas. Se usó la línea de células T de macaco 4119 LnPx como fuente de células efectoras. Las células CHO transfectadas con CD33 cynomolgus sirvieron como células diana. La relación de célula efectora a diana (relación E:D) fue 10:1. La concentración de CD33-AF5 VH-VL x I2C VH-VL requerida para la lisis mitad de la máxima de las células diana (CE50) se calculó a partir de la curva de respuesta a la dosis con un valor de 2,7 ng/ml.

Figura 30

25 (A) Depleción dependiente de la dosis y del tiempo de monocitos positivos para CD33 de la sangre periférica de monos cynomolgus a través de la infusión intravenosa continua de CD33-AF5 VH-VL x I2C VH-VL como se describe en el Ejemplo 21. Se muestra el porcentaje relativo a la línea base (es decir, 100 %) de recuentos absolutos de monocitos positivos para CD33 circulantes después de la duración del tratamiento como se ha indica encima de las columnas para cada uno de los dos monos cynomolgus por nivel de dosis. El nivel de dosis (es decir, la velocidad del flujo de la infusión) se indica debajo de las columnas. No se observó depleción de monocitos positivos para CD33 circulantes en los animales 1 y 2 tratados durante 7 días a una dosis de 30 µg/m²/24h. En los animales 3 y 4 tratados durante 7 días a una dosis de 60 µg/m²/24h, los recuentos de monocitos positivos para CD33 circulantes se redujeron hasta el 68 % y 40 % de la línea base, respectivamente. A 240 µg/m²/24h, los monocitos positivos para CD33 circulantes se habían deplecionado casi completamente de la sangre periférica después de 3 días de tratamiento (animales 5 y 6). A 1.000 µg/m²/24h, la depleción de los monocitos positivos para CD33 circulantes de la sangre periférica ya se había completado después de 1 día de tratamiento (animales 7 y 8).

35 (B) Curso de los recuentos de células T y monocitos CD33 en la sangre periférica de dos monos cynomolgus durante la infusión continua de CD33-AF5 VH-VL x I2C VH-VL durante 14 días a 120 µg/m²/24h. Los recuentos de células absolutos se proporcionan en 1.000 células por microlitro de sangre. El primer punto de datos muestra los recuentos en la línea base inmediatamente antes del inicio de la infusión. Después de la inmovilización inicial de monocitos CD33 durante las primeras 12 horas después del inicio de la infusión, los monocitos CD33 en la sangre periférica (triángulos llenos) se deplecionan dos tercios (animal 10) y 50 % (animal 9) respecto a los recuentos respectivos en la línea base durante el curso adicional de la infusión. Los recuentos de células T circulantes (cuadrados abiertos) muestran una caída inicial limitada seguida de la recuperación todavía durante la presencia de células diana monocíticas positivas para CD33 circulantes.

Figura 31

45 Actividad citotóxica del material de ensayo MCSP-G4 VH-VL x I2C VH-VL usado para el estudio in vivo en monos cynomolgus como se describe en el Ejemplo 22. La lisis específica de células diana positivas para MCSP se determinó en un ensayo estándar de liberación de ⁵¹Cromo a concentraciones crecientes de MCSP-G4 VH-VL x I2C VH-VL. La duración del ensayo fue 18 horas. Se usó la línea de células T de macaco 4119 LnPx como fuente de células efectoras. Las células CHO transfectadas con MCSP de cynomolgus sirvieron como células diana. La relación de célula efectora a diana (relación E:D) fue 10:1. La concentración de MCSP-G4 VH-VL x I2C VH-VL requerida para la lisis mitad de la máxima de las células diana (CE50) se calculó a partir de la curva de respuesta a la dosis con un valor de 1,9 ng/ml.

Figura 32

55 Ausencia de episodios iniciales de caída y recuperación posterior de los recuentos absolutos de células T (es decir, redistribución) en la sangre periférica de monos cynomolgus durante la fase de inicio de la infusión intravenosa con la molécula de unión a CD3 MCSP-G4 VH-VL x I2C VH-VL que reconoce un epítipo de CD3 esencialmente independiente de contexto. Los recuentos de células absolutos se proporcionan en 1.000 células por microlitro de sangre. El primer punto de datos muestra los recuentos en la línea base inmediatamente antes del inicio de la infusión.

La dosis de MCSP-G4 VH-VL x I2C VH-VL se proporciona entre paréntesis al lado del número del animal. En la ausencia conocida de células diana positivas para MCSP de la sangre circulante de monos cynomolgus, no hay inducción de la redistribución de células T (es decir, un episodio inicial de caída y recuperación posterior de recuentos absolutos de células T) a través del entrecruzamiento mediado por las células diana de CD3. Además, la inducción de la redistribución de células T (es decir, un episodio inicial de caída y recuperación posterior de recuentos absolutos de células T) a través de una señal, que las células T pueden recibir a través de la interacción exclusiva con un sitio de unión de CD3 solo, puede evitarse por el uso de moléculas de unión de CD3 como MCSP-G4 VH-VL x I2C VH-VL que reconocen un epitopo de CD3 esencialmente independiente de contexto.

Figura 33

10 Análisis por FACS de la unión de construcciones biespecíficas específicas entre especies designadas a células CHO transfectadas con CD33 humano, la línea de células T CD3+ humana HPB-ALL, células CHO transfectadas con CD33 de macaco y PBMC de macaco, respectivamente. La tinción para FACS se realiza como se describe en el Ejemplo 23.4. Las líneas en negrita representan células incubadas con 5 µg/ml de construcción de cadena única biespecífica purificada o sobrenadante del cultivo celular de células transfectadas que expresan las construcciones de anticuerpo biespecíficas específicas entre especies. Los histogramas rellenos reflejan los controles negativos. El sobrenadante de las células CHO no transfectadas se usó como control negativo. Para cada construcción de cadena única biespecífica específica entre especies, la superposición de los histogramas muestra la unión específica de la construcción a CD33 humano y de macaco y CD3 humano y de macaco.

Figura 34

20 Los diagramas muestran los resultados de los ensayos de liberación de cromo que miden la actividad citotóxica inducida por construcciones de cadena única específicas de CD33 específicas entre especies designadas redirigidas hacia las líneas celulares diana indicadas. También se usaron células efectoras como se indica. Los ensayos se realizan como se describe en el Ejemplo 23.5. Los diagramas demuestran claramente, para cada construcción, el potente reclutamiento de actividad citotóxica de las células efectoras humanas y de macaco frente a células CHO transfectadas con CD33 humano y de macaco, respectivamente.

Figura 35

30 Análisis por FACS de la unión de construcciones de cadena única biespecíficas específicas entre especies designadas a células CHO transfectadas con CAIX humano, la línea de células T CD3+ humana HPB-ALL, células CHO transfectadas con CAIX de macaco y la línea de células T de macaco 4119 LnPx, respectivamente. La tinción para FACS se realizó como se describe en el Ejemplo 24.5. Las líneas en negrita representan células incubadas con 2 µg/ml de construcción de cadena única biespecífica purificada. Los histogramas rellenos reflejan los controles negativos. El sobrenadante de células CHO no transfectadas se usó como control negativo para la unión a las líneas de células T. Una construcción de cadena única con especificidad de diana irrelevante se usó como control negativo para la unión a las células CHO transfectadas con CAIX. Para cada construcción de cadena única biespecífica específica entre especies, la superposición de los histogramas muestra la unión específica de la construcción CAIX humano y de macaco y CD3 humano y de macaco.

Figura 36

40 Los diagramas muestran los resultados de ensayos de liberación de cromo que miden la actividad citotóxica inducida por construcciones de cadena única específicas de CAIX específicas entre especies designadas redirigidas a las líneas celulares diana indicadas. También se usaron células efectoras como se indica. Los ensayos se realizan como se describe en el Ejemplo 24.6. Los diagramas demuestran claramente, para cada construcción, el reclutamiento potente de la actividad citotóxica de células efectoras humanas y de macaco frente a células CHO transfectadas con CAIX humano y de macaco, respectivamente.

Figura 37

45 Actividad citotóxica inducida por construcciones de cadena única específicas de EpCAM designadas frente a células CHO transfectadas con EpCAM humano usando células T humanas como células efectoras. El ensayo se realizó como se describe en la sección de los ejemplo. Los diagramas demuestran claramente el reclutamiento potente de la actividad citotóxica por cada construcción.

Células efectoras: PBMC humanas deplecionadas de CD4/CD56 estimuladas.

50 Células diana: CHO transfectadas con EpCAM humano.

Figura 38

Análisis por FACS de la unión de construcciones de cadena única biespecíficas designadas a células CHO transfectadas con EpCAM humano (2a), células CHO no transfectadas como la línea celular negativa para EpCAM y CD3 (2b), PBMC humanas (2c) y la línea de células T de macaco 4119 LnPx (2d), respectivamente. Las células se

incubaron con el sobrenadante que contenía la construcción de cadena única biespecífica respectiva. La tinción para FACS se realiza como se describe en la sección de los ejemplos. Para cada construcción de cadena única biespecífica específica entre especies, la superposición de los histogramas muestra la unión específica de la construcción a EpCAM humano y CD3 humano y de macaco.

- 5 a: CHO-EpCAM (humano)
 b: CHO (no transfectadas)
 c: PBMC humanas
 d: 4119LnPx de macaco (CD3+).

Figura 39

- 10 Análisis por FACS de la unión de construcciones de cadena única biespecíficas específicas entre especies designadas a células CHO transfectadas con el EGFRvIII humano, línea de células T CD3+ humana HPB-ALL, células CHO transfectadas con EGFRvIII de cynomolgus y una línea de células T de macaco 4119 LnPx. La tinción para FACS se realiza como se describe en el Ejemplo 26.3. La línea gruesa representa células incubadas con 2 µg/ml de proteína monomérica purificada que se incuban posteriormente con el anticuerpo anti-his y el anticuerpo de detección marcado con PE. La línea delgada del histograma refleja el control negativo: células incubadas sólo con el anticuerpo anti-his y el anticuerpo de detección.
- 15

Figura 40

- Actividad citotóxica inducida por construcciones de cadena única específicas entre especies designadas redirigidas a las líneas celulares diana indicadas. A) Se usan PBMC humanas CD4-/CD56- estimuladas como células efectoras, células CHO transfectadas con EGFRvIII humano como células diana. B) Se usa la línea de células T de macaco 4119 LnPx como células efectoras, células CHO transfectadas con EGFRvIII de cynomolgus como células diana. El ensayo se realiza como se describe en el Ejemplo 26.3.
- 20

Figura 41

- 25 Análisis por FACS de la unión de construcciones de cadena única biespecíficas específicas entre especies designadas a células J558L transfectadas con IgE humana, línea de células T CD3+ humana HPB-ALL, células J558L transfectadas con IgE de macaco y una línea de células T de macaco 4119 LnPx. La tinción para FACS se realiza como se describe en el Ejemplo 27.2. La línea gruesa representa células incubadas con el sobrenadante del cultivo celular de células CHO transfectadas la construcción de cadena única biespecífica específica entre especies designada que se incuban posteriormente con el anticuerpo anti-his y el anticuerpo de detección marcado con PE. La línea delgada del histograma refleja el control negativo: células incubadas sólo con el anticuerpo anti-his y el anticuerpo de detección.
- 30

Figura 42

- Actividad citotóxica inducida por construcciones de cadena única específicas entre especies designadas redirigidas a las líneas celulares diana indicadas. A) Se usan PBMC humanas CD4-/CD56- estimuladas como células efectoras, células J558L transfectadas con IgE humana como células diana. B) Se usó la línea de células T de macaco 4119 LnPx como células efectoras, células J558L transfectadas con IgE de macaco como células diana. El ensayo se realiza como se describe en el Ejemplo 27.2.
- 35

Figura 43

- 40 Análisis por FACS de la unión de construcciones de cadena única biespecíficas específicas entre especies designadas a células CHO transfectadas con CD44 humano, la línea de células T CD3+ humana HPB-ALL, células CHO transfectadas con CD44 de macaco y PBMC de macaco, respectivamente. La tinción para FACS se realizó como se describe en el Ejemplo 28.6. Las líneas en negrita representan células incubadas con 5 µg/ml de construcción de cadena única biespecífica purificada. Los histogramas rellenos reflejan los controles negativos. Se usó PBS con 2 % de FCS como control negativo. Para cada construcción de cadena única biespecífica específica entre especies, la superposición de los histogramas muestra la unión específica de la construcción a CD44 humano y de macaco y CD3 humano y de macaco.
- 45

Figura 44

- 50 Análisis por FACS de la unión de construcciones de cadena única biespecíficas específicas entre especies designadas a células CHO transfectadas con CD44 humano que carece del exón v6. La tinción para FACS se realiza como se describe en el Ejemplo 28.6. Como control para la expresión de CD44, las células CHO transfectadas con CD44 humano que carecen del exón v6 y las células CHO transfectadas con el CD44 humano de longitud completa se incubaron con un anticuerpo anti-CD44. Las líneas en negrita representan células incubadas con 5 µg/ml de construcción de cadena única biespecífica purificada o el anticuerpo anti-CD44 (5 µg/ml) como se indica. Los

5 histogramas rellenos reflejan los controles negativos. Se usó PBS con 2 % de FCS como control negativo. Para cada construcción de cadena única biespecífica específica entre especies, la superposición de los histogramas muestra la ausencia de unión de la construcción a CD44 humano que carece del exón v6. La presencia de CD44 en las células CHO transfectadas con CD44 humano que carece del exón v6 se demostró por la unión comparable del anticuerpo anti-CD44 a estas células y a las células transfectadas con CD44 humano de longitud completa. El análisis por FACS de la unión mostró la especificidad de las construcciones de cadena única biespecíficas específicas entre especies para el exón v6 de CD44.

Figura 45

10 El diagrama muestra los resultados de un ensayo de liberación de cromo que mide la actividad citotóxica inducida por construcciones de cadena única específicas de CD44 específicas entre especies designadas redirigidas a células CHO transfectadas con CD44 humano como se describe en el Ejemplo 28.1. Como células efectoras se usaron PBMC humanas estimuladas deplecionadas de CD4 y CD56 con una relación E:D de 10:1. El ensayo se realiza como se describe en el Ejemplo 28.7. El diagrama demostró, para cada construcción, el reclutamiento potente de la actividad citotóxica de células efectoras humanas frente a células CHO transfectadas con CD44 humano.

Figura 46

15 Análisis por FACS de la unión de construcciones de cadena única biespecíficas específicas entre especies designadas a células CHO transfectadas con CD30 humano, la línea de células B CD30+ humana MEC-1, la línea de células T CD3+ humana HPB-ALL, células CHO transfectadas con CD30 de macaco y PBMC de macaco, respectivamente. La tinción para FACS se realizó como se describe en el Ejemplo 29.5. Las líneas en negrita representan células incubadas con 5 µg/ml de construcción de cadena única biespecífica purificada. Los histogramas rellenos reflejan los controles negativos. Se usó PBS con 2 % de FCS como control negativo. Para cada construcción de cadena única biespecífica específica entre especies, la superposición de los histogramas muestra la unión específica de la construcción a CD30 humano y de macaco y CD3 humano y de macaco.

Figura 47

25 Los diagramas muestran los resultados de ensayos de liberación de cromo que miden la actividad citotóxica inducida por construcciones de cadena única específicas de CD30 específicas entre especies designadas redirigidas a las líneas celulares diana indicadas. También se usaron células efectoras como se indica. Los ensayos se realizaron como se describe en el Ejemplo 29.6. Los diagramas demuestran claramente, para cada construcción, el reclutamiento potente de la actividad citotóxica de células efectoras humanas y de macaco frente a células positivas para CD30 humano y de macaco, respectivamente.

Figura 48

35 Análisis por FACS de la unión de construcciones de cadena única biespecíficas específicas entre especies designadas a células CHO transfectadas con HER2 humano, la línea de células T CD3+ humana HPB-ALL, células CHO transfectadas con HER2 de macaco y la línea de células T de macaco 4119LnPx, respectivamente. La tinción para FACS se realizó como se describe en el Ejemplo 30.5. Las líneas en negrita representan células incubadas con 2 µg/ml de construcción de cadena única biespecífica purificada. Las líneas delgadas reflejan los controles negativos. Se usó PBS con 2 % de FCS como control negativo. Para cada construcción de cadena única biespecífica específica entre especies, la superposición de los histogramas muestra la unión específica de la construcción a HER2 humano y de macaco y CD3 humano y de macaco.

Figura 49

40 Los diagramas muestran los resultados de ensayos de liberación de cromo que miden la actividad citotóxica inducida por construcciones de cadena única específicas de HER2 específicas entre especies designadas redirigidas a las líneas celulares diana indicadas. También se usaron células efectoras como se indica. Los ensayos se realizaron como se describe en el Ejemplo 30.6. Los diagramas demuestran claramente, para cada construcción mostrada, el reclutamiento potente de la actividad citotóxica de células efectoras humanas y de macaco frente a células CHO transfectadas con HER2 humano y de macaco, respectivamente.

Figura 50

50 Gel de SDS PAGE y transferencia Western que monitorizan la purificación de la molécula de cadena única biespecífica específica entre especies designada E292F3 HL x I2C HL. Las muestras del eluato, el sobrenadante del cultivo celular (SN) y el flujo pasante de la columna (FT) se analizaron como se indica. Se aplicó un marcador de proteínas (M) como referencia del tamaño. Una fuerte banda de proteína con un peso molecular entre 50 y 60 kDa en el gel de SDS PAGE demuestra la purificación eficiente de la molécula de cadena única biespecífica específica entre especies hasta un grado muy alto de pureza con el método de purificación de una etapa descrito en el Ejemplo 31.2. La transferencia Western que detecta la etiqueta de histidina₆ confirma la identidad de la banda de la proteína en el eluato como la molécula de cadena única biespecífica específica entre especies. La señal débil para la muestra de flujo pasante en

este método de detección sensible muestra además la captura casi completa de las moléculas de cadena única biespecíficas por el método de purificación.

Figura 51

5 Gel de SDS PAGE y transferencia Western que monitorizan la purificación de la molécula de cadena única biespecífica específica entre especies designada V207C12 HL x H2C HL. Las muestras del eluato, el sobrenadante del cultivo celular (SN) y el flujo pasante de la columna (FT) se analizaron como se indica. Se aplicó un marcador de proteínas (M) como referencia del tamaño. Una fuerte banda de proteína con un peso molecular entre 50 y 60 kDa en el gel de SDS PAGE demuestra la purificación eficiente de la molécula de cadena única biespecífica específica entre especies hasta un grado muy alto de pureza con el método de purificación de una etapa descrito en el Ejemplo 31.2. La
10 transferencia Western que detecta la etiqueta de histidina₆ confirma la identidad de la banda de la proteína en el eluato como la molécula de cadena única biespecífica específica entre especies. La señal débil para la muestra de flujo pasante en este método de detección sensible muestra además la captura casi completa de las moléculas de cadena única biespecíficas por el método de purificación.

Figura 52

15 Gel de SDS PAGE y transferencia Western que monitorizan la purificación de la molécula de cadena única biespecífica específica entre especies designada AF5HLxF12QHL. Las muestras del eluato, el sobrenadante del cultivo celular (SN) y el flujo pasante de la columna (FT) se analizaron como se indica. Se aplicó un marcador de proteínas (M) como referencia del tamaño. Una fuerte banda de proteína con un peso molecular entre 50 y 60 kDa en el gel de SDS PAGE demuestra la purificación eficiente de la molécula de cadena única biespecífica específica entre especies hasta un
20 grado muy alto de pureza con el método de purificación de una etapa descrito en el Ejemplo 31.2. La transferencia Western que detecta la etiqueta de histidina₆ confirma la identidad de la banda de la proteína en el eluato como la molécula de cadena única biespecífica específica entre especies. La señal en la muestra de flujo pasante en este método de detección sensible se explica por la saturación de la columna de afinidad debido a la alta concentración de moléculas de cadena única biespecíficas en el sobrenadante.

25 Figura 53

Curva estándar de AF5HLxI2CHL en 50 % de suero de mono macaco. El diagrama superior muestra la curva estándar generada para el ensayo como se describe en el Ejemplo 32.2.

30 El diagrama inferior muestra los resultados para las muestras de control de calidad de AF5HLxI2CHL en 50 % de suero de mono macaco. Las tasas de recuperación están por encima del 90 % para la muestra de QC alto y medio y por encima del 80 % para la muestra de QC bajo.

Así, el ensayo permite la detección de AF5HLxI2CHL en muestras de suero en el intervalo de 10 ng/ml a 200 ng/ml (antes de la dilución).

Figura 54

35 Curva estándar de MCSP-G4 HL x I2C HL en 50 % de suero de mono macaco. El diagrama superior muestra la curva estándar generada para el ensayo como se describe en el Ejemplo 32.2.

El diagrama inferior muestra los resultados para las muestras de control de calidad de MCSP-G4 HL x I2C HL en 50 % de suero de mono macaco. Las tasas de recuperación están por encima del 98 % para la muestra de QC alto y medio y por encima del 85 % para la muestra de QC bajo.

40 Así, el ensayo permite la detección de MCSP-G4 HL x I2C HL en muestras de suero en el intervalo de 10 ng/ml a 200 ng/ml (antes de la dilución).

Figura 55

45 Análisis por FACS de la unión de un anticuerpo anti-Flag a células CHO transfectadas con los aminoácidos 1-27 N-terminales de CD3 épsilon de las especies designadas fusionados con EpCAM de cynomolgus. La tinción para FACS se realizó como se describe en el Ejemplo 33.1. Las líneas en negrita representan células incubadas con el anticuerpo anti-Flag. Los histogramas rellenos reflejan los controles negativos. Se usó PBS con 2 % de FCS como control negativo. Los histogramas muestran una unión fuerte y comparable del anticuerpo anti-Flag a todos los transfectantes indicando una expresión fuerte e igual de las construcciones transfectadas.

Figura 56

50 Análisis por FACS de la unión de la construcción I2C IgG1 a células CHO que expresan los aminoácidos 1-27 N-terminales de CD3 épsilon de las especies designadas fusionados con EpCAM de cynomolgus. La tinción para FACS se realiza como se describe en el Ejemplo 33.3. Las líneas en negrita representan células incubadas con 50 µl de sobrenadante del cultivo celular de células que expresan la construcción I2C IgG1. Los histogramas rellenos reflejan el control negativo. Las células que expresan los aminoácidos 1-27 N-terminales de CD3 épsilon de suido fusionados

con EpCAM de cynomolgus se usaron como control negativo. En comparación con el control negativo, los histogramas demuestran claramente la unión de la construcción I2C IgG1 a los aminoácidos 1-27 N-terminales de CD3 épsilon humano, de tití, de tamarín y de mono ardilla.

Figura 57

5 Análisis por FACS de la unión de la construcción I2C IgG1 como se describe en el Ejemplo 33.2 a CD3 humano con y sin etiqueta His6 N-terminal como se describe en los Ejemplos 6.1 y 5.1, respectivamente. Las líneas en negrita representan células incubadas con el anticuerpo anti-CD3 humano UCHT-1, el anticuerpo frente a penta-His (Qiagen) y el sobrenadante del cultivo celular de células que expresan la construcción I2C IgG1, respectivamente, como se indica. Los histogramas rellenos reflejan células incubadas con un anticuerpo IgG1 murino irrelevante como control negativo.

10 Las dos superposiciones de histogramas superiores muestran la unión comparable del anticuerpo UCHT-1 a ambos transfectantes comparado con el control de isotipo lo que demuestra la expresión de ambas construcciones recombinantes. Las superposiciones de histogramas centrales muestran la unión del anticuerpo frente a penta his a las células que expresan la cadena CD3 épsilon humana con His6 (His6-CD3) pero no a las células que expresan la cadena CD3 épsilon de tipo salvaje (WT-CD3). Las superposiciones de histogramas inferiores muestran la unión de la construcción I2C IgG1 a la cadena CD3 épsilon humana de tipo salvaje pero no a la cadena CD3 épsilon humana con His6. Estos resultados demuestran que es esencial un extremo N libre para la unión de la molécula de unión anti-CD3 específica entre especies I2C a la cadena CD3 épsilon.

Figura 58

20 Análisis por FACS de la unión de construcciones de cadena única biespecíficas específicas entre especies designadas a células CHO transfectadas con MCSP D3 humano, la línea de células T CD3+ humana HPB-ALL, células CHO transfectadas con MCSP D3 de macaco y la línea de células T de macaco 4119 LnPx, respectivamente. La tinción para FACS se realizó como se describe en el Ejemplo 17. Las líneas en negrita representan células incubadas con 2 µg/ml de construcción de cadena única biespecífica purificada o sobrenadante de células que contiene la construcción de cadena única biespecífica, respectivamente. Los histogramas rellenos reflejan los controles negativos. Se usó el sobrenadante de células CHO no transfectadas como control negativo para la unión a las líneas de células T. Una construcción de cadena única con especificidad de diana irrelevante se usó como control negativo para la unión a las células CHO transfectadas con MCSP D3. Para cada construcción de cadena única biespecífica específica entre especies, la superposición de los histogramas muestra la unión específica de la construcción a MCSP D3 humano y de macaco y CD3 humano y de macaco.

Figura 59

35 Actividad citotóxica inducida por construcciones de cadena única específicas de MCSP D3 específicas entre especies designadas redirigidas a las líneas celulares diana indicadas. También se usaron células efectoras y la relación efector a diana como se indica. El ensayo se realiza como se describe en el Ejemplo 18. Los diagramas demuestran claramente un reclutamiento potente específico entre especies de la actividad citotóxica por cada construcción.

Figura 60

40 Análisis por FACS de la unión de construcciones de cadena única biespecíficas específicas entre especies designadas a células CHO transfectadas con CD33 humano, la línea de células T CD3+ humana HPB-ALL, células CHO transfectadas con CD33 de macaco y PBMC de macaco, respectivamente. La tinción para FACS se realizó como se describe en el Ejemplo 36.2. Las líneas en negrita representan células incubadas con sobrenadante del cultivo celular de células transfectadas que expresan las construcciones de anticuerpo biespecíficas específicas entre especies. Los histogramas rellenos reflejan los controles negativos. Se usó el sobrenadante de células CHO no transfectadas como control negativo. Para cada construcción de cadena única biespecífica específica entre especies, la superposición de los histogramas muestra la unión específica de la construcción a CD33 humano y de macaco y CD3 humano y de macaco.

Figura 61

50 Los diagramas muestran los resultados de ensayos de liberación de cromo que miden la actividad citotóxica inducida por construcciones de cadena única específicas de CD33 específicas entre especies designadas redirigidas a las líneas celulares diana indicadas. También se usaron células efectoras como se indica. Los ensayos se realizan como se describe en el Ejemplo 36.3. Los diagramas demuestran claramente, para cada construcción, el reclutamiento potente de la actividad citotóxica de células efectoras humanas y de macaco frente a células CHO transfectadas con CD33 humano y de macaco, respectivamente.

Figura 62

55 Redistribución de células T en un chimpancé bajo una infusión en bolo intravenoso semanal con PBS/5 % de HSA y PBS/5 % de HSA más la construcción de anticuerpo biespecífico EpCAM/CD3 de cadena única a las dosis de 1,6,

2,0, 3,0 y 4,5 µg/kg. El tiempo de infusión para cada administración en bolo fue 2 horas. Las flechas verticales indican el inicio de las infusiones en bolo. Los puntos de datos al comienzo de cada administración en bolo muestran los recuentos de células T inmediatamente antes del inicio de la infusión en bolo. Cada infusión en bolo de la construcción de anticuerpo biespecífico EpCAM/CD3 de cadena única, que reconoce un epítipo de CD3 dependiente de contexto convencional, desencadenó un episodio de redistribución de células T seguido de la recuperación de las células T hasta los valores de la línea base antes de la siguiente infusión en bolo.

Figura 63

Análisis por ELISA específico de CD3 de preparaciones periplásmicas que contienen fragmentos de proteína scFv etiquetados con Flag de clones seleccionados. Se añadieron preparaciones periplásmicas de fragmentos de proteína scFv solubles a los pocillos de una placa de ELISA, que se habían recubierto con la proteína de fusión CD3 épsilon humano soluble (aa 1-27)-Fc y que se habían bloqueado adicionalmente con PBS 3 % de BSA. La detección se realizó por un anticuerpo monoclonal anti Flag marcado con Biotina seguido de Estreptavidina conjugada con peroxidasa. El ELISA se reveló con una disolución de sustrato ABTS. Los valores de DO (eje de las y) se midieron a 405 nm con un lector de ELISA. Los nombres de los clones se presentan en el eje de las x.

Figura 64

Análisis por ELISA de preparaciones periplásmicas que contienen fragmentos de proteína scFv etiquetados con Flag de clones seleccionados. Se añadieron las mismas preparaciones periplásmicas de fragmentos de proteína scFv solubles que en la Figura 63 a los pocillos de una placa de ELISA que no se habían recubierto con la proteína de fusión CD3 épsilon humano (aa 1-27)-Fc sino con hulG1 (Sigma) y se habían bloqueado con 3 % de BSA en PBS.

La detección se realizó por un anticuerpo monoclonal anti Flag marcado con Biotina seguido de Estreptavidina conjugada con peroxidasa. El ELISA se reveló con una disolución de sustrato ABTS. Los valores de DO (eje de las y) se midieron a 405 nm con un lector de ELISA. Los nombres de los clones se presentan en el eje de las x.

Figura 65

Análisis por FACS de la unión de construcciones de cadena única biespecíficas específicas entre especies designadas a células CHO transfectadas con CD44 humano, la línea de células T CD3+ humana HPB-ALL, células CHO transfectadas con CD44 de macaco y la línea de células T de macaco 4119 LnPx, respectivamente. Se usaron células CHO transfectadas con CD44delv6 humano como control para enfatizar la especificidad de las construcciones de cadena única biespecíficas específicas entre especies designadas a CD44. La tinción para FACS se realiza como se describe en el Ejemplo 39.3. Las líneas en negrita representan células incubadas con sobrenadante de células que contienen la construcción de cadena única biespecífica. Los histogramas rellenos reflejan los controles negativos. Se usó el sobrenadante de células CHO no transfectadas como control negativo para la unión a las líneas de células T. Una construcción de cadena única con especificidad de diana irrelevante se usó como control negativo para la unión a las células CHO transfectadas con CD44 y CD44delv6. Para cada construcción de cadena única biespecífica específica entre especies, la superposición de los histogramas muestra la unión específica de la construcción a CD44 humano y de macaco y CD3 humano y de macaco. La superposición de los histogramas para cada construcción muestra ausencia de unión específica a las células CHO transfectadas con CD44delv6 humano.

Figura 66

Actividad citotóxica inducida por construcciones de cadena única específicas de CD44 específicas entre especies designadas redirigidas a las líneas celulares diana indicadas. También se usaron células efectoras y relación efector a diana como se indica. El ensayo se realiza como se describe en el Ejemplo 39.4. Los diagramas demuestran claramente la potencia de la mediación de la citotoxicidad por cada una de las construcciones biespecíficas.

Figura 67

Análisis por FACS de la unión de construcciones de cadena única biespecíficas específicas entre especies designadas como se describe en el Ejemplo 41.

Figura 68

Actividad citotóxica inducida por moléculas de unión específicas entre especies designadas como se describe en el Ejemplo 41.

La presente invención se describe adicionalmente mediante los siguientes ejemplos ilustrativos no limitativos que proporcionan una mejor comprensión de la presente invención y de sus numerosas ventajas.

EJEMPLOS

1. Identificación de secuencias de CD3épsilon de muestras de sangre de primates no humanos

Se usaron muestras de sangre de los siguientes primates no humanos para la identificación de CD3épsilon: *Callithrix jacchus*, *Saguinus oedipus* y *Saimiri sciureus*. Se prepararon muestras de sangre completa tratadas con heparina frescas para el aislamiento del ARN celular total según el protocolo del fabricante (QIAamp RNA Blood Mini Kit, Qiagen). El ARNm extraído se transcribió en ADNc según protocolos publicados. Brevemente, se incubaron 10 µl de ARN precipitado con 1,2 µl de mezcla de hexanucleótidos 10x (Roche) a 70 °C durante 10 minutos y se almacenó en hielo. Se añadió una mezcla de reacción que consistió en 4 µl de tampón superscript II 5x, 0,2 µl de ditiotretol 0,1M, 0,8 µl de superscript II (Invitrogen), 1,2 µl de desoxirribonucleósidos trifosfato (25 µM), 0,8 µl de Inhibidor de ARNasa (Roche) y 1,8 µl de agua sin ADNasa ni ARNasa (Roth). La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos seguido de incubación a 42 °C durante 50 minutos y a 90 °C durante 5 minutos. La reacción se enfrió en hielo antes de añadir 0,8 µl de ARNasaH (1 U/µl, Roche) y se incubó durante 20 minutos a 37 °C.

Los ADNc de primera cadena de cada especie se sometieron a reacciones en cadena de la polimerasa de 35 ciclos separadas usando ADN polimerasa Taq (Sigma) y la siguiente combinación de cebadores diseñada en una búsqueda de bases de datos: cebador directo 5'-AGAGTTCTGGGCTCTGC-3' (SEQ ID NO: 377); cebador inverso 5'-CGGATGGGCTCATAGTCTG-3' (SEQ ID NO: 378). Las bandas de 550 pb amplificadas se purificaron en gel (Kit de Extracción de Geles, Qiagen) y se secuenciaron (Sequiseve, Vaterstetten/Alemania, véase el listado de secuencias).

CD3 épsilon de *Callithrix jacchus*

Nucleótidos

CAGGACGGTAATGAAGAAATGGGTGATACTACACAGAACCCATATAAAGTTTCCATCTCAGG
 AACCACAGTAACACTGACATGCCCTCGGTATGATGGACATGAAATAAAATGGCTCGTAAATA
 GTCAAACAAAGAAGGTCATGAGGACCACCTGTTACTGGAGGACTTTTCGGAAATGGAGCAA
 AGTGGTTATTATGCCTGCCTCTCCAAAGAGACTCCCGCAGAAGAGGCGAGCCATTATCTCTA
 CCTGAAGGCAAGAGTGTGTGAGAACTGCGTGGAGGTGGAT

Aminoácidos

QDNEEMGDTTQNPYKVSISGTTVTLTCPRYDGHEIKWLVNSQNKEGHEDHLLLEDFSEMEQ
 20 SGYYACLKETPAEEASHYLYLKARVCENCVEVD

CD3épsilon de *Saguinus oedipus*

Nucleótidos

CAGGACGGTAATGAAGAAATGGGTGATACTACACAGAACCCATATAAAGTTTCCATCTCAGG
 AACCACAGTAACACTGACATGCCCTCGGTATGATGGACATGAAATAAAATGGCTTGTAAATA
 GTCAAACAAAGAAGGTCATGAGGACCACCTGTTACTGGAGGATTTTCGGAAATGGAGCAA
 AGTGGTTATTATGCCTGCCTCTCCAAAGAGACTCCCGCAGAAGAGGCGAGCCATTATCTCTA
 CCTGAAGGCAAGAGTGTGTGAGAACTGCGTGGAGGTGGAT

Aminoácidos

QDNEEMGDTTQNPYKVSISGTTVTLTCPRYDGHEIKWLVNSQNKEGHEDHLLLEDFSEMEQ
 25 SGYYACLKETPAEEASHYLYLKARVCENCVEVD

CD3épsilon de *Saimiris ciureus*

Nucleótidos

CAGGACGGTAATGAAGAGATTGGTGATACTACCCAGAACCCATATAAAGTTTCCATCTCAGG
 AACCACAGTAACACTGACATGCCCTCGGTATGATGGACAGGAAATAAAATGGCTCGTAAATG
 ATCAAACAAAGAAGGTCATGAGGACCACCTGTTACTGGAAGATTTTCAGAAATGGAACAA
 AGTGGTTATTATGCCTGCCTCTCCAAAGAGACCCACAGAAGAGGCGAGCCATTATCTCTA
 CCTGAAGGCAAGAGTGTGTGAGAACTGCGTGGAGGTGGAT

Aminoácidos

QDGNEEIGDTTQNPYKVSISGTTVTLTTCPRYDGQEIKWLVNDQNKEGHEDHLLLEDFSEMEQ
SGYYACLKSKETPTEEASHYLYLKARVCENCVEVD

2. Generación de fragmentos de anticuerpo de cadena única (scFv) específico entre especies que se unen a los aminoácidos 1-27 N-terminales de CD3épsilon de ser humano y de diferentes primates distintos del chimpancé

2.1. Inmunización de ratones usando el extremo N de CD3épsilon separado de su contexto en CD3 nativo por fusión con una proteína heteróloga soluble

Se inmunizaron ratones F1 de diez semanas de cruces balb/c x C57black con la proteína de fusión CD3épsilon-Fc que portaba los aminoácidos 1-27 más N-terminales de la cadena CD3épsilon madura (1-27 CD3-Fc) de ser humano y/o de *Saimiris sciureus*. Para este propósito, se inyectaron 40 µg de la proteína de fusión 1-27 CD3-Fc con 10 nmoles de un Oligonucleótido CpG modificado con tioato (5'-tccatgacgttcctgatgct-3') en 300 µl de PBS por ratón intraperitonealmente. Los ratones recibieron inmunizaciones de refuerzo después de 21, 42 y opcionalmente 63 días de la misma manera. Diez días después de la primera inmunización de refuerzo, se tomaron muestras de sangre y se ensayó la titulación de anticuerpo en suero frente a la proteína de fusión 1-27 CD3-Fc por ELISA. Adicionalmente, se ensayó la titulación frente a la línea de células T humana positiva para CD3 HPBall en citometría de flujo según protocolos estándar. Las titulaciones en suero fueron significativamente mayores en los animales inmunizados que en los no inmunizados.

2.2. Generación de una biblioteca de scFv de anticuerpo murino inmune: Construcción de una biblioteca de anticuerpos combinatoria y exposición en fago

Tres días después de la última inyección, se recogieron las células de bazo murino para la preparación de ARN total según protocolos estándar.

Se construyó una biblioteca de fragmentos de ADN de región variable de cadena ligera (kappa) (VK) de inmunoglobulina (Ig) murina y región variable de cadena pesada de Ig (VH) por RT-PCR en ARN de bazo murino usando cebador específico de VK y VH. El ADNc se sintetizó según protocolos estándar.

Los cebadores se diseñaron de manera que dieron lugar a un sitio de reconocimiento 5'-XhoI y 3'-BstEII para los fragmentos V de cadena pesada amplificados y a un sitio de reconocimiento 5'-SaclI y 3'-SpeI para los fragmentos de ADN de VK amplificados.

Para la amplificación por PCR de los fragmentos de ADN de VH, se combinaron cada uno de ocho cebadores específicos diferentes de la familia 5'-VH (MVH1(GC)AG GTG CAG CTC GAG GAG TCA GGA CCT; MVH2 GAG GTC CAG CTC GAG CAG TCT GGA CCT; MVH3 CAG GTC CAA CTC GAG CAG CCT GGG GCT; MVH4 GAG GTT CAG CTC GAG CAG TCT GGG GCA; MVH5 GA(AG) GTG AAG CTC GAG GAG TCT GGA GGA; MVH6 GAG GTG AAG CTT CTC GAG TCT GGA GGT; MVH7 GAA GTG AAG CTC GAG GAG TCT GGG GGA; MVH8 GAG GTT CAG CTC GAG CAG TCT GGA GCT) con un cebador 3'-VH (3'MuVHBstEII tga gga gac ggt gac cgt ggt ccc ttg gcc cca g); para la amplificación por PCR de los fragmentos de la cadena VK, se combinaron cada uno de siete cebadores específicos diferentes de la familia 5'-VK (MUVK1 CCA GTT CCG AGC TCG TTG TGA CTC AGG AAT CT; MUVK2 CCA GTT CCG AGC TCG TGT TGA CGC AGC CGC CC; MUVK3 CCA GTT CCG AGC TCG TGC TCA CCC AGT CTC CA; MUVK4 CCA GTT CCG AGC TCC AGA TGA CCC AGT CTC CA; MUVK5 CCA GAT GTG AGC TCG TGA TGA CCC AGA CTC CA; MUVK6 CCA GAT GTG AGC TCG TCA TGA CCC AGT CTC CA; MUVK7 CCA GTT CCG AGC TCG TGA TGA CAC AGT CTC CA) con un cebador 3'-VK (3'MuVkJHindIII/BsiW1 tgg tgc act agt cgt acg ttt gat ctc aag ctt ggt ccc).

El siguiente programa de PCR se usó para la amplificación: desnaturalización a 94 °C durante 20 seg; hibridación de los cebadores a 52 °C durante 50 seg y extensión de los cebadores a 72 °C durante 60 seg y 40 ciclos, seguido de una extensión final de 10 min a 72 °C.

Se ligaron 450 ng de los fragmentos de la cadena ligera kappa (digeridos con SaclI-SpeI) con 1.400 ng del fagémido pComb3H5Bhis (digerido con SaclI-SpeI; fragmento grande). La biblioteca de anticuerpos combinatoria resultante se transformó entonces en 300 µl de células *Escherichia coli* XL1 Blue electrocompetentes por electroporación (2,5 kV, cubeta con 0,2 cm de separación, 25 µFD, 200 Ohm, pulsador génico Biorad) dando como resultado una biblioteca con un tamaño de más de 10⁷ clones independientes. Después de una hora de la expresión fenotípica, los transformantes positivos se seleccionaron por resistencia a carbenicilina codificada por el vector pComb3H5Bhis en 100 ml de cultivo en súper caldo (SB) líquido toda la noche. Las células se recogieron entonces por centrifugación y se llevó a cabo la preparación de plásmidos usando un kit de preparación de plásmidos disponible comercialmente (Qiagen).

Se ligaron 2.800 ng de este ADN plasmídico que contenía la biblioteca de VK (digerido con XhoI-BstEII; fragmento grande) con 900 ng de los fragmentos V de cadena pesada (digerido con XhoI-BstEII) y se transformó de nuevo en

dos partes alícuotas de 300 μ l de células *E. coli* XL1 Blue electrocompetentes por electroporación (2,5 kV, cubeta con 0,2 cm de separación, 25 μ FD, 200 Ohm) dando como resultado una biblioteca de VH-VK scFv (fragmento variable de cadena única) con un tamaño total de más de 10^7 clones independientes.

5 Después de la expresión fenotípica y la adaptación lenta a carbenicilina, las células de *E. coli* que contenían la biblioteca de anticuerpos se transfirieron a medio de selección SB-Carbenicilina (50 μ g/ml). Las células de *E. coli* que contenían la biblioteca de anticuerpos se infectaron entonces con una dosis infecciosa de 10^{12} partículas de fago auxiliar VCSM13 dando como resultado la producción y secreción de fago filamentoso M13, en donde la partícula de fago contiene ADN de pComb3H5BHis monocatenario que codifica un fragmento scFv murino y presentaba la proteína scFv correspondiente como una fusión de traducción con la proteína de cubierta del fago III. Este conjunto de fagos
10 que presentan la biblioteca de anticuerpos se usó más tarde para la selección de entidades de unión a antígeno.

2.3. Selección basada en exposición en fagos de agentes de unión específicos de CD3

La biblioteca de fagos que portaba el repertorio de scFv clonado se recogió del sobrenadante del cultivo correspondiente por precipitación con PEG8000/NaCl y centrifugación. Aproximadamente 10^{11} a 10^{12} partículas de fago scFv se resuspendieron en 0,4 ml de PBS/0.1 % de BSA y se incubaron con 10^5 a 10^7 células Jurkat (una línea de células T humana positiva para CD3) durante 1 hora en hielo con agitación lenta. Estas células Jurkat se crecieron previamente en medio RPMI enriquecido con suero fetal de ternera (10 %), glutamina y penicilina/estreptomicina, se recogieron por centrifugación, se lavaron en PBS y se resuspendieron en PBS/1 % de FCS (que contenía Azida Na). Los fagos scFv que no se unen específicamente a las células Jurkat se eliminaron mediante hasta cinco etapas de lavado con PBS/1 % de FCS (que contenía Azida Na). Después de lavar, las entidades de unión se eluyeron de las células mediante la resuspensión de las células en HCl-glicina pH 2,2 (incubación de 10 min con vórtex posterior) y, después de neutralizar con Tris 2 M pH 12, el eluato se usó para la infección de un cultivo fresco de *E. coli* XL1 Blue no infectadas (DO600 > 0,5). El cultivo de *E. coli* que contenía células de *E. coli* que se habían transducido con éxito con una copia del fagémido, que codifica un fragmento scFv humano, se seleccionaron de nuevo por resistencia a carbenicilina y se infectaron posteriormente con el fago auxiliar VCMS 13 para iniciar la segunda ronda de presentación de anticuerpo y selección in vitro. Normalmente, se llevó a cabo un total de 4 a 5 rondas de selecciones.
25

2.4. Cribado de agentes de unión específicos de CD3

Se aisló ADN plasmídico correspondiente a 4 y 5 rondas de reconocimiento y selección de los cultivos de *E. coli* después de la selección. Para la producción de proteína scFv soluble, se escindieron fragmentos de ADN de VH-VL de los plásmidos (XhoI-SpeI). Estos fragmentos se clonaron mediante los mismos sitios de restricción en el plásmido pComb3H5BFlag/His, que se diferencia del pComb3H5BHis original en que la construcción de expresión (p. ej., scFv) incluye una etiqueta Flag (TGD YKDDDDK) entre el scFv y la etiqueta His6 y se delecionaron las proteínas de fago adicionales. Después de la ligación, cada combinado (diferentes rondas de reconocimiento y selección) de ADN plasmídico se transformó en 100 μ l de *E. coli* TG1 o XLI blue competentes por choque térmico y se sembró en placas en agar LB con carbenicilina. Se tomaron colonias únicas en 100 μ l de LB carb (50 μ g/ml).
30

35 Las *E. coli* transformadas con pComb3H5BHis que contienen un segmento VL y VH producen scFv soluble en cantidades suficientes después de la escisión del fragmento del gen III e inducción con IPTG 1 mM. Debido a una secuencia señal adecuada, la cadena scFv se exportó al periplasma donde se pliega en una conformación funcional.

Se tomaron colonias bacterianas de *E. coli* TG1 únicas de las placas de transformación para preparaciones periplásmicas a pequeña escala y se crecieron en medio SB (p. ej., 10 ml) suplementado con MgCl₂ 20 mM y 50 μ g/ml de carbenicilina (y se redisolviéron en PBS (p. ej., 1 ml) después de la recogida. Mediante cuatro rondas de congelación a -70 °C y descongelación a 37 °C, la membrana exterior de las bacterias se destruyó por choque de temperatura y las proteínas periplásmicas solubles incluyendo los scFv se liberaron al sobrenadante. Después de la eliminación de las células intactas y restos celulares por centrifugación, se recogió el sobrenadante que contenía los scFv anti-CD3 humano y se usaron para un examen adicional.
40

45 2.5. Identificación de los agentes de unión específicos de CD3

La unión de los scFv aislados se ensayó por citometría de flujo en células eucariotas, que expresan en su superficie una proteína heteróloga que presenta en su extremo N los primeros 27 aminoácidos N-terminales de CD3épsilon.

Como se describe en el Ejemplo 4, los primeros 1-27 aminoácidos de la secuencia N-terminal de la cadena CD3 épsilon madura del complejo del receptor de células T humano (secuencia de aminoácidos: QDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILT) se fusionaron con el extremo N de la proteína transmembrana EpCAM de manera que el extremo N estaba localizado en la superficie exterior de la célula. Adicionalmente, se insertó un epítipo FLAG entre la secuencia N-terminal 1-27 de CD3épsilon y la secuencia de EpCAM. Este producto de fusión se expresó en células de riñón embrionario humano (HEK) y de ovario de hámster chino (CHO).
50

Se prepararon células eucariotas que presentaban los 27 aminoácidos más N-terminales de CD3épsilon maduro de otras especies de primates de la misma manera para *Saimiri sciureus* (Mono ardilla) (secuencia de aminoácidos N-terminal de CD3épsilon: QDGNEEIGDTTQNPYKVSISGTTVTLT), para *Callithrix jacchus* (secuencia de aminoácidos
55

N-terminal de CD3épsilon: QDGNEEMGDTTQNPYKVSISGTTVTLT) y para *Saguinus oedipus* (secuencia de aminoácidos N-terminal de CD3épsilon: QDGNEEMGDTTQNPYKVSISGTTVTLT).

5 Para la citometría de flujo, se incuban $2,5 \times 10^5$ células con 50 μ l de sobrenadante o con 5 μ g/ml de las construcciones purificadas en 50 μ l de PBS con 2 % de FCS. La unión de las construcciones se detectó con un anticuerpo anti-his (Anticuerpo frente a Penta-His, sin BSA, Qiagen GmbH, Hilden, FRG) a 2 μ g/ml en 50 μ l de PBS con 2 % de FCS. Como un reactivo de la segunda etapa se usó un fragmento F(ab')₂ purificado por afinidad conjugado con R-Ficoeritrina, de cabra anti-IgG de ratón (específico del fragmento Fc-gamma), diluido 1:100 en 50 μ l de PBS con 2 % de FCS (Dianova, Hamburgo, FRG). Las muestras se midieron en un FACSScan (BD biosciences, Heidelberg, FRG).

10 La unión se confirmó siempre por citometría de flujo como se describe en el párrafo anterior en células T primarias de hombre y diferentes primates (p. ej., *Saimiris sciureus*, *callithrix jacchus*, *saguinus oedipus*).

2.6. Generación de equivalentes humanos/humanizados de scFv específicos de CD3épsilon no humanos

15 La región VH del scFv anti-CD3 murino se alineó frente a secuencias de aminoácidos de la línea germinal de anticuerpos humanos. Se eligió la secuencia de VH de la línea germinal de anticuerpos humanos que tiene la homología más cercana a la VH no humana y se realizó un alineamiento directo de las dos secuencias de aminoácidos. Hubo un número de residuos marco de VH no humana que se diferenciaron de las regiones marco de VH humana ("diferentes posiciones marco"). Algunos de estos residuos pueden contribuir a la unión y actividad del anticuerpo con su diana.

20 Para construir una biblioteca que contenga las CDR murinas y en cada posición marco que se diferencia de la secuencia de VH humana elegida ambas posibilidades (el residuo de aminoácido humano y el murino maternal), se sintetizaron oligonucleótidos degenerados. Estos oligonucleótidos incorporan en las posiciones que se diferencian el residuo humano con una probabilidad del 75 % y y el residuo murino con una probabilidad del 25 %.

Para una VH humana, p. ej., había que sintetizar seis de estos oligonucleótidos que se superpongan en una cadena terminal de aproximadamente 20 nucleótidos. Para este propósito, cada segundo cebador fue un cebador antisentido. Los sitios de restricción necesarios para la clonación posterior en los oligonucleótidos se delecionaron.

25 Estos cebadores pueden tener una longitud de 60 a 90 nucleótidos, dependiendo del número de cebadores que fueron necesarios para abarcar la secuencia V completa.

30 Estos, p. ej., seis cebadores se mezclaron en cantidades iguales (p. ej., 1 μ l de cada cebador (preparaciones madre de cebadores 20 a 100 μ M) para una reacción de PCR de 20 μ l) y se añadieron a una mezcla de PCR que consistía en tampón de PCR, nucleótidos y Taq polimerasa. Esta mezcla se incubó a 94 °C durante 3 minutos, 65 °C durante 1 minuto, 62°C durante 1 minuto, 59 °C durante 1 minuto, 56 °C durante 1 minuto, 52 °C durante 1 minuto, 50 °C durante 1 minuto y a 72°C durante 10 minutos en un ciclador de PCR. Posteriormente, el producto se corrió en una electroforesis en gel de agarosa y el producto con un tamaño de 200 a 400 se aisló del gel según métodos estándar.

35 Este producto de PCR se usó entonces como un molde para una reacción estándar de PCR usando cebadores que incorporan sitios de restricción de clonación N-terminales y C-terminales adecuados. El fragmento de ADN del tamaño correcto (para una VH aproximadamente 350 nucleótidos) se aisló por electroforesis en gel de agarosa según métodos estándar. De esta manera, se amplificó suficiente fragmento de ADN de VH. Este fragmento de VH era ahora un combinado de fragmentos de VH que tenía cada uno una cantidad diferente de residuos humanos y murinos en las respectivas posiciones marco diferenciales (combinado de VH humanizada). El mismo procedimiento se realizó para la región VL del scFv anti-CD3 murino (combinado de VL humanizada).

40 El combinado de VH humanizada se combinó entonces con el combinado de VL humanizada en el vector de exposición en fago pComb3H5Bhis para formar una biblioteca de scFv funcionales de la que - después de la exposición en fago filamentoso - se seleccionaron agentes de unión anti-CD3, se cribaron, se identificaron y se confirmaron como se ha descrito anteriormente para el scFv anti-CD3 no humano parental (murino). Se analizaron entonces clones únicos para determinar propiedades favorables y secuencia de aminoácidos. Se prefieren particularmente aquellos scFv que tenían una mayor homología en la secuencia de aminoácidos respecto a los segmentos V de la línea germinal humana, aquellos en los que al menos una CDR entre CDR I y II de VH y CDR I y II de VLkappa o CDR I y II de VLlambda muestra más del 80 % de identidad en la secuencia de aminoácidos con la CDR respectiva más cercana de todos los segmentos V de la línea germinal humana. Los scFv anti-CD3 se convirtieron en anticuerpos de cadena única biespecíficos recombinantes como se describe en los siguientes Ejemplos 10 y 16 y se caracterizaron adicionalmente.

50 3. Generación de una proteína de fusión recombinante de los aminoácidos 1-27 N-terminales de la cadena CD3 épsilon humana fusionados con la parte Fc de una IgG1 (1-27 CD3-Fc).

3.1. Clonación y expresión de 1-27 CD3-Fc

55 La secuencia codificadora de los aminoácidos 1-27 N-terminales de la cadena CD3 épsilon humana fusionados con la región bisagra y Fc gamma de inmunoglobulina IgG1 humana, así como una etiqueta de 6 Histidinas se obtuvieron por síntesis génica según protocolos estándar (la secuencia de ADNc y la secuencia de aminoácidos de la proteína

de fusión recombinante se listan como SEQ ID NOs 350 y 349). El fragmento de la síntesis génica se diseñó de manera que contuviera en primer lugar un sitio Kozak para la expresión de la construcción en eucariotas, seguido por un péptido líder de inmunoglobulina de 19 aminoácidos, seguido en marco por la secuencia codificadora de los primeros 27 aminoácidos de la parte extracelular de la cadena CD3 épsilon humana madura, seguido en marco por la secuencia codificadora de la región bisagra y la parte Fc gamma de IgG1 humana, seguido en marco por la secuencia codificadora de una etiqueta de 6 Histidinas y un codón de parada (Figura 1). El fragmento de la síntesis génica también se diseñó para introducir sitios de restricción al comienzo y al final del ADNc que codifica la proteína de fusión. Los sitios de restricción introducidos, EcoRI en el extremo 5' y Sall en el extremo 3', se utilizan en los siguientes procedimientos de clonación. El fragmento de la síntesis génica se clonó mediante EcoRI y Sall en un plásmido designado pEF-DHFR (pEF-DHFR se describe en Mack et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995) 7021-7025) siguiendo protocolos estándar. Se usó un plásmido con secuencia verificada para la transfección en el Sistema de Expresión FreeStyle 293 (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Alemania) según el protocolo del fabricante. Después de 3 días, los sobrenadantes de los cultivos celulares de los transfectantes se recogieron y se ensayaron para determinar la presencia de la construcción recombinante en un ensayo ELISA. Se diluyó anticuerpo específico del fragmento Fc gamma, anti-IgG humana de cabra (obtenido de Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Newmarket, Suffolk, Reino Unido) en PBS hasta 5 µg/ml y se utilizó para recubrir con 100 µl por pocillo en una placa ELISA de 96 pocillos MaxiSorp (Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Alemania) toda la noche a 4 °C. Los pocillos se lavaron con PBS con 0,05 % de Tween 20 (PBS/Tween y se bloquearon con 3 % de BSA en PBS (Albúmina bovina, fracción V, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Alemania) durante 60 minutos a temperatura ambiente (RT). Posteriormente, los pocillos se lavaron de nuevo con PBS/Tween y después se incubaron con sobrenadantes de los cultivos celulares durante 60 minutos a RT. Después de lavar, los pocillos se incubaron con un anticuerpo anti-His6 conjugado con peroxidasa (Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, Mannheim, Alemania) diluido 1:500 en PBS con 1 % de BSA durante 60 minutos a RT. Posteriormente, los pocillos se lavaron con 200 µl de PBS/Tween y se añadieron 100 µl de la disolución del sustrato SIGMAFAST OPD (SIGMAFAST OPD [Dihidrocloruro de o-fenilendiamina] (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Alemania) según el protocolo del fabricante. La reacción se paró mediante la adición de 100 µl de H₂SO₄ 1 M. El color de la reacción se midió en un espectrofotómetro de microplacas PowerWaveX (BioTek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, EEUU) a 490 nm y resta de la absorción del fondo a 620 nm. Como se muestra en la Figura 2, la presencia de la construcción, comparado con el sobrenadante irrelevante de células HEK 293 con transfección simulada usado como control negativo, fue claramente detectable.

3.2. Ensayo de la unión de anticuerpos de cadena única específicos entre especies a 1-27 CD3-Fc.

La unión de preparaciones crudas de anticuerpos de cadena única específicos entre especies expresados periplasmáticamente específicos para CD3 épsilon a 1-27 CD3-Fc se ensayó en un ensayo ELISA. Se diluyó anticuerpo específico del fragmento Fc gamma, anti-IgG humana de cabra (obtenido de Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Newmarket, Suffolk, Reino Unido) en PBS hasta 5 µg/ml y se utilizó para recubrir con 100 µl por pocillo en una placa ELISA de 96 pocillos MaxiSorp (Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Alemania) toda la noche a 4 °C. Los pocillos se lavaron con PBS con 0,05 % de Tween 20 (PBS/Tween y se bloquearon con PBS con 3 % de BSA (Albúmina bovina, fracción V, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Alemania) durante 60 minutos a RT. Posteriormente, los pocillos se lavaron con PBS/Tween y se incubaron con sobrenadantes de células que expresaban la construcción 1-27 CD3-Fc durante 60 minutos a RT. Los pocillos se lavaron con PBS/Tween y se incubaron con preparaciones crudas de anticuerpos de cadena única específicos entre especies expresados periplasmáticamente como se ha descrito anteriormente durante 60 minutos a temperatura ambiente. Después de lavar con PBS/Tween, los pocillos se incubaron con anticuerpo anti-Flag M2 conjugado con peroxidasa (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Alemania) diluido 1:10.000 en PBS con 1 % de BSA durante 60 minutos a RT. Los pocillos se lavaron con PBS/Tween y se incubaron con 100 µl de la disolución de sustrato SIGMAFAST OPD (OPD [Dihidrocloruro de o-fenilendiamina] (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Alemania) según el protocolo del fabricante. La reacción de color se paró con 100 µl de H₂SO₄ 1 M y se midió en un espectrofotómetro de microplacas PowerWaveX (BioTek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, EEUU) a 490 nm y resta de la absorción del fondo a 620 nm. Se observó una fuerte unión de los anticuerpos de cadena única humanos específicos entre especies específicos para CD3 épsilon a la construcción 1-27 CD3-Fc comparado con un anticuerpo murino de cadena única anti CD3 (Figura 3).

4. Generación de proteínas de fusión transmembrana recombinantes de los aminoácidos 1-27 N-terminales de CD3 épsilon de diferentes primates distintos del chimpancé fusionados con EpCAM de mono cynomolgus (1-27 CD3-EpCAM).

4.1. Clonación y expresión de 1-27 CD3-EpCAM

Se aisló CD3 épsilon de diferentes primates distintos del chimpancé (tití, tamarín, mono ardilla) y suido. Las secuencias codificadoras de los aminoácidos 1-27 N-terminales de la cadena CD3 épsilon madura humana, de tití común (*Callithrix jacchus*), de tamarín de cabeza de algodón (*Saguinus oedipus*), de mono ardilla común (*Saimiri sciureus*) y de suido doméstico (*Sus scrofa*; usado como control negativo) se fusionaron con el extremo N de EpCAM de cynomolgus etiquetado con Flag, se obtuvieron por síntesis génica según protocolos estándar. La secuencia de ADNc y la secuencia de aminoácidos de las proteínas de fusión recombinantes se listan como SEQ ID NOs 351 a 360). Los fragmentos de la síntesis génica se diseñaron de manera que contuvieran en primer lugar un sitio BsrGI para permitir la fusión en el marco de lectura correcto con la secuencia codificadora de un péptido líder de inmunoglobulina de 19 aminoácidos ya presente en el vector de expresión diana, que está seguido en marco por la secuencia codificadora

de los aminoácidos 1-27 N-terminales de la parte extracelular de las cadenas CD3 épsilon maduras, que está seguido en marco por la secuencia codificadora de una etiqueta Flag y seguido en marco por la secuencia codificadora de la proteína transmembrana EpCAM de cynomolgus madura (Figura 4). Los fragmentos de la síntesis génica también se diseñaron para introducir un sitio de restricción en el extremo del ADNc que codifica la proteína de fusión. Los sitios de restricción introducidos BsrGI en el extremo 5' y Sall en el extremo 3', se utilizaron en los siguientes procedimientos de clonación. Los fragmentos de la síntesis génica se clonaron entonces mediante BsrGI y Sall en un derivado del plásmido designado pEF DHFR (pEF-DHFR se describe en Mack et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995) 7021-7025), que ya contenía la secuencia codificadora del péptido líder de inmunoglobulina de 19 aminoácidos siguiendo protocolos estándar. Se usaron plásmidos con secuencia verificada para transfectar transitoriamente células 293-HEK usando el Reactivo MATra-A (IBA GmbH, Gottingen, Alemania) y 12 µg de ADN plasmídico para células 293-HEK adherentes en matraces de cultivo celular de 175 ml según el protocolo del fabricante. Después de 3 días de cultivo celular, los transfectantes se ensayaron para determinar la expresión en la superficie celular de la proteína transmembrana recombinante mediante un ensayo FACS según protocolos estándar. Para este propósito, un número de $2,5 \times 10^5$ células se incubaron con el anticuerpo anti-Flag M2 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Alemania) a 5 µg/ml en PBS con 2 % de FCS. El anticuerpo unido se detectó con un fragmento F(ab')₂ purificado por afinidad conjugado con R-Ficoeritrina, anti-IgG de ratón de cabra, específico del fragmento Fc gamma 1:100 en PBS con 2 % de FCS (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Newmarket, Suffolk, Reino Unido). Las muestras se midieron en un FACScalibur (BD biosciences, Heidelberg, Alemania). La expresión de las proteínas de fusión transmembrana recombinantes etiquetadas con Flag que consistían en EpCAM de cynomolgus y los aminoácidos 1-27 N-terminales de la cadena CD3 épsilon humana, de tití, de tamarín, de mono ardilla y de suido, respectivamente, en células transfectadas fue claramente detectable (Figura 5).

4.2. Unión de anticuerpos de cadena única anti-CD3 específicos entre especies al 1-27 CD3-EpCAM

La unión de preparaciones crudas de anticuerpos de cadena única anti CD3 específicos entre especies expresados periplasmáticamente a los aminoácidos 1-27 N-terminales de las cadenas CD3 épsilon humana, de tití, de tamarín y de mono ardilla, respectivamente, fusionados con Ep-CAM de cynomolgus se ensayó en un ensayo FACS según protocolos estándar. Para este propósito, un número de $2,5 \times 10^5$ células se incubaron con preparaciones crudas de anticuerpos de cadena única anti CD3 específicos entre especies expresados periplasmáticamente (la preparación se realizó como se ha descrito anteriormente y según protocolos estándar) y un anticuerpo de cadena única murino anti-CD3 humano como control negativo. Se usó un anticuerpo secundario, el anticuerpo frente a Penta-His (Qiagen GmbH, Hildesheim, Alemania) a 5 µg/ml en 50 µl de PBS con 2 % de FCS. La unión del anticuerpo se detectó con un fragmento F(ab')₂ purificado por afinidad conjugado con R-Ficoeritrina, anti-IgG de ratón de cabra, específico del fragmento Fc gamma, diluido 1:100 en PBS con 2 % de FCS (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Newmarket, Suffolk, Reino Unido). Las muestras se midieron en un FACScalibur (BD biosciences, Heidelberg, Alemania). Como se muestra en las Figuras 6 (A a E), se observó la unión de anticuerpos de cadena única a los transfectantes que expresaban las proteínas de fusión transmembrana recombinantes que consistían en los aminoácidos 1-27 N-terminales de CD3 épsilon humana, de tití, de tamarín o de mono ardilla fusionados con EpCAM de cynomolgus. No se observó la unión de anticuerpos de cadena única específicos entre especies a una proteína de fusión que consistía en los aminoácidos 1-27 N-terminales de CD3 épsilon de suido fusionados con EpCAM de cynomolgus usada como control negativo. Se mostró la especificidad entre especies en múltiples primates de los anticuerpos de cadena única anti-CD3. Las señales obtenidas con el anticuerpo anti Flag M2 y los anticuerpos de cadena única específicos entre especies fueron comparables, indicando una fuerte actividad de unión de los anticuerpos de cadena única específicos entre especies a los aminoácidos 1-27 N-terminales de CD3 épsilon.

5. Análisis de la unión de anticuerpos de cadena única anti-CD3 específicos entre especies por escaneo de alanina de células de ratón transfectadas con la cadena CD3 épsilon humana y sus mutantes de alanina

5.1. Clonación y expresión de CD3 épsilon humana de tipo salvaje

La secuencia codificadora de la cadena CD3 épsilon humana se obtuvo por síntesis génica según protocolos estándar (la secuencia de ADNc y la secuencia de aminoácidos de la cadena CD3 épsilon humana se listan como SEQ ID NOS 362 y 361). El fragmento de la síntesis génica se diseñó de manera que contuviera un sitio Kozak para la expresión de la construcción en eucariotas y sitios de restricción al comienzo y al final del ADNc que codifica la CD3 épsilon humana. Los sitios de restricción introducidos EcoRI en el extremo 5' y Sall en el extremo 3', se utilizaron en los siguientes procedimientos de clonación. El fragmento de la síntesis génica se clonó entonces mediante EcoRI y Sall en un plásmido designado pEF NEO siguiendo protocolos estándar. pEF NEO se obtuvo de pEF DHFR (Mack et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995) 7021-7025) reemplazando el ADNc de DHFR con el ADNc de la resistencia a neomicina por clonación molecular convencional. Se usó un plásmido con secuencia verificada para transfectar la línea de células T murina EL4 (ATCC No. TIB-39) cultivada en RPMI con L-glutamina estabilizada suplementado con 10 % de FCS, 1 % de penicilina/estreptomicina, 1 % de HEPES, 1 % de piruvato, 1 % de aminoácidos no esenciales (todos de Biochrom AG Berlín, Alemania) a 37 °C, 95 % humedad y 7 % de CO₂. La transfección se realizó con el Reactivo de Transfección SuperFect (Qiagen GmbH, Hilden, Alemania) y 2 µg de ADN plasmídico según el protocolo del fabricante. Después de 24 horas, las células se lavaron con PBS y se cultivaron de nuevo en el medio de cultivo celular mencionado anteriormente con 600 µg/ml de G418 para la selección (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria). 16 a 20 días después de la transfección, se observó el crecimiento de células resistentes. Después de 7 a 14 días adicionales, las células se ensayaron para determinar la expresión de CD3 épsilon humano por análisis FACS

según protocolos estándar. Se incubaron $2,5 \times 10^5$ células con el anticuerpo anti-CD3 humano UCHT-1 (BD biosciences, Heidelberg, Alemania) a $5 \mu\text{g/ml}$ en PBS con 2 % de FCS. La unión del anticuerpo se detectó con un fragmento F(ab')_2 purificado por afinidad conjugado con R-Ficoeritrina, anti-IgG de ratón de cabra, específico del fragmento Fc gamma diluido 1:100 en PBS con 2 % de FCS (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Newmarket, Suffolk, Reino Unido). Las muestras se midieron en un FACSCalibur (BD biosciences, Heidelberg, Alemania). La expresión de CD3 humano de tipo salvaje en células EL4 transfectadas se muestra en la Figura 7.

5.2. Clonación y expresión de los anticuerpos de cadena única anti-CD3 específicos entre especies como anticuerpos IgG1

Con el fin de proporcionar medios mejorados de la detección de la unión de los anticuerpos de cadena única anti-CD3 específicos entre especies, H2C HLP, A2J HLP y E2M HLP se convirtieron en anticuerpos IgG1 con IgG1 murina y regiones constantes lambda humanas. Las secuencias de ADNc que codifican las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos IgG respectivos se obtuvieron por síntesis génica según protocolos estándar. Los fragmentos de la síntesis génica para cada especificidad se diseñaron de manera que contuvieran en primer lugar un sitio Kozak para permitir la expresión de la construcción en eucariotas, que está seguido por un péptido líder de inmunoglobulina de 19 aminoácidos (SEQ ID NOs 364 y 363), que está seguido en marco por la secuencia codificadora de la región variable de cadena pesada respectiva o la región variable de cadena ligera respectiva, seguido en marco por la secuencia codificadora de la región constante de cadena pesada de IgG1 murina (SEQ ID NOs 366 y 365) o la secuencia codificadora de la región constante de cadena ligera lambda humana (SEQ ID NO 368 y 367), respectivamente. Se introdujeron sitios de restricción al comienzo y al final del ADNc que codifica la proteína de fusión. Los sitios de restricción EcoRI en el extremo 5' y Sall en el extremo 3' se usaron para los siguientes procedimientos de clonación. Los fragmentos de la síntesis génica se clonaron mediante EcoRI y Sall en un plásmido designado pEF DHFR (Mack et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995) 7021-7025) para las construcciones de cadena pesada y pEF ADA (pEF ADA se describe en Raum et al., Cancer Immunol Immunother., 50(3), (2001), 141-50) para las construcciones de cadena ligera) según protocolos estándar. Se usaron plásmidos con secuencia verificada para la cotransfección de las construcciones de cadena ligera y pesada respectivas en el Sistema de Expresión FreeStyle 293 (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Alemania) según el protocolo del fabricante. Después de 3 días, los sobrenadantes de los cultivos celulares de los transfectantes se recogieron y se usaron para el experimento de escaneo de alanina.

5.3. Clonación y expresión de mutantes de alanina de CD3 épsilon humano para escaneo de alanina

Se obtuvieron por síntesis génica 27 fragmentos de ADNc que codificaban la cadena CD3 épsilon humana con un intercambio de un codón de la secuencia de tipo salvaje de CD3 épsilon humano por un codón que codificaba alanina (GCC) para cada uno de los aminoácidos 1-27 del dominio extracelular de la cadena CD3 épsilon humana madura, respectivamente. Excepto por el codón intercambiado, los fragmentos de ADNc fueron idénticos al fragmento de ADNc de CD3 humano de tipo salvaje mencionado anteriormente. Sólo se reemplazó un codón en cada construcción comparado con el fragmento de ADNc de CD3 humano de tipo salvaje descrito anteriormente. Se introdujeron los sitios de restricción EcoRI y Sall en los fragmentos de ADNc en posiciones idénticas comparado con la construcción de tipo salvaje. Todas las construcciones de escaneo de alanina se clonaron en pEF NEO y se transfectaron en células EL4 plásmidos con secuencia verificada. La transfección y selección de los transfectantes se realizó como se ha descrito anteriormente. Como resultado, se obtuvo un panel de construcciones expresadas en el que el primer aminoácido de la cadena CD3 épsilon humana, glutamina (Q, Gln) en la posición 1, se reemplazó por alanina. El último aminoácido reemplazado por alanina fue la treonina (T, Thr) en la posición 27 de CD3 épsilon humana de tipo salvaje madura. Para cada aminoácido entre la glutamina 1 y la treonina 27, se generaron transfectantes respectivos con un intercambio del aminoácido de tipo salvaje con alanina.

5.4. Experimento de escaneo de alanina

Se ensayaron anticuerpos IgG quiméricos como se describe en 2) y anticuerpos de cadena única específicos entre especies específicos para CD3 épsilon en un experimento de escaneo de alanina. La unión de los anticuerpos a las líneas celulares EL4 transfectadas con las construcciones de mutante de alanina de CD3 épsilon humana como se describe en 3) se ensayó por ensayo FACS según protocolos estándar. Se incubaron $2,5 \times 10^5$ células de los transfectantes respectivos con $50 \mu\text{l}$ de sobrenadante del cultivo celular que contenía los anticuerpos IgG quiméricos o con $50 \mu\text{l}$ de preparaciones crudas de anticuerpos de cadena única expresados periplasmáticamente. Para las muestras incubadas con preparaciones crudas de los anticuerpos de cadena única expresados periplasmáticamente, se usó el anticuerpo anti-Flag M2 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Alemania) como anticuerpo secundario a $5 \mu\text{g/ml}$ en $50 \mu\text{l}$ de PBS con 2 % de FCS. Para las muestras incubadas con los anticuerpos IgG quiméricos, no fue necesario un anticuerpo secundario. Para todas las muestras, la unión de las moléculas de anticuerpo se detectó con un fragmento F(ab')_2 purificado por afinidad conjugado con R-Ficoeritrina, anti-IgG de ratón de cabra, específico del fragmento Fc específico diluido 1:100 en PBS con 2 % de FCS (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Newmarket, Suffolk, Reino Unido). Las muestras se midieron en un FACSCalibur (BD biosciences, Heidelberg, Alemania). Se detectó la unión diferencial de moléculas de IgG quiméricas o anticuerpos de cadena única específicos entre especies a las líneas celulares EL4 transfectadas con los mutantes de alanina de CD3 épsilon humana. Como control negativo, se usó bien un control de isotipo o una preparación cruda de un anticuerpo de cadena única expresado periplasmáticamente con una especificidad irrelevante, respectivamente. El anticuerpo UCHT-1 se usó como control positivo para determinar el nivel de expresión de los mutantes de alanina de CD3 épsilon humana. Las líneas celulares

EL4 transfectadas con los mutantes de alanina para los aminoácidos tirosina en la posición 15, valina en la posición 17, isoleucina en la posición 19, valina en la posición 24 o leucina en la posición 26 de la cadena CD3 épsilon madura no se evaluaron debido a unos niveles de expresión muy bajos (datos no mostrados). La unión de los anticuerpos de cadena única específicos entre especies y los anticuerpos de cadena única en el formato de IgG quimérica a las líneas celulares EL4 transfectadas con los mutantes de alanina de CD3 épsilon humana se muestra en la Figura 8 (A-D) como unión relativa en unidades arbitrarias con los valores de la media geométrica de la fluorescencia de los controles negativos respectivos sustraídos de todos los valores de la media geométrica de la fluorescencia de las muestras respectivos. Para compensar respecto a los diferentes niveles de expresión, todos los valores de las muestras para un determinado transfectante se dividieron entonces por el valor de la media geométrica de la fluorescencia del anticuerpo UCHT-1 para el transfectante respectivo. Para la comparación con el valor de la muestra de tipo salvaje de una especificidad, todos los valores de las muestras de la especificidad respectiva se dividieron finalmente por el valor de la muestra de tipo salvaje, ajustando de esta manera el valor de la muestra de tipo salvaje a 1 unidad arbitraria de unión.

Los cálculos usados se muestran con detalle en la siguiente fórmula:

$$\text{valor_Muestra (x,y)} = \frac{\text{Muestra(x,y)-Contr.}_{neg}(x)}{(\text{UCHT-1}(x) - \text{Contr.}_{neg}(x)) * \frac{\text{WT}(y) - \text{Contr.}_{neg}(wt)}{\text{UCHT-1}(wt) - \text{Contr.}_{neg}(wt)}}$$

En esta ecuación, *valor_Muestra* significa el valor en unidades arbitrarias de la unión representando el grado de unión de un anticuerpo anti-CD3 específico a un mutante de alanina específico, como se muestra en la Figura 8 (A-D), *Muestra* significa el valor de la media geométrica de la fluorescencia obtenido para un anticuerpo anti-CD3 específico ensayado en un transfectante de escaneo de alanina específico, *Contr. negK*, significa el valor de la media geométrica de la fluorescencia obtenido para el control negativo ensayado en un mutante de alanina específico, *UCHT-1* significa el valor de la media geométrica de la fluorescencia obtenido para el anticuerpo UCHT-1 ensayado en un mutante de alanina específico, *WT* significa el valor de la media geométrica de la fluorescencia obtenido para un anticuerpo anti-CD3 específico ensayado en el transfectante de tipo salvaje, *x* especifica el transfectante específico, *y* especifica el anticuerpo anti-CD3 respectivo y *wt* especifica que el transfectante respectivo es el de tipo salvaje.

Como puede observarse en la Figura 8 (A-D), el anticuerpo IgG A2J HLP mostró una pérdida pronunciada de la unión para los aminoácidos asparagina en la posición 4, treonina en la posición 23 e isoleucina en la posición 25 de la cadena CD3 épsilon madura. Se observó una pérdida completa de la unión del anticuerpo IgG A2J HLP para los aminoácidos glutamina en la posición 1, aspartato en la posición 2, glicina en la posición 3 y glutamato en la posición 5 de la cadena CD3 épsilon madura. El anticuerpo IgG E2M HLP mostró una pérdida pronunciada de la unión para los aminoácidos asparagina en la posición 4, treonina en la posición 23 e isoleucina en la posición 25 de la cadena CD3 épsilon madura. El anticuerpo IgG E2M HLP mostró una pérdida completa de la unión para los aminoácidos glutamina en la posición 1, aspartato en la posición 2, glicina en la posición 3 y glutamato en la posición 5 de la cadena CD3 épsilon madura. El anticuerpo IgG H2C HLP mostró una pérdida intermedia de la unión para el aminoácido asparagina en la posición 4 de la cadena CD3 épsilon madura y mostró una pérdida completa de la unión para los aminoácidos glutamina en la posición 1, aspartato en la posición 2, glicina en la posición 3 y glutamato en la posición 5 de la cadena CD3 épsilon madura. El anticuerpo de cadena única F12Q HLP mostró una pérdida esencialmente completa de la unión para los aminoácidos glutamina en la posición 1, aspartato en la posición 2, glicina en la posición 3 de la cadena CD3 épsilon madura y glutamato en la posición 5 de la cadena CD3 épsilon madura.

6. Análisis de la unión de la molécula de unión anti-CD3 específica entre especies H2C HLP a la cadena CD3 épsilon humana con y sin etiqueta His6 N-terminal transfectada en la línea de células T murina EL4

6.1. Clonación y expresión de la cadena CD3 épsilon humana con una etiqueta de seis histidinas N-terminal (etiqueta His6)

Se obtuvo por síntesis génica un fragmento de ADNc que codificaba la cadena CD3 épsilon humana con una etiqueta His6 N-terminal. El fragmento de la síntesis génica se diseñó de manera que contuviera en primer lugar un sitio Kozak para la expresión de la construcción en eucariotas, que está seguido en marco por la secuencia codificadora de un péptido líder de inmunoglobulina de 19 aminoácidos, que está seguido en marco por la secuencia codificadora de una etiqueta His6 que está seguido en marco por la secuencia codificadora de la cadena CD3 épsilon humana madura (las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la construcción se listan como SEQ ID NOs 380 y 379). El fragmento de la síntesis génica también se diseñó para contener sitios de restricción en el comienzo y el final del ADNc. Los sitios de restricción introducidos EcoRI en el extremo 5' y Sall en el extremo 3', se usaron en los siguientes procedimientos de clonación. El fragmento de la síntesis génica se clonó entonces mediante EcoRI y Sall en un plásmido designado pEF-NEO (como se ha descrito anteriormente) siguiendo protocolos estándar. Se usó un plásmido con secuencia verificada para transfectar la línea de células T murina EL4. La transfección y selección de los transfectantes se realizaron como se ha descrito anteriormente. Después de 34 días de cultivo celular, los transfectantes se usaron para el ensayo descrito a continuación.

6.2. Unión de la molécula de unión anti-CD3 específica entre especies H2C HLP a la cadena CD3 épsilon humana con y sin una etiqueta His6 N-terminal

Se ensayó un anticuerpo IgG quimérico con la especificidad de unión H2C HLP específico para CD3 épsilon para su unión a CD3 épsilon humana con y sin una etiqueta His6 N-terminal. La unión del anticuerpo a las líneas celulares EL4 transfectadas con CD3 épsilon humana con His6 y CD3 épsilon humana de tipo salvaje, respectivamente, se ensayó por un ensayo FACS según protocolos estándar. Se incubaron $2,5 \times 10^5$ células de los transfectantes con 50 μ l de sobrenadante de cultivo celular que contenía el anticuerpo IgG quimérico o 50 μ l de los anticuerpos control respectivos a 5 μ g/ml en PBS con 2 % de FCS. Como control negativo, se usó un control de isotipo apropiado y como control positivo para la expresión de las construcciones el anticuerpo específico de CD3 UCHT-1, respectivamente. La unión de los anticuerpos se detectó con un fragmento F(ab')₂ purificado por afinidad conjugado con R-Ficoeritrina, anti-IgG de ratón de cabra, específico del fragmento Fc gamma diluido 1:100 en PBS con 2 % de FCS (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Newmarket, Suffolk, Reino Unido). Las muestras se midieron en un FACSCalibur (BD biosciences, Heidelberg, Alemania). Comparado con la línea celular EL4 transfectada con CD3 épsilon humana de tipo salvaje, se detectó una pérdida clara de la unión de la IgG quimérica con especificidad de unión H2C HLP a CD3 épsilon humana con una etiqueta His6 N-terminal. Estos resultados mostraron que es esencial un extremo N libre de CD3 épsilon para la unión del H2C HLP con especificidad de unión anti-CD3 específico entre especies a la cadena CD3 épsilon humana (Figura 9).

7. Determinación de la constante de unión KD del anticuerpo de cadena única biespecífico específico entre especies para EGFR de primate y CD3 de primate (EGFR LH x H2C HLP) a la proteína de fusión 1-27 CD3-Fc por medición de Resonancia de Plasmón Superficial comparado con la unión a PBMC que expresan CD3 medido por un Separador de Células Activado por Fluorescencia (FACS)

7.1. Medición de la Resonancia de Plasmón Superficial

Para determinar la afinidad de unión al anticuerpo de cadena única biespecífico completamente específico entre especies EGFR-21-63 LH x H2C HLP a los aminoácidos 1-27 del extremo N de la cadena CD3 épsilon humana, se realizó una medición de Resonancia de Plasmón Superficial con una proteína de fusión recombinante que consistía en los aminoácidos 1-27 N-terminales de la cadena CD3 épsilon humana madura fusionados con una parte Fc de IgG1 humana (1-27 CD3-Fc). Para este propósito, se instaló un chip Biacore Carboximetil-Dextrano CM5 (Biacore, Uppsala, Suecia) en un sistema Biacore 2000® (Biacore, Uppsala, Suecia). Se activó una celda de flujo con una disolución de Hidrocloruro de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida / *N*-Hidroxisuccinimida según procedimientos estándar. Se añadió posteriormente una disolución de la proteína de fusión 1-27 CD3-Fc dando como resultado una unión covalente estable de la proteína a la capa de dextrano del chip Biacore. La proteína no unida se eliminó por lavado exhaustivo seguido por el bloqueo de los grupos carboxi activados con NHS remanentes que no habían reaccionado mediante la adición de una disolución de etanolamina. El éxito del acoplamiento de la proteína se confirmó por una señal mayor medida como Unidades de Respuesta comparada con la señal anterior al acoplamiento. Se preparó una celda de referencia como se describe, pero sin añadir una disolución de proteína.

El anticuerpo biespecífico EGFR-21-63 LH x H2C HLP purificado se dializó exhaustivamente frente a tampón HBS-EP (Biacore, Uppsala, Suecia) en una Mini Unidad de Diálisis Slide-A-Lyzer® (Pierce, Rockford-II, EEUU). La concentración de proteínas después de la diálisis se determinó por absorción UV280 nm dando como resultado una concentración de 43 μ g/ml.

La disolución de proteína se transfirió a una placa de 96 pocillos y se diluyó de forma seriada con tampón HBS-EP a una relación 1:1 a 10 pocillos adicionales.

Se realizaron mediciones de Resonancia de Plasmón Superficial mediante el muestreo separado de los 11 pocillos. Las celdas de flujo se regeneraron con tampón acetato entre las mediciones para liberar la proteína unida.

Las señales de unión de las moléculas de anticuerpo biespecíficas se obtuvieron por sustracción de la señal de la celda de referencia de la señal de la celda de medición conjugada con la proteína 1-27 CD3-Fc. Las curvas de asociación y disociación se midieron como Unidades de Respuesta y se registraron. Las constantes de la unión se calcularon usando el software de ajuste de curvas Biacore® basado en el modelo de Langmuir.

Se determinó que la constante de unión KD calculada sobre las primeras cinco concentraciones era $1,52 \times 10^{-7}$ M.

7.2. Determinación de la constante de unión a CD3 por medición FACS

Con el fin de ensayar la afinidad de las moléculas de anticuerpo biespecíficas específicas entre especies con respecto a la fuerza de la unión a CD3 humano nativo, se realizó un análisis de unión en saturación adicional por FACS. La molécula de anticuerpo biespecífica elegida EGFR-21-63 LH x H2C HLP se usó para poner a punto una fila de dilución con un factor de 1:1,5 y una concentración inicial de 63,3 μ g/ml. La molécula de anticuerpo biespecífica se incubó a estas diferentes concentraciones con $1,25 \times 10^5$ PBMC humanas cada una durante 1 hora a 4 °C seguido por dos etapas de lavado en PBS a 4 °C. La detección de las moléculas de anticuerpo biespecíficas unidas se llevó a cabo usando un anticuerpo frente a Penta-His (Qiagen GmbH, Hildesheim, Alemania) a 5 μ g/ml en 50 μ l de PBS con 2 % de FCS. Después de una incubación de 45 minutos a 4 °C y dos etapas de lavado, la unión del anticuerpo frente a

Penta-His se detectó con un fragmento F(ab')₂ purificado por afinidad conjugado con R-Ficoeritrina, anti-IgG de ratón de cabra, específico del fragmento Fc gamma diluido 1:100 en PBS con 2 % de FCS (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Newmarket, Suffolk, Reino Unido). Se realizó citometría de flujo en un aparato FACS-Canto II, se usó el software FACS Diva para adquirir y analizar los datos (Becton Dickinson biosciences, Heidelberg). La tinción para FACS y la medición de la intensidad de la fluorescencia se realizaron como se describe en Current Protocols in Immunology (Coligan, Kruisbeek, Margulies, Shevach y Strober, Wiley-Interscience, 2002). Los valores medios de la intensidad de la fluorescencia adquiridos se representaron gráficamente como una función de la concentración de la molécula de anticuerpo biespecifica usada y se analizaron con el software biomatemático Prism en un análisis de unión unilateral (hipérbola). El software calculó el valor de KD correspondiente que describía la unión de un ligando (la molécula de anticuerpo biespecifica) a un receptor (la subfracción de PBMC positivas para CD3) que sigue la ley de acción de masas. La fórmula subyacente es como sigue: $Y = B_{\text{máx}} \times X / (K_d + X)$, siendo B_{máx} la unión máxima. KD es la concentración de ligando requerida para alcanzar la mitad de la unión máxima. La tinción para FACS se llevó a cabo en duplicado, los valores de R² fueron mejores de 0,95.

La unión mitad de la máxima determinada para la molécula de anticuerpo biespecifica EGFR-21-63 LH x H2C HLP se alcanzó a una concentración de 8.472 ng/ml que corresponde a 154 nM ($1,54 \times 10^{-7}$ M) a una masa molecular dada de 55.000 Dalton (Figura 10).

Así, se probó que la afinidad de EGFR-21-63 LH x H2C HLP para los aminoácidos 1-27 N-terminales de la cadena CD3 épsilon humana separados de su contexto de CD3 nativo era igual a la afinidad de EGFR-21-63 LH x H2C HLP para CD3 nativo en células T intactas.

20 8. Generación de células CHO transfectadas con EGFR humano

La línea celular positiva para EGFR humano, A431 (línea celular de carcinoma epidermoide, CRL-1555, American Type Culture Collection, Rockville, MD) se usó para obtener el ARN total que se aisló según las instrucciones del manual del kit (Qiagen, RNeasy Mini Kit, Hilden, Alemania). El ARN obtenido se usó para la síntesis de ADNc por transcripción inversa cebada aleatoriamente. Para la clonación de la secuencia de longitud completa del antígeno EGFR humano, se usaron los siguientes oligonucleótidos:

5' EGFR AG XbaI 5'-GGTCTAGAGCATGCGACCCTCCGGGACGGCCGGG-3'

3' EGFR AG Sall 5'-TTTTAAGTCGACTCATGCTCCAATAAATTCAGTCT-3'

La secuencia codificadora se amplificó por PCR (desnaturalización a 94 °C durante 5 min, hibridación a 58 °C durante 1 min, elongación a 72 °C durante 2 min para el primer ciclo; desnaturalización a 94 °C durante 1 min, hibridación a 58 °C durante 1 min, elongación a 72 °C durante 2 min durante 30 ciclos; extensión terminal a 72 °C durante 5 min). El producto de PCR se digirió posteriormente con XbaI y Sall, se ligó en el vector de expresión digerido apropiadamente pEF-DHFR (Raum et al., Cancer Immunol. Immunother. 2001; 50: 141-150), y se transformó en E. coli. Los procedimientos mencionados anteriormente se llevaron a cabo según protocolos estándar (Sambrook, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 3ª edición, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, Nueva York (2001)). Un clon con la secuencia de nucleótidos con secuencia verificada (SEQ ID 370, secuencia de aminoácidos SEQ ID 369) se transfectó en células CHO deficientes para DHFR para la expresión de la construcción en eucariotas. La expresión de la proteína en eucariotas en células CHO deficientes para DHFR se realizó como se describe por Kaufmann R.J. (1990) Methods Enzymol. 185, 537-566. La amplificación génica de la construcción se indujo con concentraciones crecientes de metotrexato (MTX) hasta una concentración final de hasta MTX 20 nM.

40 9. Generación de células CHO que expresan el dominio extracelular de EGFR de cynomolgus

La secuencia de ADNc del dominio extracelular de EGFR de cynomolgus se obtuvo por un conjunto de dos PCR en ADNc de colon de mono cynomolgus (Cat#: C1534090-Cy-BC; obtenido de BioCat GmbH, Heidelberg, Alemania) usando las siguientes condiciones de reacción: 1 ciclo a 94 °C durante 3 minutos seguido por 35 ciclos con 94 °C durante 1 minuto, 53 °C durante 1 minuto y 72 °C durante 2 minutos seguido por un ciclo terminal de 72 °C durante 3 minutos. Se usaron los siguientes cebadores:

1. cebador directo: 5'- CGCTCTGCCGGCGAGTCGGGC -3'

cebador inverso: 5'- CCGTCTTCTCCATCTCATAGC -3'

2. cebador directo: 5'- ACATCCGGAGGTGACAGATCACGGCTCGTGC -3'

cebador inverso: 5'- CAGGATATCCGAACGATGTGGCGCCTTCGC -3'

50 Estas PCR generaron dos fragmentos superpuestos (A: 1-869, B: 848-1923), que se aislaron y secuenciaron según protocolos estándar usando los cebadores de PCR, y proporcionaron de esta manera una parte de 1923 pb de una secuencia de ADNc de EGFR de cynomolgus desde el tercer nucleótido del codón +1 de la proteína madura hasta el 21º codón del dominio transmembrana. Para generar una construcción para la expresión de EGFR de cynomolgus, se obtuvo un fragmento de ADNc por síntesis génica según protocolos estándar (la secuencia de ADNc y de

aminoácidos de la construcción se listan como SEQ Nos 372 y 371). En esta construcción, la secuencia codificadora para EGFR de cynomolgus desde el aminoácido +2 al +641 de la proteína EGFR madura se fusionó en la secuencia codificadora de EGFR humano reemplazando la secuencia codificadora de los aminoácidos +2 a +641. El fragmento de la síntesis génica también se diseñó para que contuviera un sitio Kozak para la expresión de la construcción en eucariotas y sitios de restricción al comienzo y al final del ADNc que codifica esencialmente el dominio extracelular de EGFR de cynomolgus fusionado con los dominios transmembrana e intracelular de EGFR humano. Además, se introdujo una mutación conservativa en el aminoácido 627 (4º aminoácido del dominio transmembrana) mutando valina en leucina para generar un sitio de restricción (SphI) para propósitos de clonación. Los sitios de restricción introducidos XbaI en el extremo 5' y Sall en el extremo 3', se utilizaron en los siguientes procedimientos de clonación. El fragmento de la síntesis génica se clonó entonces mediante XbaI y Sall en un plásmido designado pEF-DHFR (pEF-DHFR se describe en Mack et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995) 7021-7025). Se usó un clon con secuencia verificada de este plásmido para transfectar células CHO/dhfr- como se ha descrito anteriormente.

10. Generación de moléculas de cadena única biespecíficas para EGFR y CD3 específicas entre especies

10.1. Clonación de moléculas de unión específicas entre especies

15 Generalmente, se diseñaron moléculas de anticuerpo de cadena única biespecíficas, comprendiendo cada una un dominio con una especificidad de unión específica entre especies para CD3 épsilon humano y de primate distinto del chimpancé, así como un dominio con una especificidad de unión específica entre especies para EGFR humano y de primate distinto del chimpancé, como se muestra en la siguiente Tabla 1:

20 Tabla 1: Formatos de moléculas de anticuerpo de cadena única biespecíficas específicas entre especies anti-CD3 y anti-EGFR

SEQ ID (nucl/prot)	Formatos de construcciones de proteínas (N → C)
294/293	EGFR-21-63 LH x H2C HL
296/295	EGFR-21-63 LH x H2C HLP
302/301	EGFR-21-63 LH x A2J HLP
298/297	EGFR-21-63 LH x H1E HLP
306/305	EGFR-21-63 LH x E2M HLP
308/307	EGFR-21-63 LH x F7O HLP
864/863	EGFR-21-63 LH x I2C HL
900/899	E291 C4 HL x I2C HL
898/897	E291C4 HL x F12Q HL
896/895	E291C4 HL x H2C HL
882/881	E291H8 HL x I2C HL
918/917	E292F3 HL x I2C HL
936/935	E98H5 HL x I2C HL
932/931	E98H5 HL x H2C HL
934/933	E98H5 HL x F12Q HL
972/971	E97H9 HL x I2C HL

SEQ ID (nucl/prot)	Formatos de construcciones de proteínas (N → C)
970/969	E97H9 HL x F12Q HL
968/967	E97H9 HL x H2C HL
954/953	E98C3 HL x I2C HL
952/951	E98C3 HL x F12Q HL
950/949	E98C3 HL x H2C HL
990/989	E97B11 HL x I2C HL
988/987	E97B11 HL x F12Q HL
986/985	E97B11 HL x H2C HL
1018/1017	E12E3 HL x I2C HL
1032/1031	E12B7 HL x I2C HL
1046/1045	E12E6 HL x I2C HL
1060/1059	E12F12 HL x I2C HL
1004/1003	E13B4 HL x I2C HL
1074/1073	E13H7 HL x I2C HL
1088/1087	E13E6 HL x I2C HL
1102/1101	E13E2 HL x I2C HL

Las construcciones mencionadas anteriormente que contienen los dominios variable de cadena ligera (L) y variable de cadena pesada (H) específicas entre especies para EGFR humano y de cynomolgus se obtuvieron por síntesis génica. Los fragmentos de la síntesis génica se diseñaron de manera que contuvieran en primer lugar un sitio Kozak para la expresión de la construcción en eucariotas, seguido por un péptido líder de inmunoglobulina de 19 aminoácidos, seguido en marco por la secuencia codificadora de la molécula de anticuerpo de cadena única biespecífica respectiva, seguido en marco por la secuencia codificadora de una etiqueta de 6 histidinas y un codón de parada. El fragmento de la síntesis génica también se diseñó para introducir sitios de restricción adecuados al comienzo y al final del fragmento. Los sitios de restricción introducidos se utilizaron en los siguientes procedimientos de clonación. El fragmento de la síntesis génica también se diseñó para introducir sitios de restricción N y C-terminales adecuados. El fragmento de la síntesis génica se clonó mediante estos sitios de restricción en un plásmido designado pEF-DHFR (pEF-DHFR se describe en Raum et al. Cancer Immunol Immunother 50 (2001) 141-150) según protocolos estándar (Sambrook, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 3ª edición, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, Nueva York (2001)). Un clon con la secuencia de nucleótidos con secuencia verificada se transfirió en células de ovario de hámster chino (CHO) deficientes para dihidrofolato reductasa (DHFR) para la expresión de la construcción en eucariotas.

Las construcciones se transfectaron de forma estable o transitoria en células CHO deficientes para DHFR (ATCC No. CRL 9096) por electroporación o, alternativamente, en células HEK 293 (células de riñón embrionario humano, Número de ATCC: CRL-1573) de una manera transitoria, según protocolos estándar.

20 10.2. Expresión y purificación de las moléculas de anticuerpo de cadena única biespecíficas

Las moléculas de anticuerpo de cadena única biespecíficas se expresaron en células de ovario de hámster chino (CHO). La expresión de la proteína en eucariotas en células CHO deficientes para DHFR se realizó como se describe

5 por Kaufmann R.J. (1990) *Methods Enzymol.* 185, 537-566. La amplificación génica de las construcciones se indujo por concentraciones finales crecientes de MTX hasta 20 nM. Después de dos subcultivos del cultivo estacionario, las células se crecieron en botellas de cultivo rotatorias con medio líquido de soja HyQ PF-CHO sin nucleósidos (con L-Glutamina 4,0 mM con 0,1 % de Pluronic F - 68; HyClone) durante 7 días antes de la recogida. Las células se retiraron por centrifugación y el sobrenadante que contenía la proteína expresada se almacenó a -20 °C. Alternativamente, las construcciones se expresaron de forma transitoria en células HEK 293. La transfección se realizó con el reactivo 293fectin (Invitrogen, #12347-019) según el protocolo del fabricante.

10 Se usaron el Sistema Äkta® Explorer (GE Health Systems) y Software Unicorn® para la cromatografía. Se realizó cromatografía de afinidad con metal inmovilizado ("IMAC") usando un Fractogel EMD chelate® (Merck) que se cargó con ZnCl₂ según el protocolo proporcionado por el fabricante. La columna se equilibró con tampón A (tampón de fosfato de sodio 20 mM pH 7,2, NaCl 0,1 M) y el sobrenadante del cultivo celular (500 ml) se aplicó a la columna (10 ml) a una velocidad de flujo de 3 ml/min. La columna se lavó con el tampón A para eliminar la muestra no unida. La proteína unida se eluyó usando un gradiente de dos etapas de tampón B (tampón de fosfato de sodio 20 mM pH 7,2, NaCl 0,1 M, Imidazol 0,5 M) según lo siguiente:

15 Etapa 1: 20 % de tampón B en 6 volúmenes de columna

Etapa 2: 100 % de tampón B en 6 volúmenes de columna

Las fracciones de proteína eluida de la etapa 2 se combinaron para una purificación adicional. Todos los productos químicos fueron de grado de investigación y se adquirieron en Sigma (Deisenhofen) o Merck (Darmstadt).

20 Se realizó cromatografía de filtración en gel en una columna de grado preparativo HiLoad 16/60 Superdex 200 (GE/Amersham) equilibrada con tampón Equi (Citrato 25 mM, Lisina 200 mM, 5 % de Glicerol, pH 7,2). Las muestras de proteínas eluidas (velocidad de flujo 1 ml/min) se sometieron a SDS-PAGE estándar y transferencia Western para su detección. Antes de la purificación, la columna se calibró para la determinación del peso molecular (kit de marcadores de peso molecular, Sigma MW GF-200). Las concentraciones de proteína se determinaron usando DO280 nm.

25 La proteína de anticuerpo de cadena única biespecífica purificada se analizó en SDS PAGE en condiciones reductoras realizadas con geles preparados comercialmente de Bis Tris al 4-12 % (Invitrogen). La preparación y aplicación de la muestra se realizaron según el protocolo proporcionado por el fabricante. El peso molecular se determinó con el estándar de proteínas MultiMark (Invitrogen). El gel se tiñó con Coomassie coloidal (protocolo de Invitrogen). La pureza de la proteína aislada fue >95 % como se determina por SDS-PAGE.

30 El anticuerpo de cadena única biespecífico tiene un peso molecular de aproximadamente 52 kDa en condiciones nativas como se determina por filtración en gel en PBS. Todas las construcciones se purificaron según este método.

35 Se realizó Transferencia Western usando una membrana Optitran® BA-S83 y el Módulo de Transferencia de Invitrogen según el protocolo proporcionado por el fabricante. Los anticuerpos usados estaban dirigidos frente a la Etiqueta His (Penta His, Qiagen) y anti-Ig de ratón de cabra marcado con fosfatasa alcalina (AP) (Sigma), y BCIP/NBT (Sigma) como sustrato. Se detectó una única banda a 52 kD correspondiente al anticuerpo de cadena única biespecífico purificado.

11. Determinación de la constante de la unión KD de anticuerpos de cadena única biespecíficos completamente específicos entre especies a la proteína de fusión 1-27 CD3-Fc por medición de la Resonancia de Plasmón Superficial

40 Para determinar las afinidades de unión de las moléculas de anticuerpo de cadena única biespecíficas específicas entre especies para EGFR de primate y CD3 de primate a los aminoácidos 1-27 del extremo N de la cadena CD3 épsilon humana madura se realizó una medición de Resonancia de Plasmón Superficial con una proteína de fusión recombinante que consistía en los aminoácidos 1-27 N-terminales de la cadena CD3 épsilon humana fusionados con una parte Fc de IgG1 humana (1-27 CD3-Fc). Para este propósito, se instaló un chip Biacore Carboximetil-Dextrano CM5 (Biacore, Uppsala, Suecia) en un sistema Biacore 2000® (Biacore, Uppsala, Suecia). Se activó una celda de flujo con una disolución de Hidrocloruro de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N*-etilcarbodiimida / *N*-Hidroxisuccinimida según procedimientos estándar. Se añadió posteriormente una disolución de la proteína de fusión 1-27 CD3-Fc dando como resultado una unión covalente estable de la proteína a la capa de dextrano del chip Biacore. La proteína no unida se eliminó por lavado exhaustivo seguido por el bloqueo de los grupos carboxi activados con NHS remanentes que no habían reaccionado mediante la adición de una disolución de etanolamina. El éxito del acoplamiento de la proteína se confirmó por la detección de una señal mayor medida como Unidades de Respuesta comparada con la señal anterior al acoplamiento. Se preparó una celda de referencia como se describe, pero sin añadir la disolución de proteína.

Los anticuerpos de cadena única biespecíficos purificados listados más adelante se ajustaron a 5 µg/ml con tampón HBS-EP (Biacore, Uppsala, Suecia) y se transfirieron a una placa de 96 pocillos cada uno a un volumen de 150 µl.

55 Se realizaron Mediciones de Resonancia de Plasmón Superficial para todas las muestras y las celdas de flujo se regeneraron con tampón acetato entre las mediciones para liberar la proteína unida (todo según protocolos estándar).

Las señales de unión de los anticuerpos de cadena única biespecíficos se obtuvieron por sustracción de la señal de la celda de referencia de la señal de la celda de la medición conjugada con la proteína 1-27 CD3-Fc.

Las curvas de asociación y disociación se midieron como Unidades de Respuesta y se registraron. Las constantes de la unión se calcularon usando el software de ajuste de curvas Biacore® basado en el modelo de Langmuir. Las afinidades calculadas para las moléculas de cadena única biespecíficas completamente específicas entre especies ensayadas a los aminoácidos 1-27 N-terminales de CD3 épsilon humana se proporcionan como valores de KD más adelante y varían de $2,54 \times 10^{-6}$ M a $2,49 \times 10^{-7}$ M. "LH" se refiere a una organización de dominios variables en el orden VL-VH. "HL" se refiere a una organización de dominios variables en el orden VH-VL. G4H, F70, A2J, E1L, E2M, H1E y F6A se refieren a diferentes moléculas de unión a CD3 específicas entre especies.

Molécula de anticuerpo biespecífica	KD(M)
EGFR LH x F70 HLP	$1,01 \times 10^{-6}$
EGFR LH x A2J HLP	$2,49 \times 10^{-7}$
EGFR LH x E2M HLP	$2,46 \times 10^{-6}$
EGFR LH x H1E HLP	$2,54 \times 10^{-6}$

10 **12. Ensayo de unión por citometría de flujo de los anticuerpos biespecíficos para EGFR y CD3 específicos entre especies**

Con el fin de ensayar la funcionalidad de las construcciones de anticuerpo biespecíficas específicas entre especies con respecto a la capacidad de unión a EGFR y CD3 humanos y de cynomolgus, respectivamente, se realizó un análisis FACS. Para este propósito, se usaron células CHO transfectadas con EGFR humano como se describe en el Ejemplo 8 y la línea celular de leucemia de células T humana positiva para CD3 HPB-ALL (DSMZ, Braunschweig, ACC483) para ensayar la unión a antígenos humanos. La reactividad de unión a antígenos de cynomolgus se ensayó usando el transfectante de EGFR de cynomolgus generado descrito en el Ejemplo 9 y una línea de células T de macaco 4119LnPx (proporcionada amablemente por el Prof Fickenscher, Hygiene Institute, Virology, Erlangen-Nuernberg; publicado en Knappe A, et al., y Fickenscher H., Blood 2000, 95, 3256-61). Se incubaron 200.000 células de la población celular respectiva durante 30 min en hielo con 50 µl de la proteína purificada de las construcciones de anticuerpo biespecíficas específicas entre especies (2 µg/ml). Alternativamente, se usó el sobrenadante del cultivo celular de proteínas producidas de forma transitoria. Las células se lavaron dos veces en PBS y la unión de la construcción se detectó con un anticuerpo frente a Penta His murino (Qiagen; diluido 1:20 en 50 µl de PBS con 2 % de FCS). Después de lavar, los anticuerpos anti His unidos se detectaron con un anticuerpo específico de Fc gamma (Dianova) conjugado con ficoeritrina, diluido 1:100 en PBS con 2 % de FCS. El medio de cultivo fresco se usó como un control negativo.

Se realizó citometría de flujo en un aparato FACS-Calibur, se usó el software CellQuest para adquirir y analizar los datos (Becton Dickinson biosciences, Heidelberg). La tinción para FACS y la medición de la intensidad de la fluorescencia se realizaron como se describe en Current Protocols in Immunology (Coligan, Kruisbeek, Margulies, Shevach y Strober, Wiley-Interscience, 2002).

La capacidad de unión de varias moléculas de cadena única biespecíficas que son específicas para EGFR y específicas entre especies para CD3 humano y de primate distinto del chimpancé fue claramente detectable como se muestra en la Figura 11. En el análisis FACS, todas las construcciones mostraron unión a CD3 y EGFR comparado con el medio de cultivo y primer y segundo anticuerpo de detección como los controles negativos. Se demostró la especificidad entre especies del anticuerpo biespecífico para los antígenos CD3 y EGFR humanos y de cynomolgus.

35 **13. Bioactividad de los anticuerpos de cadena única biespecíficos para EGFR y CD3 específicos entre especies**

La bioactividad de los anticuerpos de cadena única biespecíficos generados se analizó por ensayos de citotoxicidad de liberación de cromo 51 (⁵¹Cr) in vitro usando líneas celulares positivas para EGFR descritas en los Ejemplos 8 y 9. Como células efectoras, se usaron células T positivas para CD8 humanas estimuladas o la línea de células T de macaco 4119LnPx, respectivamente.

La generación de las células T CD8+ estimuladas se realizó como sigue:

Una placa Petri (145 mm de diámetro, Greiner) se precubrió con un anticuerpo específico anti-CD3 disponible comercialmente en una concentración final de 1 µg/ml durante 1 hora a 37 °C. La proteína no unida se eliminó por una etapa de lavado con PBS. Las PBMC frescas se aislaron de sangre periférica (30 - 50 ml de sangre humana) por centrifugación en gradiente de Ficoll según protocolos estándar. Se añadieron 3 - 5 x 10⁷ PBMC a la placa petri

prerecubierta en 120 ml de RPMI 1640 / 10 % de FCS / 20 U/ml de IL-2 (Proleukin, Chiron) y se estimularon durante 2 días. Al tercer día, las células se recogieron, se lavaron una vez con RPMI 1640. Se añadió IL-2 a una concentración final de 20 U/ml y se cultivó de nuevo durante un día. Los linfocitos T citotóxicos (CTL) CD8+ se aislaron por depleción de las células T CD4+ y las células NK CD56+.

5 Las células diana se lavaron dos veces con PBS y se marcaron con 11,1 MBq de ⁵¹Cr en un volumen final de 100 µl de RPMI con 50 % de FCS durante 45 minutos a 37 °C. Posteriormente, las células diana marcadas se lavaron 3 veces con 5 ml de RPMI y se usaron entonces en el ensayo de citotoxicidad. El ensayo se realizó en una placa de 96 pocillos en un volumen total de 250 µl de RPMI suplementado (como anteriormente) con una relación E:D de 10:1. Se aplicaron 1 µg/ml de las moléculas de anticuerpo de cadena única biespecíficas específicas entre especies y 20 diluciones de tres veces de las mismas. Alternativamente, el sobrenadante del cultivo celular de proteínas producidas de forma transitoria se diluyó de forma seriada en 1:2 etapas. El tiempo del ensayo es 18 horas y la citotoxicidad se midió como valores relativos de cromo liberado en el sobrenadante respecto a la diferencia de la lisis máxima (adición de Tritón-X) y lisis espontánea (sin células efectoras). Todas las mediciones se hicieron en cuadruplicado. La medición de la actividad del cromo en los sobrenadantes se realizó con un contador gamma Wizard 3" (Perkin Elmer Life Sciences GmbH, Colonia, Alemania). El análisis de los datos experimentales se realizó con Prism 4 para Windows (versión 4.02, GraphPad Software Inc., San Diego, California, EEUU). Las curvas de respuesta a la dosis sigmoidales tuvieron típicamente valores de R² >0,90 como se determina por el software. Los valores de CE₅₀ calculados por el programa de análisis se usaron para la comparación de la bioactividad.

20 Como se muestra en las Figuras 12 y 13, todas las construcciones de anticuerpo de cadena única biespecíficas específicas entre especies generadas revelaron una actividad citotóxica frente a células diana positivas para EGFR humano incitadas por células CD8+ humanas y células diana positivas para EGFR de cynomolgus incitadas por la línea de células T de macaco 4119LnPx. Un anticuerpo de cadena única biespecífico con una diferente especificidad de diana se usó como control negativo.

25 **14. Clonación y expresión de los dominios C-terminal, transmembrana y extracelular truncado de MCSP humano**

La secuencia codificadora del dominio C-terminal, transmembrana y extracelular truncado de MCSP humano (aminoácidos 1538 - 2322) se obtuvo por síntesis génica según protocolos estándar (la secuencia de ADNc y la secuencia de aminoácidos de la construcción recombinante para expresión del dominio C-terminal, transmembrana y extracelular truncado de MCSP humano (designado como D3 humano) se listan como SEQ ID NOs 374 y 373). El fragmento de la síntesis génica se diseñó de manera que contuviera en primer lugar un sitio Kozak para permitir la expresión de la construcción en eucariotas seguido por la secuencia codificadora de un péptido líder de inmunoglobulina de 19 aminoácidos seguido en marco por una etiqueta FLAG, seguido en marco por una secuencia que contiene varios sitios de restricción para propósitos de clonación y que codifica un conector artificial de 9 aminoácidos (SRTRSGSQL), seguido en marco por la secuencia codificadora del dominio C-terminal, transmembrana y extracelular truncado de MCSP humano y un codón de parada. Se introdujeron sitios de restricción al comienzo y al final del fragmento de ADN. Los sitios de restricción EcoRI en el extremo 5' y Sall en el extremo 3' se usaron en los siguientes procedimientos de clonación. El fragmento se digirió con EcoRI y Sall y se clonó en pEF-DHFR (pEF-DHFR se describe en Mack et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995) 7021-7025) siguiendo protocolos estándar. Se usó un plásmido con secuencia verificada para transfectar células CHO/dhfr- (ATCC No. CRL 9096). Las células se cultivaron en RPMI 1640 con glutamina estabilizada, suplementado con 10 % de FCS, 1 % de penicilina/estreptomina (todos obtenidos de Biochrom AG Berlín, Alemania) y nucleósidos de una disolución madre de grado de cultivo celular (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Alemania) a una concentración final de 10 µg/ml de Adenosina, 10 µg/ml de Desoxiadenosina y 10 µg/ml de Timidina, en un incubador a 37 °C, 95 % de humedad y 7 % de CO₂. La transfección se realizó usando el Reactivo de Transfección PoliFect (Qiagen GmbH, Hilden, Alemania) y 5 µg de ADN plasmídico según el protocolo del fabricante. Después de cultivar durante 24 horas, las células se lavaron una vez con PBS y se cultivaron de nuevo en RPMI 1640 con glutamina estabilizada y 1 % de penicilina/estreptomina. Así, el medio del cultivo celular no contenía nucleósidos y de esta manera se aplicó la selección en las células transfectadas. Aproximadamente 14 días después de la transfección, se observó el crecimiento de células resistentes. Después de 7 a 14 días adicionales, los transfectantes se ensayaron para determinar la expresión de la construcción por análisis FACS. Se incubaron 2,5x10⁵ células con 50 µl de un anticuerpo anti-Flag-M2 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Alemania) diluido a 5 µg/ml en PBS con 2 % de FCS. La unión del anticuerpo se detectó con un fragmento F(ab')₂ purificado por afinidad conjugado con R-Ficoeritrina, anti-IgG de ratón de cabra, específico del fragmento Fc gamma diluido 1:100 en PBS con 2 % de FCS (ImmunoResearch Europe Ltd., Newmarket, Suffolk, Reino Unido). Las muestras se midieron en un FACScalibur (BD biosciences, Heidelberg, Alemania).

55 **15. Clonación y expresión de los dominios C-terminal, transmembrana y extracelular truncado de MCSP de macaco**

La secuencia de ADNc de los dominios C-terminal, transmembrana y extracelular truncado de MCSP de macaco (designado como D3 de macaco) se obtuvo por un conjunto de tres PCR en el ADNc de piel de macaco (No. de Cat. C1534218-Cy-BC; BioCat GmbH, Heidelberg, Alemania) usando las siguientes condiciones de reacción: 1 ciclo a 94 °C, 3 min., 40 ciclos con 94 °C durante 0,5 min., 52 °C durante 0,5 min. y 72 °C durante 1,75 min., ciclo terminal de 72 °C durante 3 min. Se usaron los siguientes cebadores:

cebador directo: 5'-GATCTGGTCTACACCATCGAGC-3'

cebador inverso: 5'-GGAGCTGCTGCTGGCTCAGTGAGG-3'

cebador directo: 5'- TTCCAGCTGAGCATGTCTGATGG-3'

cebador inverso: 5'- CGATCAGCATCTGGGCCAGG-3'

5 cebador directo: 5'- GTGGAGCAGTTCACTCAGCAGGACC-3'

cebador inverso: 5'- GCCTTCACACCCAGTACTGGCC-3'

Estas PCR generaron tres fragmentos superpuestos (A: 1-1329, B: 1229-2428, C: 1782-2547) que se aislaron y secuenciaron según protocolos estándar usando los cebadores de PCR y proporcionando de esta manera una parte de 2547 pb de la secuencia de ADNc de MCSP de macaco (la secuencia de ADNc y la secuencia de aminoácidos de esta parte de MCSP de macaco se listan como SEQ ID NOs 376 y 375) desde 74 pb en 5' de la secuencia codificadora del dominio C-terminal hasta 121 pb en 3' del codón de parada. Otra PCR usando las siguientes condiciones de reacción: 1 ciclo a 94 °C durante 3 min, 10 ciclos con 94 °C durante 1 min, 52 °C durante 1 min y 72 °C durante 2,5 min, ciclo terminal de 72 °C durante 3 min se usó para fusionar los productos de PCR de las reacciones A y B mencionadas anteriormente. Se usan los siguientes cebadores:

10

15

cebador directo: 5'-tcccgtacgagatctggatcccaattggatggcggactcgtgctgttctcacacagagg-3'

cebador inverso: 5'-agtggtcgcactcacaccagctactggccattcttaagggcaggg-3'

20

25

30

35

40

Los cebadores para esta PCR se diseñaron para introducir sitios de restricción al comienzo y al final del fragmento de ADNc que codifica los dominios C-terminal, transmembrana y extracelular truncado de MCSP de macaco. Los sitios de restricción introducidos MfeI en el extremo 5' y Sall en el extremo 3', se usaron en los siguientes procedimientos de clonación. El fragmento de PCR se clonó entonces mediante MfeI y Sall en un plásmido Bluescript que contenía el fragmento EcoRI/MfeI del plásmido mencionado anteriormente pEF-DHFR (pEF-DHFR se describe en Raum et al. Cancer Immunol Immunother 50 (2001) 141-150) reemplazando los dominios C-terminal, transmembrana y extracelular truncado de MCSP humano. El fragmento de la síntesis génica contenía las secuencias codificadoras del péptido líder de inmunoglobulina y la etiqueta Flag, así como el conector artificial (SRTRSGSQL) en marco con el extremo 5' del fragmento de ADNc que codifica los dominios C-terminal, transmembrana y extracelular truncado de MCSP de macaco. Este vector se usó para transfectar células CHO/dhfr- (ATCC No. CRL 9096). Las células se cultivaron en RPMI 1640 con glutamina estabilizada suplementado con 10 % de FCS, 1 % de penicilina/estreptomicina (todos de Biochrom AG Berlín, Alemania) y nucleósidos de una disolución madre de reactivos de grado de cultivo celular (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Alemania) a una concentración final de 10 µg/ml de Adenosina, 10 µg/ml de Desoxiadenosina y 10 µg/ml de Timidina, en un incubador a 37 °C, 95 % de humedad y 7 % de CO₂. La transfección se realizó con el Reactivo de Transfección PoliFect (Qiagen GmbH, Hilden, Alemania) y 5 µg de ADN plasmídico según el protocolo del fabricante. Después de cultivar durante 24 horas, las células se lavaron una vez con PBS y se cultivaron de nuevo en RPMI 1640 con glutamina estabilizada y 1 % de penicilina/estreptomicina. Así, el medio del cultivo celular no contenía nucleósidos y de esta manera se aplicó la selección en las células transfectadas. Aproximadamente 14 días después de la transfección, se observa el crecimiento de células resistentes. Después de 7 a 14 días adicionales, los transfectantes se ensayaron para determinar la expresión de la construcción recombinante mediante FACS. Se incubaron 2,5x10⁵ células con 50 µl de un anticuerpo anti-Flag-M2 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Alemania) diluido a 5 µg/ml en PBS con 2 % de FCS. El anticuerpo unido se detectó con un fragmento F(ab')₂ purificado por afinidad conjugado con R-Ficoeritrina, anti-IgG de ratón de cabra, específico del fragmento Fc gamma diluido 1:100 en PBS con 2 % de FCS (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Newmarket, Suffolk, Reino Unido). Las muestras se midieron en un FACScalibur (BD biosciences, Heidelberg, Alemania).

16. Generación y caracterización de las moléculas de cadena única biespecíficas para MCSP y CD3 específicas entre especies

45

Se diseñan moléculas de anticuerpo de cadena única biespecíficas comprendiendo cada una un dominio de unión específico entre especies para CD3 épsilon humana y de primate distinto del chimpancé, así como un dominio de unión específico entre especies para MCSP humano y de primate distinto del chimpancé MCSP, como se muestra en la siguiente Tabla 2:

Tabla 2: Formatos de anticuerpos de cadena única biespecíficos para MCSP y CD3 específicos entre especies

SEQ ID (nucl/prot)	Formatos de construcciones de proteínas (N → C)
310/309	MCSP-G4 HL x H2C HL
312/311	MCSP-G4 HL x F12Q HL

ES 2 695 047 T3

SEQ ID (nucl/prot)	Formatos de construcciones de proteínas (N → C)
314/313	MCSP-G4 HL x I2C HL
316/315	MCSP-G4 HLP x F6A HLP
318/317	MCSP-G4 HLP x H2C HLP
322/321	MCSP-G4 HLP x G4H HLP
326/325	MCSP-G4 HLP x E1L HLP
328/327	MCSP-G4 HLP x E2M HLP
332/331	MCSP-G4 HLP x F12Q HL
334/333	MCSP-G4 HLP x I2C HL
336/335	MCSP-D2 HL x H2C HL
338/337	MCSP-D2 HL x F12Q HL
340/339	MCSP-D2 HL x I2C HL
342/341	MCSP-D2 HLP x H2C HLP
344/343	MCSP-F9 HL x H2C HL
346/345	MCSP-F9 HLP x H2C HLP
348/347	MCSP-F9 HLP x G4H HLP
1355/1354	MCSP-A9 HL x H2C HL
1357/1356	MCSP-A9 HL x F12Q HL
1359/1358	MCSP-A9 HL x I2C HL
1373/1372	MCSP-C8 HL x I2C HL
1401/1400	MCSP-B7 HL x I2C HL
1387/1386	MCSP-B8 HL x I2C HL
1415/1414	MCSP-G8 HL x I2C HL
1429/1428	MCSP-D5 HL x I2C HL
1443/1442	MCSP-F7 HL x I2C HL
1457/1456	MCSP-G5 HL x I2C HL
1471/1470	MCSP-F8 HL x I2C HL

SEQ ID (nucl/prot)	Formatos de construcciones de proteínas (N → C)
1485/1484	MCSP-G10 HL x I2C HL

Las construcciones mencionadas anteriormente que contienen los dominios variable de cadena pesada (VH) y variable de cadena ligera (VL) específicos entre especies para MCSP D3 humano y de macaco y los dominios VH y VL específicos entre especies para CD3 humano y de macaco se obtuvieron por síntesis génica. Los fragmentos de la síntesis génica se diseñaron de manera que contuvieran en primer lugar un sitio Kozak para la expresión de la construcción en eucariotas, seguido por un péptido líder de inmunoglobulina de 19 aminoácidos, seguido en marco por la secuencia codificadora de la molécula de anticuerpo de cadena única biespecífica respectiva, seguido en marco por la secuencia codificadora de una etiqueta histidina₆ y un codón de parada. El fragmento de la síntesis génica también se diseñó para introducir sitios de restricción N y C-terminales adecuados. El fragmento de la síntesis génica se clonó mediante estos sitios de restricción en un plásmido designado pEF-DHFR (pEF-DHFR se describe en Raum et al. Cancer Immunol Immunother 50 (2001) 141-150) según protocolos estándar (Sambrook, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 3ª edición, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, Nueva York (2001)). Las construcciones se transfirieron de forma estable o transitoria en células CHO deficientes para DHFR (ATCC No. CRL 9096) por electroporación o, alternativamente, en células HEK 293 (células de riñón embrionario humano, Número ATCC: CRL-1573) de una manera transitoria según protocolos estándar.

La expresión de la proteína en eucariotas en células CHO deficientes para DHFR se realizó como se describe por Kaufmann R.J. (1990) Methods Enzymol. 185, 537-566. La amplificación génica de las construcciones se indujo por la adición de concentraciones crecientes de metotrexato (MTX) hasta concentraciones finales de MTX 20 nM. Después de dos subcultivos de cultivo estacionario, las células se crecieron en botellas de cultivo rotatorias con medio líquido de soja HyQ PF CHO sin nucleósidos (con L-Glutamina 4,0 mM con 0,1 % de Pluronic F - 68; HyClone) durante 7 días antes de la recogida. Las células se retiraron por centrifugación y el sobrenadante que contenía la proteína expresada se almacena a -20°C.

Se usaron el Sistema Äkta® Exporer (GE Health Systems) y el Software Unicorn® para cromatografía. Se realizó cromatografía de afinidad con metal inmovilizado ("IMAC") usando un Fractogel EMD chelate® (Merck) que se cargó con ZnCl₂ según el protocolo proporcionado por el fabricante. La columna se equilibró con el tampón A (tampón fosfato de sodio 20 mM pH 7,2, NaCl 0,1 M) y el sobrenadante del cultivo celular (500 ml) se aplicó a la columna (10 ml) a una velocidad de flujo de 3 ml/min. La columna se lavó con el tampón A para eliminar la muestra no unida. La proteína unida se eluyó usando un gradiente de dos etapas de tampón B (tampón fosfato de sodio 20 mM pH 7,2, NaCl 0,1 M, 0,5 M Imidazol) según lo siguiente:

Etapa 1: 20 % de tampón B en 6 volúmenes de columna

Etapa 2: 100 % de tampón B en 6 volúmenes de columna

Las fracciones de proteína eluida de la etapa 2 se combinaron para una purificación adicional. Todos los productos químicos son de grado de investigación y se adquirieron en Sigma (Deisenhofen) o Merck (Darmstadt).

Se realizó cromatografía de filtración en gel en una columna de grado preparativo HiLoad 16/60 Superdex 200 (GE/Amersham) equilibrada con tampón Equi (Citrato 25 mM, Lisina 200 mM, 5 % de Glicerol, pH 7,2). Las muestras de proteínas eluidas (velocidad de flujo 1 ml/min) se sometieron a SDS-PAGE estándar y Transferencia Western para su detección. Antes de la purificación, la columna se calibró para la determinación del peso molecular (kit de marcadores de peso molecular, Sigma MW GF-200). Las concentraciones de proteína se determinaron usando DO280 nm.

La proteína de anticuerpo de cadena única biespecífico purificada se analizó en SDS PAGE en condiciones reductoras realizada con geles preparados comercialmente de Bis Tris al 4-12 % (Invitrogen). La preparación y aplicación de la muestra se realizaron según el protocolo proporcionado por el fabricante. El peso molecular se determinó con el estándar de proteína MultiMark (Invitrogen). El gel se tiñó con Coomassie coloidal (protocolo de Invitrogen). La pureza de la proteína aislada es >95 % como se determina por SDS-PAGE.

El anticuerpo de cadena única biespecífico tiene un peso molecular de aproximadamente 52 kDa en condiciones nativas como se determina con filtración en gel en disolución salina tamponada con fosfato (PBS). Todas las construcciones se purificaron según este método.

Se realizó Transferencia Western usando una membrana Optitran® BA-S83 y el Módulo de Transferencia de Invitrogen según el protocolo proporcionado por el fabricante. Para la detección de la proteína de anticuerpo de cadena única biespecífico se usó un anticuerpo anti-Etiqueta de His (Penta His, Qiagen). Se usó un anticuerpo anti-Ig de ratón de cabra marcado con fosfatasa alcalina (AP) (Sigma) como anticuerpo secundario y BCIP/NBT (Sigma) como sustrato. Se detectó una única banda a 52 kD correspondiente al anticuerpo de cadena única biespecífico purificado.

Alternativamente, las construcciones se expresaron de forma transitoria en células CHO deficientes para DHFR. Brevemente, se cultivaron 4 x 10⁵ células por construcción en 3 ml de medio RPMI 1640 completo con glutamina estabilizada suplementado con 10 % de suero fetal de ternera, 1 % de penicilina/estreptomocina y nucleósidos de una disolución madre de reactivos de grado de cultivo celular (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Alemania) a una concentración final de 10 µg/ml de Adenosina, 10 µg/ml de Desoxiadenosina y 10 µg/ml de Timidina, en un incubador a 37 °C, 95 % de humedad y 7 % de CO₂ un día antes de la transfección. La transfección se realizó con el Reactivo de Transfección Fugene 6 (Roche, # 11815091001) según el protocolo del fabricante. Se mezclaron 94 µl de medio OptiMEM (Invitrogen) y 6 µl de Fugene 6 y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadieron 1,5 µg de ADN por construcción, se mezcló y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Mientras tanto, las células CHO deficientes para DHFR se lavaron con 1x PBS y se resuspendieron en 1,5 ml de medio RPMI 1640 completo. La mezcla de transfección se diluyó con 600 µl de medio RPMI 1640 completo, se añadió a las células y se incubó toda la noche a 37 °C, 95 % de humedad y 7 % de CO₂. El día posterior a la transfección, el volumen de incubación de cada estrategia se aumentó a 5 ml de medio RPMI 1640 completo. El sobrenadante se recogió después de 3 días de incubación.

17. Análisis por citometría de flujo de la unión de los anticuerpos biespecíficos para MCSP y CD3 específicos entre especies

Con el fin de ensayar la funcionalidad de las construcciones de anticuerpo biespecíficas específicas entre especies respecto a la capacidad de unirse a MCSP D3 y CD3 humano y de macaco, respectivamente, se realizó un análisis FACS. Para este propósito, se usaron células CHO transfectadas con MCSP D3 humano (como se describe en el Ejemplo 14) y la línea celular de leucemia de células T positivas para CD3 humano HPB-ALL (DSMZ, Braunschweig, ACC483) para ensayar la unión a antígenos humanos. La reactividad de la unión a antígenos de macaco se ensayó usando el transfectante de MCSP D3 de macaco generado (descrito en el Ejemplo 15) y una línea de células T de macaco 4119LnPx (proporcionada amablemente por el Prof. Fickenscher, Hygiene Institute, Virology, Erlangen-Nuernberg; publicado en Knappe A, et al., y Fickenscher H., Blood 2000, 95, 3256-61). Se incubaron 200.000 células de las líneas celulares respectivas durante 30 min en hielo con 50 µl de la proteína purificada de las construcciones de anticuerpo biespecíficas específicas entre especies (2 µg/ml) o sobrenadante del cultivo celular de células transfectadas que expresan las construcciones de anticuerpo biespecíficas específicas entre especies. Las células se lavaron dos veces en PBS con 2 % de FCS y la unión de la construcción se detectó con un anticuerpo anti-his murino (anticuerpo Penta His; Qiagen; diluido 1:20 en 50 µl de PBS con 2 % de FCS). Después de lavar, los anticuerpos anti-His unidos se detectaron con un anticuerpo específico de Fc gamma (Dianova) conjugado con ficoeritrina, diluido 1:100 en PBS con 2 % de FCS. El sobrenadante de las células CHO no transfectadas se usó como control negativo para la unión a las líneas de células T. Una construcción de cadena única con especificidad de diana irrelevante se usó como control negativo para la unión a las células CHO transfectadas con MCSP-D3.

Se realizó citometría de flujo en un aparato FACS-Calibur; se usó el software CellQuest para adquirir y analizar los datos (Becton Dickinson biosciences, Heidelberg). La tinción para FACS y la medición de la intensidad de la fluorescencia se realizaron como se describe en Current Protocols in Immunology (Coligan, Kruisbeek, Margulies, Shevach y Strober, Wiley-Interscience, 2002).

La unión biespecífica de las moléculas de cadena única listadas anteriormente, que son específicas entre especies para MCSP D3 y específicas entre especies para CD3 humano y de macaco fue claramente detectable como se muestra en las Figuras 14, 15, 16 y 58. En el análisis FACS, todas las construcciones mostraron unión a CD3 y MCSP D3 comparado con los controles negativos respectivos. Se demostró la especificidad entre especies de los anticuerpos biespecíficos para los antígenos CD3 y MCSP D3 humano y de macaco.

18. Bioactividad de los anticuerpos de cadena única biespecíficos para MCSP y CD3 específicos entre especies

La bioactividad de los anticuerpos de cadena única biespecíficos generados se analizó por ensayos de citotoxicidad de liberación de cromo 51 (⁵¹Cr) in vitro usando las líneas celulares positivas para MCSP D3 descritas en los Ejemplos 14 y 15. Como células efectoras se usan PBMC humanas deplecionadas de CD4/CD56 estimuladas, PBMC humanas estimuladas o la línea de células T de macaco 4119LnPx, como se especifica en las figuras respectivas.

La generación de las PBMC deplecionadas de CD4/CD56 estimuladas se realizó como sigue:

El recubrimiento de una placa Petri (145 mm de diámetro, Greiner bio-one GmbH, Kremsmünster) se llevó a cabo con un anticuerpo específico anti-CD3 disponible comercialmente (p. ej., OKT3, Othoclone) en una concentración final de 1 µg/ml durante 1 hora a 37°C. La proteína no unida se eliminó por una etapa de lavado con PBS. Las PBMC frescas se aislaron de sangre periférica (30 - 50 ml de sangre humana) por centrifugación en gradiente de Ficoll según protocolos estándar. Se añadieron 3 - 5 x 10⁷ PBMC a la placa petri precubierta en 120 ml de RPMI 1640 con glutamina estabilizada / 10 % de FCS / 20 U/ml de IL-2 (Proleukin, Chiron) y se estimularon durante 2 días. Al tercer día, las células se recogieron y se lavaron una vez con RPMI 1640. Se añadió IL-2 a una concentración final de 20 U/ml y las células se cultivaron de nuevo durante un día en el mismo medio de cultivo celular que anteriormente. Mediante la depleción de las células T CD4+ y las células NK CD56+ según protocolos estándar se enriquecieron los linfocitos T citotóxicos (CTL) CD8+.

Las células diana se lavaron dos veces con PBS y se marcaron con 11,1 MBq de ⁵¹Cr en un volumen final de 100 µl de RPMI con 50 % de FCS durante 45 minutos a 37 °C. Posteriormente, las células diana marcadas se lavaron 3 veces con 5 ml de RPMI y se usaron entonces en el ensayo de citotoxicidad. El ensayo se realizó en una placa de 96 pocillos en un volumen total de 250 µl de RPMI suplementado (como anteriormente) con una relación E:D de 10:1. Se aplicaron 1 µg/ml de las moléculas de anticuerpo de cadena única biespecíficas específicas entre especies y 20 diluciones de tres veces de la misma. Si se usa el sobrenadante que contiene las moléculas de anticuerpo de cadena única biespecíficas específicas entre especies, se aplicaron 21 diluciones de dos veces y 20 diluciones de tres veces de la misma para el ensayo de citotoxicidad en macaco y humano, respectivamente. El tiempo del ensayo fue 18 horas y la citotoxicidad se midió como valores relativos de cromo liberado en el sobrenadante respecto a la diferencia de la lisis máxima (adición de Tritón-X) y lisis espontánea (sin células efectoras). Todas las mediciones se hicieron en cuadruplicado. La medición de la actividad del cromo en los sobrenadantes se realizó con un contador gamma Wizard 3" (Perkin Elmer Life Sciences GmbH, Colonia, Alemania). El análisis de los datos experimentales se realizó con Prism 4 para Windows (versión 4.02, GraphPad Software Inc., San Diego, California, EEUU). Las curvas de respuesta a la dosis sigmoidales tienen típicamente valores de R² >0,90 como se determina por el software. Los valores de CE₅₀ calculados por el programa de análisis se usaron para la comparación de la bioactividad.

Como se muestra en las Figuras 17 a 21 y 59, todas las construcciones de anticuerpo de cadena única biespecíficas específicas entre especies generadas demuestran actividad citotóxica frente a células diana positivas para MCSP D3 humano incitadas por PBMC humanas deplecionadas de CD4/CD56 estimuladas o PBMC estimuladas y frente a células diana positivas para MCSP D3 de macaco incitadas por la línea de células T de macaco 4119LnPx.

19. Estabilidad plasmática de anticuerpos de cadena única biespecíficos para MCSP y CD3 específicos entre especies

La estabilidad de los anticuerpos de cadena única biespecíficos generados en plasma humano se analizó por incubación de los anticuerpos de cadena única biespecíficos en 50 % de Plasma humano a 37 °C y 4 °C durante 24 horas y ensayo posterior de la bioactividad. La bioactividad se estudió en un ensayo de citotoxicidad de liberación de cromo 51 (⁵¹Cr) in vitro usando una línea celular CHO positiva para MCSP (que expresa MCSP como se clona según el ejemplo 14 o 15) como diana y células T positivas para CD8 humanas estimuladas como células efectoras.

Los valores de CE₅₀ calculados por el programa de análisis como se ha descrito anteriormente se usaron para la comparación de la bioactividad de anticuerpos de cadena única biespecíficos incubados con 50 % de plasma humano durante 24 horas a 37 °C y 4 °C, respectivamente, con anticuerpos de cadena única biespecíficos sin la adición de plasma o mezclados con la misma cantidad de plasma inmediatamente antes del ensayo.

Como se muestra en Figura 22 y en la Tabla 3, la bioactividad de los anticuerpos biespecíficos G4 H-L x I2C H-L, G4 H-L x H2C H-L y G4 H-L x F12Q H-L no se redujo significativamente comparada con los controles sin la adición de plasma o con la adición de plasma inmediatamente antes del ensayo de la bioactividad.

Tabla 3: bioactividad de los anticuerpos biespecíficos sin o con la adición de Plasma

Construcción	Sin plasma	Con plasma	Plasma 37 °C	Plasma 4 °C
G4 H-L x I2C H-L	300	796	902	867
G4 H-L x H2C H-L	496	575	2.363	1.449
G4 H-L x F12Q H-L	493	358	1.521	1.040

20. La redistribución de las células T circulantes en ausencia de células diana circulantes por la primera exposición a moléculas de unión a CD3 dirigidas a epítomos de CD3 convencionales, es decir, dependientes de contexto, es un factor de riesgo importante para eventos adversos relacionados con el inicio del tratamiento

Redistribución de células T en pacientes con Linfoma de Células B No de Hodgkin (B-NHL) después del inicio del tratamiento con la molécula de unión a CD3 convencional

Una molécula de unión CD19xCD3 convencional es una molécula de unión a CD3 del formato de tándem biespecífico scFv (Loffler (2000, Blood, Volumen 95, Número 6) o WO 99/54440). Consiste en dos diferentes partes de unión dirigidas a (i) CD19 en la superficie de células B humanas normales y malignas y (ii) CD3 en células T humanas. Mediante el entrecruzamiento de CD3 en las células T con CD19 en las células B, esta construcción desencadena la lisis redirigida de células B normales y malignas por la actividad citotóxica de las células T. El epítomo de CD3 reconocido por dicha molécula de unión a CD3 convencional está localizado en la cadena CD3 épsilon, donde sólo adopta la conformación correcta si está incluido en el resto de la cadena épsilon y se mantiene en la posición correcta

por heterodimerización de la cadena épsilon bien con la cadena CD3 gamma o delta. La interacción de este epítipo altamente dependiente de contexto con una molécula de unión a CD3 convencional (véase, p. ej., Loffler (2000, Blood, Volumen 95, Número 6) o WO 99/54440) - incluso cuando ocurre de una forma puramente monovalente y sin ningún entrecruzamiento - puede inducir un cambio alostérico en la conformación de CD3 que da lugar a la exposición de una región rica en prolina que de otra forma estaría escondida en el dominio citoplásmico de CD3 épsilon. Una vez expuesta, la región rica en prolina puede reclutar la molécula de transducción de señales Nck2, que es capaz de desencadenar señales intracelulares adicionales. Aunque esto no es suficiente para la activación completa de las células T, que requiere definitivamente el entrecruzamiento de varias moléculas de CD3 en la superficie de las células T, p. ej., por entrecruzamiento de varias moléculas anti-CD3 unidas a varias moléculas CD3 en una célula T por varias moléculas CD19 en la superficie de una célula B, la interacción puramente monovalente de moléculas de unión a CD3 convencionales a su epítipo dependiente de contexto en CD3 épsilon todavía no es inerte para las células T en términos de señalización. Sin pretender la vinculación a ninguna teoría, las moléculas de unión a CD3 monovalentes convencionales (conocidas en la técnica) pueden inducir algunas reacciones de las células T cuando se infunden en seres humanos incluso en aquellos casos en los que no están disponibles células diana circulantes para el entrecruzamiento de CD3. Una reacción importante de las células T frente a la infusión intravenosa de la molécula de unión CD19xCD3 monovalente convencional en pacientes con B-NHL que no tienen esencialmente células B positivas para CD19 circulantes es la redistribución de las células T después del inicio del tratamiento. Se ha encontrado en un ensayo clínico de fase I que esta reacción de las células T ocurre durante la fase de inicio de la infusión intravenosa de la molécula de unión CD19xCD3 en todos los individuos sin células B diana positivas para CD19 circulantes de manera esencialmente independiente de la dosis de la molécula de unión CD19xCD3 (Fig. 23). Sin embargo, se ha encontrado que los incrementos súbitos en la exposición a la molécula de unión CD19xCD3 desencadenan prácticamente la misma reacción de redistribución de las células T en estos pacientes que la exposición inicial de células T a la molécula de unión CD19xCD3 al inicio del tratamiento (Fig. 24 A) e incluso incrementos graduales en la exposición a la molécula de unión CD19xCD3 todavía pueden tener efectos de redistribución en las T circulantes (Fig. 25). Además, se ha encontrado que esta reacción de redistribución de las células T esencialmente independiente de la dosis en ausencia de células diana circulantes como es desencadenada por las moléculas de unión a CD3 convencionales como la molécula de unión CD19xCD3 (p. ej., descrito en WO 99/54440) en el 100 % de todos los individuos tratados, es un factor de riesgo importante para eventos adversos relacionados con el inicio del tratamiento.

Según el protocolo del estudio, los pacientes con Linfoma de Células B No de Hodgkin (B-NHL) recidivante indolente confirmado histológicamente incluyendo linfoma de células del manto se reclutaron en un estudio de fase I, con escalada de dosis, interpaciente, multicentro, abierto. El protocolo del estudio se aprobó por los comités de ética independientes de todos los centros participantes y se envió para notificación a la autoridad reguladora responsable. Para la inclusión en el estudio se requirió enfermedad mensurable (al menos una lesión $\geq 1,5$ cm) como se documenta por escaneo CT. Los pacientes recibieron la molécula de unión CD19xCD3 convencional por infusión intravenosa continua con un sistema de minibomba portátil durante cuatro semanas a una velocidad de flujo constante (es decir, nivel de dosis). Los pacientes fueron hospitalizados las dos primeras semanas de tratamiento antes de que fueran dados de alta del hospital y continuaran el tratamiento en casa. A los pacientes sin evidencia de progresión de la enfermedad después de cuatro semanas se les ofreció continuar el tratamiento durante cuatro semanas más. Hasta la fecha, se ensayaron seis niveles de dosis diferentes sin alcanzar una dosis máxima tolerada (MTD): 0,5, 1,5, 5, 15, 30 y 60 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$. Las cohortes consistieron en tres pacientes cada una si no se observaron eventos adversos definidos por el protocolo del estudio como DLT (toxicidad limitante de la dosis). En el caso de una DLT entre los tres primeros pacientes, la cohorte se expandió a seis pacientes, lo que - en ausencia de una segunda DLT - permitió una escalada de la dosis adicional. De acuerdo con esto, los niveles de dosis sin DLT en cohortes con 3 pacientes o con una DLT en cohortes con 6 pacientes se consideraron como seguros. El tratamiento del estudio se paró en todos los pacientes que desarrollaron una DLT. A 15 y 30 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$, se ensayaron diferentes modos de inicio del tratamiento durante las primeras 24h en varias cohortes adicionales: (i) Incremento por etapas después de 5 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$ para las primeras 24h a una dosis de mantenimiento de 15 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$ (cohorte de pacientes con etapas hasta 15), (ii) incremento continuo uniforme de la velocidad de flujo desde casi cero a 15 o 30 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$ (cohortes de pacientes con aumento hasta 15 y con aumento hasta 30) e (iii) inicio con la dosis de mantenimiento desde el comienzo (cohortes de pacientes inalterado 15, inalterado 30 e inalterado 60). Las cohortes de pacientes en los niveles de dosis 0,5, 1,5 y 5 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$ se iniciaron todas con la dosis de mantenimiento desde el comienzo (es decir, inicio inalterado).

Los cursos de tiempo de los recuentos de células B y T absolutos en la sangre periférica se determinaron por análisis FACS de cuatro colores como sigue:

Recogida y análisis rutinario de las muestras de sangre

En las cohortes de pacientes con aumento hasta 15, inalterado 15, con aumento hasta 30, inalterado 30 e inalterado 60, se obtuvieron muestras de sangre (6 ml) antes y 0,75, 2, 6, 12, 24, 30, 48 horas después del inicio de la infusión de la molécula de unión CD19xCD3 (como se describe en WO 99/54440), así como en los días de tratamiento 8, 15, 17, 22, 24, 29, 36, 43, 50, 57 y 4 semanas después del final de la infusión de la molécula de unión CD19xCD3 convencional usando tubos Vacutainer™ que contenían EDTA (Becton Dickinson) que fueron enviados para su análisis a 4 °C. En las cohortes de pacientes etapas 15, se obtuvieron muestras de sangre (6 ml) antes y 6, 24, 30, 48 horas después del inicio de la infusión de la molécula de unión CD19xCD3, así como en los días tratamiento 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57 y 4 semanas después del final de la infusión de la molécula de unión CD19xCD3. A los niveles de dosis 0,5, 1,5 y 5 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$, se obtuvieron muestras de sangre (6 ml) antes y 6, 24, 48 horas después del inicio de

la infusión de la molécula de unión CD19xCD3, así como en los días de tratamiento 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57 y 4 semanas después del final de la infusión de la molécula de unión CD19xCD3. En algunos casos, se produjeron ligeras variaciones de estos puntos de tiempo por razones operativas. El análisis FACS de las subpoblaciones de linfocitos se realizó en las 24 - 48 h después de la recogida de las muestras de sangre. Los números absolutos de subpoblaciones de leucocitos en las muestras de sangre se determinaron a través de un análisis de sangre diferencial en un CoulterCounter™ (Coulter).

Aislamiento de PBMC de las muestras de sangre

El aislamiento de las PBMC (células mononucleares de sangre periférica) se realizó por un protocolo adaptado de separación en gradiente de Ficoll™. La sangre se transfirió a temperatura ambiente a tubos Leucosep™ de 10 ml (Greiner) precargados con 3 ml de disolución de Biocoll™ (Biochrom). Se llevó a cabo una centrifugación en un rotor basculante durante 15 min a 1.700xg y 22 °C sin desaceleración. Se aislaron las PBMC que estaban por encima de la capa de Biocoll™, se lavaron una vez con tampón FACS (PBS / 2 % de FBS [Suero Fetal Bovino; Biochrom]), se centrifugaron y se resuspendieron en tampón FACS. Se llevó a cabo una centrifugación durante todas las etapas de lavado en un rotor basculante durante 4 min a 800xg y 4 °C. Si fue necesario, se realizó la lisis de los eritrocitos incubando las PBMC aisladas en 3 ml de tampón de lisis de eritrocitos (8,29 g de NH₄Cl, 1,00 g de KHCO₃, 0,037 g de EDTA, añadir 1,0 l de H₂O_{bidest}, pH 7,5) durante 5 min a temperatura ambiente seguido por una etapa de lavado con tampón FACS.

Tinción de las PBMC con anticuerpos marcados con fluorescencia frente a moléculas de la superficie celular

Los anticuerpos monoclonales se obtuvieron de Invitrogen (¹No. de Cat. MHCD1301, ²No. de Cat. MHCD1401), Dako (⁵No. de Cat. C7224) o Becton Dickinson (³No. de Cat. 555516, ⁴No. de Cat. 345766) y se usaron según las recomendaciones de los fabricantes. Se tiñeron 5x10⁵ - 1x10⁶ células con la siguiente combinación de anticuerpos: anti-CD13¹ / anti-CD14² (FITC) x anti-CD56³ (PE) x anti-CD3⁴ (PerCP) x anti-CD19⁵ (APC). Las células se sedimentaron en placas de multititulación de 96 pocillos con forma de V (Greiner) y el sobrenadante se retiró. Los sedimentos celulares se resuspendieron en un volumen total de 100 µl que contenía los anticuerpos específicos diluidos en tampón FACS. La incubación se llevó a cabo en oscuridad durante 30 min a 4 °C. Posteriormente, las muestras se lavaron dos veces con tampón FACS y los sedimentos celulares se resuspendieron en tampón FACS para análisis por citometría de flujo.

Detección por citometría de flujo de los linfocitos teñidos por FACS

La recogida de datos se realizó con un BD FACSCalibur™ de 4 colores (Becton Dickinson). Para cada medición, se adquirieron 1x10⁴ células de subpoblaciones definidas de linfocitos. El análisis estadístico se realizó con el programa CellQuest Pro™ (Becton Dickinson) para obtener los porcentajes de las subpoblaciones de linfocitos y para clasificar la intensidad de la expresión de la molécula de la superficie celular. Posteriormente, se correlacionaron los porcentajes de los subconjuntos únicos de linfocitos respecto a los linfocitos totales (es decir, células B más T más NK excluyendo cualquier célula mielóide mediante tinción de CD13/14) como se determina por FACS con el recuento de linfocitos del análisis de sangre diferencial para calcular los números de células absolutas de células T (CD3⁺, CD56⁻, CD13/14⁻) y células B (CD19⁺, CD13/14⁻).

La redistribución de las células T durante la fase inicial del tratamiento con la molécula de unión CD19xCD3 convencional (p. ej., descrito en WO 99/54440) en todos aquellos pacientes que no tenían esencialmente células B positivas para CD19 circulantes al inicio del tratamiento se muestra en la (Fig. 23). Para comparación, en la Fig. 26 se muestra un ejemplo representativo de la redistribución de células T durante la fase inicial del tratamiento con la molécula de unión CD19xCD3 en un paciente con un número significativo de células B positivas para CD19 circulantes.

En ambos casos (es decir, esencialmente sin o muchas células B circulantes), los recuentos de células T circulantes disminuyeron rápidamente después del inicio del tratamiento. Sin embargo, en ausencia de células B circulantes, las células T tienden a volver a la sangre circulante muy pronto, mientras la vuelta de las células T a la sangre circulante de aquellos pacientes que tienen un número significativo de células B circulantes al inicio del tratamiento se retrasa habitualmente hasta que estas células B circulantes se deplecionan. Así, los patrones de la redistribución de las células T se diferencian principalmente en la cinética de la reaparición de las células T en la sangre circulante.

La evaluación de la eficacia sobre la base del escaneo CT se llevó a cabo por radiología central de referencia después de 4 semanas de tratamiento y en pacientes que recibieron 4 semanas adicionales también después de 8 semanas de tratamiento más en todos los casos cuatro semanas después del final del tratamiento. La desaparición y/o normalización del tamaño de todas las lesiones conocidas (incluyendo un bazo agrandado) más el aclaramiento de la médula ósea de células de linfoma en los casos de infiltración en la médula ósea, se contó como respuesta completa (CR). La reducción en al menos un 50 % respecto a la línea base de la suma de los productos de los dos diámetros mayores (SPD) de cada lesión diana predefinida se definió como respuesta parcial (PR); una reducción en al menos el 25 % se consideró como una respuesta mínima (MR). La enfermedad progresiva (PD) se definió como un incremento \geq 50 % de SPD respecto a la línea base. Las desviaciones de SPD respecto a la línea base entre +50 % y -25 % se consideraron como enfermedad estable (SD).

Las características demográficas de los pacientes, las dosis recibidas y el resultado clínico en 34 pacientes se resumen en la Tabla 4. La actividad clínica antitumoral de la molécula de unión CD19xCD3 fue claramente dependiente de la dosis: la depleción consistente de células B positivas para CD19 circulantes (linfoma) de la sangre periférica se observó desde 5 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$ hacia arriba. A 15 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$ y 30 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$, se registraron las primeras respuestas clínicas objetivas (PR y CR), así como casos de eliminación parcial y completa de células B de linfoma de médula ósea infiltrada. Finalmente, a 60 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$, la tasa de respuesta se incrementó hasta el 100 % (PR y CR) y el aclaramiento de las células B de linfoma de la médula ósea fue completo en todos los casos evaluables.

La molécula de unión CD19xCD3 fue bien tolerada por la mayoría de los pacientes. Los eventos adversos más frecuentes de grados 1-4 en 34 pacientes, independientemente de la causalidad, se resumen en la Tabla 5. Los eventos adversos relacionados con la molécula de unión CD19xCD3 fueron habitualmente transitorios y completamente reversibles. En particular, hubo 2 pacientes (pacientes # 19 y # 24 en la Tabla 4) esencialmente sin células B positivas para CD19 circulantes cuyo tratamiento se paró pronto debido a eventos adversos en el SNC (síntomas principales: confusión y desorientación) relacionados con la redistribución repetida de células T durante la fase inicial de la infusión de la molécula de unión CD19xCD3.

Uno de estos pacientes (#19) estaba en la cohorte etapa 15. Recibió 5 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$ de la molécula de unión CD19xCD3 durante las primeras 24h seguido por un incremento súbito a la dosis de mantenimiento de 15 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$. El patrón correspondiente de la redistribución de las células T muestra que los recuentos de células T circulantes disminuyeron rápidamente después del inicio de la infusión a 5 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$ seguido por una reaparición temprana de células T en la sangre circulante esencialmente sin células B positivas para CD19 circulantes. Como consecuencia, los recuentos de células T periféricas se habían recuperado totalmente cuando la dosis de la molécula de unión CD19xCD3 se incrementó después de 24h de 5 a 15 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$. Por lo tanto, la etapa de la dosis pudo desencadenar un segundo episodio de redistribución de las células T como se muestra en la Fig. 24A. Esta redistribución repetida de las células T se relacionó con los efectos secundarios en el SNC (síntomas principales: confusión y desorientación) en este paciente, que dieron lugar a la parada de la infusión. La relación entre la redistribución repetida de las células T y dichos eventos adversos en el SNC también se observó en ensayos clínicos de fase I previos en pacientes con B-NHL que recibieron la molécula de unión CD19xCD3 (p. ej., descrito en WO 99/54440) como una infusión en bolo repetida durante 2 a 4 horas cada una seguida habitualmente por 2 días de intervalo sin tratamiento (Fig. 24 B). Cada infusión en bolo única desencadenó un episodio de redistribución de células T que consistió en una disminución rápida de los recuentos de células T circulantes y recuperación de las células T antes de la siguiente infusión en bolo. En total, se observaron eventos adversos en el SNC relacionados con la redistribución repetida de células T en 5 de 21 pacientes. La Fig. 24B muestra el ejemplo representativo de un paciente de los ensayos de infusión en bolo, que desarrolló síntomas en el SNC después del tercer episodio de redistribución de células T. Típicamente, los pacientes con eventos adversos en el SNC en los ensayos de infusión en bolo también tenían bajos recuentos de células B circulantes.

El segundo paciente (#24) del ensayo de infusión continua, cuyo tratamiento se paró pronto debido a eventos adversos en el SNC (síntomas principales: confusión y desorientación) relacionados con la redistribución repetida de células T durante la fase inicial de la infusión de la molécula de unión CD19xCD3, estaba en la cohorte inalterado 15. Por error, este paciente recibió una infusión de la molécula de unión CD19xCD3 sin HSA adicional como se requiere para la estabilización del fármaco. El flujo del fármaco no uniforme resultante desencadenó episodios repetidos de redistribución de células T en lugar de sólo uno (Fig. 27A) con la consecuencia de que la infusión tuvo que pararse debido al desarrollo de síntomas en el SNC. Aun así, cuando el mismo paciente volvió a empezar correctamente con la disolución de la molécula de unión CD19xCD3 que contenía HSA adicional para la estabilización del fármaco (p. ej., descrito en WO 99/54440), no se observó la redistribución repetida de células T y el paciente no desarrolló de nuevo ningún síntoma en el SNC (Fig. 27B). Como este paciente tampoco tenía esencialmente células B circulantes, las células T circulantes podrían reaccionar con cinéticas de redistribución rápidas incluso frente a cambios sutiles en la exposición al fármaco como se observa. Los eventos adversos en el SNC relacionados con la redistribución de células T en pacientes que no tienen esencialmente células diana circulantes puede explicarse por un incremento transitorio de la adhesividad de las células T a las células endoteliales seguido por una adhesión simultánea masiva de células T circulantes a las paredes de los vasos sanguíneos con una caída consecutiva de los números de células T en la sangre circulante como se observa. La unión simultánea masiva de células T a las paredes de los vasos sanguíneos puede causar un incremento en la permeabilidad endotelial y la activación de las células endoteliales. Las consecuencias de una permeabilidad endotelial incrementada son desplazamientos de fluidos desde el compartimento intravascular a los compartimentos de tejido intersticial incluyendo el intersticio del SNC. La activación de las células endoteliales por las células T unidas puede tener efectos procoagulantes (Monaco et al. *J Leukoc Biol* 71 (2002) 659-668) con alteraciones posibles en el flujo de la sangre (incluyendo el flujo de la sangre cerebral) particularmente con respecto a la microcirculación capilar. Así, los eventos adversos en el SNC relacionados con la redistribución de células T en pacientes esencialmente sin células diana circulantes puede ser la consecuencia de extravasación capilar y/o alteraciones en la microcirculación capilar mediante la adherencia de células T a células endoteliales. El estrés endotelial causado por un episodio de redistribución de células T es tolerado por la mayoría de los pacientes, mientras el estrés endotelial aumentado causado por la redistribución repetida de células T causa frecuentemente eventos adversos en el SNC. Más de un episodio de redistribución de células T puede ser menos arriesgado sólo en pacientes que tienen recuentos bajos de células T circulantes en la línea base. Sin embargo, también el estrés endotelial limitado causado por un episodio de redistribución de células T puede causar eventos adversos en el SNC en casos raros de

susceptibilidad incrementada para dichos eventos como se observa en 1 de 21 pacientes en los ensayos de infusión en bolo con la molécula de unión CD19xCD3.

5 Sin pretender la vinculación a ninguna teoría, el incremento transitorio de la adhesividad de las células T a las células endoteliales en pacientes que no tienen esencialmente células diana circulantes, puede explicarse como una reacción de las células T a la interacción monovalente de una molécula de unión a CD3 convencional, como la molécula de unión CD19xCD3 (p. ej., WO 99/54440), a su epítipo en CD3 épsilon dependiente de contexto, dando como resultado un cambio alostérico en la conformación de CD3 seguido por el reclutamiento de Nck2 en el dominio citoplásmico de CD3 épsilon como se ha descrito anteriormente. Como Nck2 está unido directamente a las integrinas mediante PINCH e ILK (Fig 28), el reclutamiento de Nck2 en el dominio citoplásmico de CD3 épsilon después de un cambio alostérico en la conformación de CD3 a través de la unión de una molécula de unión a CD3 convencional, como la molécula de unión CD19xCD3, a su epítipo en CD3 épsilon dependiente de contexto, puede incrementar la adhesividad de las células T a las células endoteliales mediante el cambio transitorio de la integrinas en la superficie de las células T a su isoforma más adhesiva mediante señalización de dentro hacia afuera.

Tabla 4. Características demográficas de los pacientes y resultado clínico

Cohorte	Paciente	Edad/Sexo	Enfermedad (Clasificación Ann Arbor)	Nivel de Dosis [mg/m ² /Día]	Aclaramiento de la Médula Ósea	Mejor Respuesta* (Duración de CR en Meses o Semanas)
1	1	71/m	IC, Binet C	0,0005	Ninguno	SD
	2	67/f	MCL, Estadio IV/A/E	0,0005	n.d.	PD
	3	67/m	CLL, Estadio /B/E	0,0005	n.d.	MR
2	4	69/m	MCL, Estadio IV/B	0,0015	n.i.	SD
	5	49/m	MCL, Estadio IV/A/S	0,0015	n.d.	SD
	6	71/m	MCL, Estadio IV/B/E	0,0015	n.i.	PD
	7	77/m	MCL, Estadio IV/B/E/S	0,0015	n.i.	SD
	8	65/m	CLL, Estadio IV/B/E/S	0,0015	n.d.	PD
	9	75/m	FL, Estadio II/B	0,0015	n.i.	SD
3	10	58/m	MCL, Estadio III/B/S	0,005	n.i.	PD
	11	68/f	FL, Estadio IV/B	0,005	n.d.	SD
	12	65/m	MCL, Estadio III/A/E	0,005	n.i.	SD
4 ^a	13	60/m	SLL, Estadio IV/B/S	0,015	Completo	PR
	14	73/m	MCL, Estadio II/A/E	0,015	n.i.	SD
	15	44/m	FL, Estadio IV/B/E/S	0,015	Parcial	PR

ES 2 695 047 T3

Cohorte	Paciente	Edad/Sexo	Enfermedad (Clasificación Ann Arbor)	Nivel de Dosis [mg/m ² /Día]	Aclaramiento de la Médula Ósea	Mejor Respuesta* (Duración de CR en Meses o Semanas)
	16	61/m	FL, Estadio IV/A/S	0,015	Completo	CR (7 meses)
	17	67/m	MZL, Estadio IV/B/S	0,015	n.i.	n.e.
	18	64/m	FL, Estadio IV/A/E	0,015	n.i.	PD
	19	75/m	MCL, Estadio III/A	0,015	n.i.	n.e.
	20	65/f	FL; Estadio III/A	0,015	n.i.	SD
	21	60/m	MCL, Estadio IV/A/E	0,015	Ninguno	SD
	22	67/f	FL, Estadio IV/B	0,015	Completo	MR
	23	67/m	DLBCL, Estadio III/B	0,015	n.i.	n.e.
	24	65/f	FL, Estadio III/A	0,015	n.d.	SD
	25	74/f	WD, Estadio IV/B	0,015	Parcial	SD
5	26	67/m	MCL, Estadio IV/A	0,03	Completo	SD
	27	48/m	FL, Estadio III/A	0,03	n.i.	PD
	28	58/m	MCL, Estadio III/A	0,03	n.i.	CR (+ de 10 meses)
	29	45/f	MCL, Estadio IV/B	0,03	Parcial	PD
	30	59/m	MZL, Estadio III/A	0,03	n.i.	n.e.
	31	43/m	FL, Estadio III/A	0,03	n.i.	MR
6	32	72/m	MCL, Estadio IV/A	0,06	Completo	PR
	33	55/m	MCL, Estadio IV/B	0,06	Completo	CR (+ de 4 meses)
	34	52/m	FL, Estadio IV/A	0,06	n.i.	CR^b (+ de 1 semana)

*Respuestas completa (CR) y parcial (PR) confirmado centralmente por los criterios de Cheson en negrita; MR, respuesta mínima (≥ 25 a < 50 %); SD, enfermedad estable; PD, enfermedad progresiva; duración desde la primera documentación de respuesta entre paréntesis; + indica una respuesta en marcha

^aLa cohorte 4 se expandió para estudiar tres esquemas diferentes de inicio del tratamiento

^bLa PR después de 8 semanas de tratamiento se convirtió en una CR después de un ciclo de tratamiento adicional de 4 semanas a la misma dosis después de 7 semanas de intervalo sin tratamiento

n.e.: no evaluable, debido a un periodo de tratamiento < 7 d

n.d.: no determinado (infiltrada, pero no se realizó una segunda biopsia al final del tratamiento)

ES 2 695 047 T3

Cohorte	Paciente	Edad/Sexo	Enfermedad (Clasificación Arbor)	Ann	Nivel de Dosis [mg/m ² /Día]	Aclaramiento de la Médula Ósea	Mejor Respuesta* (Duración de CR en Meses o Semanas)
n.i.: no infiltrada al inicio del tratamiento							

Tabla 5. Incidencia de eventos adversos observados durante el tratamiento

Eventos adversos independientemente de su relación, que se produjeron en ≥ 3 pacientes (N=34)	Grado 1-4 N (%)	Grado 3-4 N (%)
Pirexia	22 (64,7)	2 (5,9)
Leucopenia	21 (61,8)	11 (32,4)
Linfopenia	21 (61,8)	21 (61,8)
Coagulopatía (incremento en los dímeros D)	16 (47,1)	6 (17,6)
Anormalidad enzimática (AP, LDH, CRP)	16 (47,1)	10 (29,4)
Anormalidad en la función hepática (ALT, AST, GGT)	16 (47,1)	1 (2,9)
Anemia	13 (38,2)	5 (14,7)
Enfriamientos	13 (38,2)	0 (0,0)
Dolor de cabeza	12 (35,3)	1 (2,9)
Hipocalcemia	12 (35,3)	2 (5,9)
Trombocitopenia	12 (35,3)	6 (17,6)
Peso incrementado	12 (35,3)	0 (0,0)
Hiperglucemia	11 (32,4)	2 (5,9)
Neutropenia	11 (32,4)	8 (23,5)
Hematuria	10 (29,4)	0 (0,0)
Edema periférico	10 (29,4)	2 (5,9)
Anorexia	9 (26,5)	1 (2,9)
Diarrea	9 (26,5)	0 (0,0)
Peso disminuido	9 (26,5)	0 (0,0)
Fatiga	8 (23,5)	1 (2,9)
Proteinuria	8 (23,5)	0 (0,0)

ES 2 695 047 T3

Eventos adversos independientemente de su relación, que se produjeron en ≥ 3 pacientes (N=34)	Grado 1-4 N (%)	Grado 3-4 N (%)
Hipocalcemia	7 (20,6)	2 (5,9)
Anormalidad en enzimas pancreáticas	7 (20,6)	0 (0,0)
Tos	6 (17,6)	0 (0,0)
Disnea	6 (17,6)	0 (0,0)
Dolor de espalda	5 (14,7)	0 (0,0)
Dolor en el sitio del catéter	5 (14,7)	0 (0,0)
Hiperbilirrubinemia	5 (14,7)	2 (5,9)
Hipoalbuminemia	5 (14,7)	0 (0,0)
Hipogammaglobulinemia	5 (14,7)	1 (2,9)
Hipoproteinemia	5 (14,7)	0 (0,0)
Efusión pleural	5 (14,7)	1 (2,9)
Vómitos	5 (14,7)	0 (0,0)
Astenia	4 (11,8)	1 (2,9)
Estado confusional	4 (11,8)	0 (0,0)
Estreñimiento	4 (11,8)	0 (0,0)
Mareo	4 (11,8)	0 (0,0)
Hipertensión	4 (11,8)	0 (0,0)
Hiponatremia	4 (11,8)	2 (5,9)
Sequedad mucosal	4 (11,8)	0 (0,0)
Espasmos musculares	4 (11,8)	0 (0,0)
Náusea	4 (11,8)	0 (0,0)
Sudores nocturnos	4 (11,8)	0 (0,0)
Dolor abdominal	3 (8,8)	1 (2,9)
Ascitis	3 (8,8)	0 (0,0)
Hipercoagulación	3 (8,8)	0 (0,0)
Hiperhidrosis	3 (8,8)	0 (0,0)

Eventos adversos independientemente de su relación, que se produjeron en ≥ 3 pacientes (N=34)	Grado 1-4 N (%)	Grado 3-4 N (%)
Hipoglobulinemia	3 (8,8)	0 (0,0)
Insomnio	3 (8,8)	0 (0,0)
Trastorno hepático	3 (8,8)	1 (2,9)
Nasofaringitis	3 (8,8)	0 (0,0)
Prurito	3 (8,8)	0 (0,0)

Las abreviaturas usadas son: AE, evento adverso; AP, fosfatasa alcalina; LDH, lactato deshidrogenasa; CRP, proteína C reactiva; ALT, alanina transaminasa; AST, aspartato transaminasa; GGT, gamma-glutamil transferasa; los datos de AE del ciclo de tratamiento adicional del paciente 34 no están todavía incluidos.

5 Como se ha explicado anteriormente, las moléculas de unión a CD3 convencionales (p. ej., descrito en WO 99/54440) capaces de unirse a un epítipo dependiente de contexto, aunque funcionales, dan lugar al efecto indeseado de redistribución de células T en los pacientes causando eventos adversos en el SNC. Por el contrario, las moléculas de unión de la presente invención, mediante su unión a los aminoácidos 1-27 N-terminales de la cadena CD3 épsilon independientes de contexto, no dan lugar a dichos efectos de redistribución de células T. Como consecuencia, las moléculas de unión a CD3 de la invención están asociadas con un mejor perfil de seguridad comparadas con las moléculas de unión a CD3 convencionales.

10 **21. Las moléculas de unión a CD3 biespecíficas de la invención que inducen la lisis de las células diana mediada por las células T mediante el reconocimiento de un antígeno diana en la superficie deplecionan las células positivas para el antígeno diana in vivo**

Una molécula de unión a CD3 biespecífica de la invención que reconoce CD33 como el antígeno diana depleciona monocitos circulantes positivos para CD33 de la sangre periférica de monos cynomolgus

15 Se produjo CD33-AF5 VH-VL x I2C VH-VL (secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO.415) por la expresión en células CHO usando la secuencia de nucleótidos codificadora SEQ ID NO. 416. Se unieron las secuencias codificadoras de (i) un líder de cadena pesada de inmunoglobulina N-terminal que comprende un codón de inicio incluido en una secuencia consenso de Kozak y (ii) una etiqueta His₆ C-terminal seguida por un codón de parada en marco con la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO 416 antes de la inserción del fragmento de ADN resultante como se obtiene por síntesis génica en el sitio de clonación múltiple del vector de expresión pEF-DHFR (Raum et al. Cancer Immunol
20 Immunother 50 (2001) 141-150). La transfección estable de células CHO deficientes para DHFR, la selección de transfectantes positivos para DHFR que secretan la molécula de unión a CD3 CD33-AF5 VH-VL x I2C VH-VL en el sobrenadante del cultivo y la amplificación génica con metotrexato para incrementar los niveles de expresión se llevaron a cabo como se describe (Mack et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995) 7021-7025). El material de ensayo para el tratamiento de monos cynomolgus se produjo en un fermentador de 20 litros. La purificación de la proteína de la recogida de 3 operaciones de producción se basó en cromatografía de afinidad IMAC dirigida a la etiqueta His₆ C-terminal de CD33-AF5 VH-VL x I2C VH-VL seguido por cromatografía preparativa de exclusión por tamaño (SEC). El rendimiento total del material de ensayo final libre de endotoxinas fue 60 mg. El perfil de la SEC analítica de CD33-AF5 VH-VL x I2C VH-VL para uso en monos cynomolgus reveló que el material de ensayo consistía casi exclusivamente en monómero. La potencia del material de ensayo se midió en un ensayo de citotoxicidad como se describe en el Ejemplo 23.5 usando células CHO transfectadas con CD33 de cynomolgus como células diana y la línea de células T de macaco 4119LnPx como fuente de células efectoras (FIG. 29). Se determinó que la concentración de CD33-AF5 VH-VL x I2C VH-VL requerida para una lisis mitad de la máxima de la célula diana por las células T efectoras (CE50) era 2,7 ng/ml.

35 Se trataron monos cynomolgus (*Macaca fascicularis*) adultos jóvenes (aprox. 3 años de edad) por infusión intravenosa continua de molécula de unión a CD3 CD33-AF5 VH-VL x I2C VH-VL a diferentes velocidades de flujo (es decir, niveles de dosis) para estudiar la depleción de monocitos positivos para CD33 circulantes de la sangre periférica. Esta situación es equivalente al tratamiento con la molécula de unión a CD3 convencional CD19xCD3 (específica para CD19 en células B y CD3 en células T) de aquellos pacientes con B-NHL que tienen células B diana positivas para CD19 circulantes (véase, p. ej., WO99/54440). La depleción de células B diana positivas para CD19 circulantes de la sangre periférica se había convertido en un subrogado válido para determinar la eficacia clínica general de la molécula de unión a CD3 convencional (CD19xCD3 como se proporciona en WO99/54440) en pacientes con malignomas de células B positivas para CD19 como B-NHL. Asimismo, la depleción de monocitos positivos para CD33 circulantes de

la sangre periférica se considera como un subrogado válido para determinar la eficacia clínica general de las moléculas de unión a CD3 biespecíficas dirigidas a CD33 de la invención como CD33-AF5 VH-VL x I2C VH-VL en pacientes con malignomas mieloides positivos para CD33 como AML (leucemia mieloide aguda).

5 La infusión continua se llevó a cabo según el método de Swivel como sigue: Los monos se cateterizaron a través de la vena femoral en la vena cava caudal usando un catéter venoso. El catéter se tunelizó subcutáneamente hacia la región dorsal del hombro y se exteriorizó en la escápula caudal. Entonces, se pasa un tubo a través de una envoltura y un muelle de protección. La envoltura se fija alrededor del animal y el catéter, mediante el tubo, se conecta a una bomba de infusión.

10 La disolución de administración (lisina 1,25 M, 0,1 % de tween 80, pH 7) sin material de ensayo se infundió continuamente a 48 ml/24h durante 7 días antes del inicio del tratamiento para permitir la aclimatación de los animales a las condiciones de la infusión. El tratamiento se inició mediante la adición del material de ensayo CD33-AF5 VH-VL x I2C VH-VL a la disolución de administración a la cantidad requerida para cada nivel de dosis individual que se va a ensayar (es decir, velocidad de flujo de CD33-AF5 VH-VL x I2C VH-VL). El reservorio de la infusión se cambió cada día a lo largo de la fase completa de aclimatación y tratamiento. La duración planeada del tratamiento fue 7 días
15 excepto para el nivel de dosis 120 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$, en el que los animales recibieron 14 días de tratamiento.

Los cursos de tiempo de los recuentos absolutos de células T circulantes y monocitos positivos para CD33 se determinaron por análisis FACS de 4 o 3 colores, respectivamente:

Recogida y análisis rutinario de las muestras de sangre

20 Se obtuvieron muestras de sangre (1 ml) antes y 0,75, 2, 6, 12, 24, 30, 48, 72 horas después del inicio de la infusión continua con MCSP-G4 VH-VL x I2C VH-VL, así como después de 7 y 14 días (y después de 9 días al nivel de dosis 120 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$) de tratamiento usando tubos Vacutainer™ que contenían EDTA (Becton Dickinson) que se enviaron para análisis a 4 °C. En algunos casos, se produjeron ligeras variaciones de estos puntos de tiempo por razones operativas. El análisis FACS de las subpoblaciones de linfocitos se realizó en las 24 - 48 h después de la recogida de las muestras de sangre. Los números absolutos de subpoblaciones de leucocitos en las muestras de sangre se
25 determinaron mediante un análisis de sangre diferencial en un laboratorio veterinario rutinario.

Aislamiento de PBMC de las muestras de sangre

30 El aislamiento de las PBMC (células mononucleares de sangre periférica) se realizó por un protocolo adaptado de separación en gradiente de Ficoll™. La sangre se transfirió a temperatura ambiente a tubos Falcon™ de 5 ml precargados con 1 ml de disolución de Biocoll™ (Biochrom). Se llevó a cabo una centrifugación en un rotor basculante durante 15 min a 1.700xg y 22 °C sin desaceleración. Se aislaron las PBMC que estaban por encima de la capa de Biocoll™, se lavaron una vez con tampón FACS (PBS / 2 % de FBS [Suero Fetal Bovino; Biochrom]), se centrifugaron y se resuspendieron en tampón FACS. Se llevó a cabo una centrifugación durante todas las etapas de lavado en un rotor basculante durante 4 min a 800xg y 4 °C. Si fue necesario, se realizó la lisis de los eritrocitos incubando las
35 PBMC aisladas en 3 ml de tampón de lisis de eritrocitos (8,29 g de NH_4Cl , 1,00 g de KHCO_3 , 0,037 g de EDTA, añadir 1,0 l de $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$, pH 7,5) durante 5 min a temperatura ambiente seguido por una etapa de lavado con tampón FACS.

Tinción de las PBMC con anticuerpos marcados con fluorescencia frente a moléculas de la superficie celular

40 Los anticuerpos monoclonales reactivos con antígenos de cynomolgus se obtuvieron de Becton Dickinson (¹No. de Cat. 345784, ²No. de Cat. 556647, ³No. de Cat. 552851, ⁶No. de Cat. 557710), Beckman Coulter (⁴No. de Cat. IM2470) y Miltenyi (⁵No. de Cat. 130-091-732) y se usaron según las recomendaciones de los fabricantes. Se tñeron 5×10^5 - 1×10^6 células con las siguientes combinaciones de anticuerpos: anti-CD14¹ (FITC) x anti-CD56² (PE) x anti-CD3³ (PerCP) x anti-CD19⁴ (APC) y anti-CD14¹ (FITC) x anti-CD33⁵ (PE) x anti-CD16⁶ (Alexa Fluor 647™). Las células se sedimentaron en placas de multititulación de 96 pocillos con forma de V (Greiner) y el sobrenadante se retiró. Los sedimentos celulares se resuspendieron en un volumen total de 100 μl que contenía los anticuerpos específicos diluidos en tampón FACS. La incubación se llevó a cabo en oscuridad durante 30 min a 4 °C. Posteriormente, las
45 muestras se lavaron dos veces con tampón FACS y los sedimentos celulares se resuspendieron en tampón FACS para análisis por citometría de flujo.

Detección por citometría de flujo de los linfocitos teñidos por FACS

50 La recogida de datos se realizó con un BD FACSCalibur™ de 4 colores (Becton Dickinson). Para cada medición, se adquirieron 1×10^4 células de subpoblaciones definidas de linfocitos. El análisis estadístico se realizó con el programa CellQuest Pro™ (Becton Dickinson) para obtener los porcentajes de las subpoblaciones de linfocitos y para clasificar la intensidad de la expresión de la molécula de la superficie celular. Posteriormente, se correlacionaron los porcentajes de los subconjuntos únicos de linfocitos respecto a los linfocitos totales (es decir, células B más T más NK excluyendo la célula mieloides mediante tinción de CD14) como se determina por FACS con el recuento de linfocitos del análisis de sangre diferencial para calcular los números de células absolutos de células T (CD3⁺, CD56⁻, CD14⁻). Los números
55 absolutos de monocitos positivos para CD33 se calcularon multiplicando los recuentos de monocitos del análisis de sangre diferencial por las proporciones correspondientes de monocitos positivos para CD33 (CD33⁺, CD14⁺) respecto a todos los monocitos (CD14⁺) como se determina por FACS.

El porcentaje comparado con la línea base (es decir, 100 %) de recuentos absolutos de monocitos positivos para CD33 circulantes al final del tratamiento con CD33-AF5 VH-VL x I2C VH-VL en 4 cohortes de 2 monos cynomolgus con una escalada de dosis entre cohortes de 30 sobre 60 y 240 a 1.000 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$ se muestran en la FIG 30A.

5 Como se muestra en la FIG 30A, la infusión intravenosa continua de CD33-AF5 VH-VL x I2C VH-VL induce la depleción de monocitos positivos para CD33 circulantes de una manera dependiente de la dosis. Aunque todavía no había una depleción detectable de monocitos positivos para CD33 circulantes a 30 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$, una primera tendencia hacia una reducción de los recuentos de monocitos positivos para CD33 se hizo visible a 60 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$ después de 7 días de tratamiento. A 240 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$, los monocitos positivos para CD33 circulantes estaban casi completamente deplecionados de la sangre periférica después de 3 días de tratamiento. Esto se alcanzó incluso más rápido a 1.000 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$, donde la depleción de los monocitos positivos para CD33 circulantes de la sangre periférica ya se completó después de 1 día de tratamiento. Este descubrimiento se confirmó por los resultados mostrados en la Figura 30B lo que demuestra la depleción de los monocitos positivos para CD33 circulantes en dos tercios y el 50 % comparado con la línea base respectiva en dos monos cynomolgus tratados por infusión continua con CD33-AF5 VH-VL x I2C VH-VL a 120 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$ durante 14 días.

15 Este resultado es una señal clara de eficacia clínica de las moléculas de unión a CD3 de la invención en general y de las moléculas de unión a CD3 biespecíficas dirigidas a CD33 de la invención para el tratamiento de malignomas positivos para CD33 como AML, particularmente.

Además, la redistribución de células T durante la fase de inicio del tratamiento con CD33-AF5 VH-VL x I2C VH-VL en presencia de células diana circulantes (es decir, monocitos positivos para CD33) parece ser menos pronunciada que la redistribución de células T durante la fase de inicio del tratamiento con construcciones CD19xCD3 convencionales, como se describe en WO99/54440 en pacientes con B-NHL con un número significativo de células diana circulantes (es decir, células B positivas para CD19) como se muestra en la Fig 26. Aunque las células T desaparecen completamente de la circulación después del inicio de la infusión de CD19xCD3 y no reaparecen hasta que las células B diana positivas para CD19 circulantes se deplecionan de la sangre periférica (FIG 26), la desaparición inicial de las células T circulantes es incompleta después del inicio de la infusión con CD33-AF5 VH-VL x I2C VH-VL y los recuentos de células T se recuperan todavía durante la presencia de células diana positivas para CD33 circulantes (FIG 30 B). Esto confirma que las moléculas de unión a CD3 de la invención (dirigidas frente a y generadas frente a un epítipo de la cadena CD3 ϵ (épsilon) humana y de primates distintos de chimpancés y que es parte o un fragmento o la longitud completa de la secuencia de aminoácidos como se proporciona en las SEQ ID Nos. 2, 4, 6, u 8) mediante el reconocimiento de un epítipo de CD3 independiente de contexto muestran un perfil de redistribución de células T más favorable que las moléculas de unión a CD3 convencionales que reconocen un epítipo de CD3 dependiente de contexto, como las moléculas de unión proporcionadas en WO99/54440.

22. Las moléculas de unión a CD3 de la invención dirigidas a epítopos de CD3 esencialmente independientes de contexto mediante la inducción de menos redistribución de células T circulantes en ausencia de células diana circulantes reducen el riesgo de eventos adversos relacionados con el inicio del tratamiento

Redistribución reducida de células T en monos cynomolgus después del inicio del tratamiento con una molécula de unión a CD3 específica entre especies representativa de la invención

Se produjo MCSP-G4 VH-VL x I2C VH-VL (secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO. 313) por la expresión en células CHO usando la secuencia de nucleótidos codificadora SEQ ID NO. 314. Se unieron las secuencias codificadoras de (i) un líder de cadena pesada de inmunoglobulina N-terminal que comprende un codón de inicio incluido en una secuencia consenso de Kozak y (ii) una etiqueta His₆ C-terminal seguida por un codón de parada en marco con la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO 314 antes de la inserción del fragmento de ADN resultante como se obtiene por síntesis génica en el sitio de clonación múltiple del vector de expresión pEF-DHFR (Raum et al. Cancer Immunol Immunother 50 (2001) 141-150). La transfección estable de células CHO deficientes para DHFR, la selección de transfectantes positivos para DHFR que secretan la molécula de unión a CD3 MCSP-G4 VH-VL x I2C VH-VL en el sobrenadante del cultivo y la amplificación génica con metotrexato para incrementar los niveles de expresión se llevaron a cabo como se describe (Mack et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995) 7021-7025). El material de ensayo para el tratamiento de monos cynomolgus se produjo en un fermentador de 200 litros. La purificación de la proteína de la recogida se basó en cromatografía de afinidad IMAC dirigida a la etiqueta His₆ C-terminal de MCSP-G4 VH-VL x I2C VH-VL seguido por cromatografía preparativa de exclusión por tamaño (SEC). El rendimiento total del material de ensayo final libre de endotoxinas fue 40 mg. El material de ensayo consistió en 70 % de monómero, 30 % de dímero y una pequeña contaminación de multímero superior. La potencia del material de ensayo se midió en un ensayo de citotoxicidad como se describe en el ejemplo 18 usando células CHO transfectadas con MCSP de cynomolgus como células diana y la línea de células T de macaco 4119LnPx como fuente de células efectoras (FIG. 31). Se determinó que la concentración de MCSP-G4 VH-VL x I2C VH-VL requerida para una lisis mitad de la máxima de la célula diana por las células T efectoras (CE50) era 1,9 ng/ml.

Se trataron monos cynomolgus (*Macaca fascicularis*) adultos jóvenes (aprox. 3 años de edad) por infusión intravenosa continua de molécula de unión a CD3 MCSP-G4 VH-VL x I2C VH-VL a diferentes velocidades de flujo (es decir, niveles de dosis) para estudiar la redistribución de células T circulantes después del inicio del tratamiento en ausencia de células diana circulantes. Aunque la molécula de unión a CD3 MCSP-G4 VH-VL x I2C VH-VL puede reconocer tanto

MCSP de cynomolgus como CD3 de cynomolgus, no hay células circulantes en la sangre que expresan MCSP. Por lo tanto, la única interacción posible en la sangre circulante es la unión del brazo específico de CD3 de MCSP-G4 VH-VL x I2C VH-VL a CD3 en las células T. Esta situación es equivalente al tratamiento con la molécula de unión a CD3 convencional (molécula de unión CD19xCD3 específica para CD19 en las células B y CD3 en las células T) de aquellos pacientes con B-NHL que no tienen células B diana positivas para CD19 circulantes como se describe en el ejemplo 20.

La infusión continua se llevó a cabo según el método de Swivel como sigue: Los monos se cateterizaron a través de la vena femoral en la vena cava caudal usando un catéter venoso. El catéter se tunelizó subcutáneamente hacia la región dorsal del hombro y se exteriorizó en la escápula caudal. Entonces, se pasa un tubo a través de una envoltura y un muelle de protección. La envoltura se fija alrededor del animal y el catéter, mediante el tubo, se conecta a una bomba de infusión.

La disolución de administración (lisina 1,25 M, 0,1 % de tween 80, pH 7) sin material de ensayo se infundió continuamente a 48 ml/24h durante 7 días antes del inicio del tratamiento para permitir la aclimatación de los animales a las condiciones de la infusión. El tratamiento se inició mediante la adición del material de ensayo MCSP-G4 VH-VL x I2C VH-VL a la disolución de administración a la cantidad requerida para cada nivel de dosis individual que se va a ensayar (es decir, velocidad de flujo de MCSP-G4 VH-VL x I2C VH-VL). El reservorio de la infusión se cambió cada día a lo largo de la fase completa de aclimatación y tratamiento. La duración del tratamiento fue 7 días.

Los cursos de tiempo de los recuentos de células T absolutos en la sangre periférica se determinaron por análisis FACS de cuatro colores como sigue:

20 **Recogida y análisis rutinario de las muestras de sangre**

Se obtuvieron muestras de sangre (1 ml) antes y 0,75, 2, 6, 12, 24, 30, 48, 72 horas después del inicio de la infusión continua con MCSP-G4 VH-VL x I2C VH-VL, así como después de 7 días de tratamiento usando tubos Vacutainer™ que contenían EDTA (Becton Dickinson) que se enviaron para análisis a 4 °C. En algunos casos, se produjeron ligeras variaciones de estos puntos de tiempo por razones operativas. El análisis FACS de las subpoblaciones de linfocitos se realizó en las 24 - 48 h después de la recogida de las muestras de sangre. Los números absolutos de subpoblaciones de leucocitos en las muestras de sangre se determinaron mediante un análisis de sangre diferencial en un laboratorio veterinario rutinario

Aislamiento de PBMC de las muestras de sangre

El aislamiento de las PBMC (células mononucleares de sangre periférica) se realizó por un protocolo adaptado de separación en gradiente de Ficoll™. La sangre se transfirió a temperatura ambiente a tubos Falcon™ de 5 ml precargados con 1 ml de disolución de Biocoll™ (Biochrom). Se llevó a cabo una centrifugación en un rotor basculante durante 15 min a 1.700xg y 22 °C sin desaceleración. Se aislaron las PBMC que estaban por encima de la capa de Biocoll™, se lavaron una vez con tampón FACS (PBS / 2 % de FBS [Suero Fetal Bovino; Biochrom]), se centrifugaron y se resuspendieron en tampón FACS. Se llevó a cabo una centrifugación durante todas las etapas de lavado en un rotor basculante durante 4 min a 800xg y 4 °C. Si fue necesario, se realizó la lisis de los eritrocitos incubando las PBMC aisladas en 3 ml de tampón de lisis de eritrocitos (8,29 g de NH₄Cl, 1,00 g de KHCO₃, 0,037 g de EDTA, añadir 1,0 l de H₂O_{bidest}, pH 7,5) durante 5 min a temperatura ambiente seguido por una etapa de lavado con tampón FACS.

Tinción de las PBMC con anticuerpos marcados con fluorescencia frente a moléculas de la superficie celular

Los anticuerpos monoclonales reactivos con antígenos de cynomolgus se obtuvieron de Becton Dickinson (¹No. de Cat. 345784, ²No. de Cat. 556647, ³No. de Cat. 552851) y Beckman Coulter (⁴No. de Cat. IM2470) y se usaron según las recomendaciones de los fabricantes. Se tiñeron 5x10⁵ - 1x10⁶ células con la siguiente combinación de anticuerpos: anti-CD14¹(FITC) x anti-CD56² (PE) x anti-CD3³ (PerCP) x anti-CD19⁴ (APC). Las células se sedimentaron en placas de multititulación de 96 pocillos con forma de V (Greiner) y el sobrenadante se retiró. Los sedimentos celulares se resuspendieron en un volumen total de 100 µl que contenía los anticuerpos específicos diluidos en tampón FACS. La incubación se llevó a cabo en oscuridad durante 30 min a 4 °C. Posteriormente, las muestras se lavaron dos veces con tampón FACS y los sedimentos celulares se resuspendieron en tampón FACS para análisis por citometría de flujo.

Detección por citometría de flujo de los linfocitos teñidos por FACS

La recogida de datos se realizó con un BD FACSCalibur™ de 4 colores (Becton Dickinson). Para cada medición, se adquirieron 1x10⁴ células de subpoblaciones definidas de linfocitos. El análisis estadístico se realizó con el programa CellQuest Pro™ (Becton Dickinson) para obtener los porcentajes de las subpoblaciones de linfocitos y para clasificar la intensidad de la expresión de la molécula de la superficie celular. Posteriormente, se correlacionaron los porcentajes de los subconjuntos únicos de linfocitos respecto a los linfocitos totales (es decir, células B más T más NK excluyendo las células mieloides mediante tinción de CD14) como se determina por FACS con el recuento de linfocitos del análisis de sangre diferencial para calcular los números de células absolutos de células T (CD3⁺, CD56⁻, CD14⁻).

La redistribución de células T durante la fase de inicio del tratamiento con MCSP-G4 VH-VL x I2C VH-VL en monos cynomolgus a niveles de dosis de 60, 240 y 1.000 µg/m²/24h se muestra en la Fig 32. Estos animales no mostraron

en absoluto signos de ninguna redistribución de células T durante la fase de inicio del tratamiento, es decir, los recuentos de células T se incrementaron en lugar de disminuir después del inicio del tratamiento. Dado que la redistribución de células T se observa de forma consistente en el 100 % de todos los pacientes sin células diana circulantes, después del inicio del tratamiento con la molécula de unión a CD3 convencional (p. ej., la construcción CD19xCD3 como se describe en WO 99/54440) frente a un epítipo de CD3 dependiente de contexto, se demostró que puede observarse una redistribución de células T sustancialmente menor en ausencia de células diana circulantes después del inicio del tratamiento con una molécula de unión a CD3 de la invención dirigida y generada frente a un epítipo de la cadena CD3 épsilon humana y de primate distinto del chimpancé como se define por la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NOs: 2, 4, 6, u 8 o un fragmento de la misma. Esto es claramente diferente de las moléculas de unión a CD3 dirigidas frente a un epítipo de CD3 dependiente de contexto, como las construcciones descritas en WO 99/54440. Las moléculas de unión frente a epítipos de CD3 independientes de contexto, como se proporcionan (entre otras) en una cualquiera de las SEQ ID NOs: 2, 4, 6, u 8 (o fragmentos de estas secuencias) proporcionan esta redistribución de células T (perjudicial y no deseada) sustancialmente menor. Como la redistribución de células T durante la fase de inicio del tratamiento con moléculas de unión a CD3 es un factor de riesgo importante para eventos adversos en el SNC, las moléculas de unión a CD3 proporcionadas en la presente memoria y capaces de reconocer un epítipo de CD3 independiente de contexto, tienen una ventaja sustancial sobre las moléculas de unión a CD3 conocidas en la técnica y dirigidas frente a epítipos de CD3 dependientes de contexto. De hecho, ninguno de los monos cynomolgus tratados con MCSP-G4 VH-VL x I2C VH-VL mostró ningún signo de síntomas en el SNC.

La independencia de contexto del epítipo de CD3 se demuestra en la presente memoria y corresponde a los primeros 27 aminoácidos N-terminales de CD3 épsilon) o fragmentos de esta cadena de 27 aminoácidos. Este epítipo independiente de contexto se saca de su entorno nativo en el complejo CD3 y se fusiona con secuencias de aminoácidos heterólogas sin pérdida de su integridad estructural. Las moléculas de unión anti-CD3 como se proporcionan en la presente memoria y generadas (y dirigidas) frente a un epítipo de CD3 independiente de contexto proporcionan una mejora clínica sorprendente con respecto a la redistribución de células T y, así, un perfil de seguridad más favorable. Sin pretender la vinculación a ninguna teoría, como su epítipo de CD3 es independiente de contexto, formando un subdominio autónomo autosuficiente sin mucha influencia en el resto del complejo CD3, las moléculas de unión a CD3 proporcionadas en la presente memoria inducen menos cambios alostéricos en la conformación de CD3 que las moléculas de unión a CD3 convencionales (como las moléculas proporcionadas en WO 99/54440), que reconocen epítipos de CD3 dependientes de contexto como las moléculas proporcionadas en WO 99/54440. Como consecuencia (de nuevo sin vinculación a ninguna teoría), la inducción del reclutamiento de Nck2 intracelular por las moléculas de unión a CD3 proporcionadas en la presente memoria también se reduce, lo que da como resultado un menor cambio en la isoforma de las integrinas de las células T y menor adhesión de las células T a las células endoteliales. Se prefiere que las preparaciones de moléculas de unión a CD3 de la invención (dirigidas frente a y generadas frente a un epítipo independiente de contexto como se define en la presente memoria) consistan esencialmente en moléculas monoméricas. Estas moléculas monoméricas son incluso más eficientes (que las moléculas dimericas o multiméricas) para evitar la redistribución de células T y así el riesgo de eventos adversos en el SNC durante la fase de inicio del tratamiento.

23. Generación y caracterización moléculas de cadena única biespecíficas para CD33 y CD3 específicas entre especies

23.1. Generación de células CHO que expresan CD33 humano

La secuencia codificadora de CD33 humano como se publica en GenBank (Número de acceso NM_001772) se obtuvo por síntesis génica según protocolos estándar. El fragmento de la síntesis génica se diseñó de manera que contuviera en primer lugar un sitio Kozak para la expresión de la construcción en eucariotas, seguido por un péptido líder de inmunoglobulina de 19 aminoácidos, seguido en marco por la secuencia codificadora de la proteína CD33 humana madura, seguido en marco por la secuencia codificadora del dipéptido serina glicina, una etiqueta de histidina₆ y un codón de parada (la secuencia de ADNc y de aminoácidos de la construcción se listan como SEQ Nos 525 y 526). El fragmento de la síntesis génica también se diseñó para introducir sitios de restricción al comienzo y al final del fragmento. Los sitios de restricción introducidos, EcoRI en el extremo 5' y Sall en el extremo 3', se utilizaron en los siguientes procedimientos de clonación. El fragmento de la síntesis génica se clonó mediante EcoRI y Sall en un plásmido designado pEF-DHFR (pEF-DHFR se describe en Raum et al. Cancer Immunol Immunother 50 (2001) 141-150) siguiendo protocolos estándar. Los procedimientos mencionados anteriormente se llevaron a cabo según protocolos estándar (Sambrook, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 3ª edición, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, Nueva York (2001)). Un clon con una secuencia de nucleótidos con secuencia verificada se transfirió en células CHO deficientes para DHFR para la expresión de la construcción en eucariotas. La expresión de la proteína en eucariotas en células CHO deficientes para DHFR se realizó como se describe en Kaufmann R.J. (1990) Methods Enzymol. 185, 537-566. La amplificación génica de la construcción se indujo por concentraciones crecientes de metotrexato (MTX) hasta una concentración final de hasta MTX 20 nM.

23.2. Generación de células CHO que expresan el dominio extracelular de CD33 de macaco

La secuencia de ADNc de CD33 de macaco se obtuvo por un conjunto de 3 PCR en ADNc de médula ósea de mono macaco preparada según protocolos estándar. Se usaron las siguientes condiciones de reacción: 1 ciclo a 94 °C

durante 3 minutos seguido por 35 ciclos con 94 °C durante 1 minuto, 53 °C durante 1 minuto y 72 °C durante 2 minutos seguido por un ciclo terminal de 72 °C durante 3 minutos y los siguientes cebadores:

3. cebador directo:

5'-gaggaattcacccatgccgctgctgactgctgcccctgctgtgggcaggggccctggctatgg-3'

5 cebador inverso: 5'-gatttgaactgtatttggtacttcc-3'

4. cebador directo: 5'-attccgcctcctgggatcc-3'

cebador inverso: 5'-gcataggagacattgagctggatgg-3'

5. cebador directo: 5'-gcaccaacctgacctgtcagg-3'

cebador inverso: 5'-agtgggtcgactcactgggtcctgacctctgagtattcg-3'

10 Estas PCR generan tres fragmentos superpuestos, que se aislaron y secuenciaron según protocolos estándar usando los cebadores de PCR, y proporcionaron de esta manera una parte de la secuencia de ADNc de CD33 de macaco desde el segundo nucleótido del codón +2 al tercer nucleótido del codón +340 de la proteína madura. Para generar una construcción para la expresión de CD33 de macaco, se obtuvo un fragmento de ADNc por síntesis génica según protocolos estándar (la secuencia de ADNc y de aminoácidos de la construcción se listan como SEQ Nos 527 y 528).
 15 En esta construcción, la secuencia codificadora de CD33 de macaco desde el aminoácido +3 a +340 de la proteína CD33 madura se fusionó en la secuencia codificadora de CD33 humano reemplazando la secuencia codificadora humana de los aminoácidos +3 a +340. El fragmento de la síntesis génica también se diseñó para que contuviera un sitio Kozak para la expresión de la construcción en eucariotas y sitios de restricción al comienzo y al final del fragmento que contenía el ADNc que codifica esencialmente el dominio extracelular completo de CD33 de macaco, el dominio
 20 transmembrana de CD33 de macaco y un dominio intracelular de CD33 quimérico de macaco-humano. Los sitios de restricción introducidos XbaI en el extremo 5' y Sall en el extremo 3', se utilizaron en los siguientes procedimientos de clonación. El fragmento de la síntesis génica se clonó entonces mediante XbaI y Sall en un plásmido designado pEF-DHFR (pEF-DHFR se describe en Raum et al. Cancer Immunol Immunother 50 (2001) 141-150). Un clon de este plásmido con la secuencia verificada se usó para transfectar células CHO/dhfr- como se ha descrito anteriormente.

25 **23.3. Generación de moléculas de anticuerpo biespecíficas para CD33 y CD3 específicas entre especies**

Clonación de las moléculas de unión específicas entre especies

Generalmente, se diseñaron moléculas de anticuerpo biespecíficas, comprendiendo cada una un dominio con una especificidad de unión específico entre especies para CD3 épsilon humana y de primate distinto del chimpancé, así como un dominio con una especificidad de unión específico entre especies para CD33 humano y de primate distinto
 30 del chimpancé, como se muestra en la siguiente Tabla 6:

Tabla 6: Formatos de moléculas biespecíficas anti-CD3 y anti-CD33 específicas entre especies

SEQ ID (nucl/prot)	Formatos de construcciones de proteínas (N → C)
448/447	AH11HLxH2CHL
394/393	AH3HLxH2CHL
430/429	AC8HLxH2CHL
412/411	AF5HLxH2CHL
484/483	F2HLxH2CHL
520/519	E11HLxH2CHL
466/465	B3HLxH2CHL
502/501	B10HLxH2CHL
450/449	AH11HLxF12QHL

SEQ ID (nucl/prot)	Formatos de construcciones de proteínas (N → C)
396/395	AH3HLxF12QHL
432/431	AC8HLxF12QHL
414/413	AF5HLxF12QHL
486/485	F2HLxF12QHL
522/521	E11HLxF12QHL
468/467	B3HLxF12QHL
504/503	B10HLxF12QHL
452/451	AH11HLxI2CHL
398/397	AH3HLxI2CHL
434/433	AC8HLxI2CHL
416/415	AF5HLxI2CHL
488/487	F2HLxI2CHL
524/523	E11HLxI2CHL
470/469	B3HLxI2CHL
506/505	B10HLxI2CHL

Las construcciones mencionadas anteriormente que contienen los dominios variable de cadena ligera (L) y variable de cadena pesada (H) específicos entre especies para CD33 humano y de macaco y las combinaciones de VH y VL específicas para CD3 específicas entre especies para CD3 humano y de macaco se obtuvieron por síntesis génica. Los fragmentos de la síntesis génica se diseñaron de manera que contuvieran en primer lugar un sitio Kozak para la expresión de la construcción en eucariotas, seguido por un péptido líder de inmunoglobulina de 19 aminoácidos, seguido en marco por la secuencia codificadora de la molécula de anticuerpo biespecífica respectiva, seguido en marco por la secuencia codificadora de una etiqueta de histidina₆ y un codón de parada. El fragmento de la síntesis génica también se diseñó para introducir sitios de restricción adecuados al comienzo y al final del fragmento. Los sitios de restricción introducidos se utilizaron en los siguientes procedimientos de clonación. El fragmento de la síntesis génica se clonó mediante estos sitios de restricción en un plásmido designado pEF-DHFR (pEF-DHFR se describe en Raum et al. Cancer Immunol Immunother 50 (2001) 141-150) siguiendo protocolos estándar. Los procedimientos mencionados anteriormente se llevaron a cabo según protocolos estándar (Sambrook, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 3ª edición, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, Nueva York (2001)). Un clon con una secuencia de nucleótidos con secuencia verificada se transfectó en células CHO deficientes para DHFR para la expresión de la construcción en eucariotas. La expresión de la proteína en eucariotas en células CHO deficientes para DHFR se realizó como se describe por Kaufmann R.J. (1990) Methods Enzymol. 185, 537-566. La amplificación génica de la construcción se indujo por concentraciones crecientes de metotrexato (MTX) hasta una concentración final de hasta MTX 20 nM.

20 **Expresión y purificación de las moléculas de anticuerpo biespecíficas**

Las moléculas de anticuerpo biespecíficas se expresan en células de ovario de hámster chino (CHO). La expresión de la proteína en eucariotas en células CHO deficientes para DHFR se realizó como se describe por Kaufmann R.J. (1990) Methods Enzymol. 185, 537-566. La amplificación génica de las construcciones se indujo por la adición de concentraciones crecientes de MTX hasta concentraciones finales de MTX 20 nM. Después de dos subcultivos de cultivo estacionario, las células se crecieron en botellas de cultivo rotatorias con medio líquido de soja HyQ PF CHO

sin nucleósidos (con L-Glutamina 4,0 mM con 0,1 % de Pluronic F - 68; HyClone) durante 7 días antes de la recogida. Las células se retiraron por centrifugación y el sobrenadante que contenía la proteína expresada se almacenó a -20°C. Alternativamente, las construcciones se expresaron de forma transitoria en células HEK 293. La transfección se realizó con el reactivo 293fectin (Invitrogen, #12347-019) según el protocolo del fabricante.

- 5 Se usaron el Sistema Äkta® Explorer (GE Health Systems) y Software Unicorn® para cromatografía. Se realizó cromatografía de afinidad con metal inmovilizado ("IMAC") usando un Fractogel EMD chelate® (Merck) que se cargó con ZnCl₂ según el protocolo proporcionado por el fabricante. La columna se equilibró con tampón A (tampón fosfato de sodio 20 mM pH 7,2, NaCl 0,1 M) y el sobrenadante del cultivo celular (500 ml) se aplicó a la columna (10 ml) a una velocidad de flujo de 3 ml/min. La columna se lavó con tampón A para eliminar la muestra no unida. La proteína unida se eluyó usando un gradiente de dos etapas de tampón B (tampón fosfato de sodio 20 mM pH 7,2, NaCl 0,1 M, Imidazol 0.5 M) según lo siguiente:

Etapa 1: 20 % de tampón B en 6 volúmenes de columna

Etapa 2: 100 % de tampón B en 6 volúmenes de columna

- 15 Las fracciones de proteína eluída de la etapa 2 se combinaron para purificación adicional. Todos los productos químicos fueron de grado de investigación y se adquirieron en Sigma (Deisenhofen) o Merck (Darmstadt).

20 La cromatografía de filtración en gel se realizó en una columna de grado preparativo HiLoad 16/60 Superdex 200 (GE/Amersham) equilibrada con tampón Equi (Citrato 25 mM, Lisina 200 mM, 5 % de Glicerol, pH 7,2). Las muestras de proteínas eluída (velocidad de flujo 1 ml/min) se sometieron a SDS-PAGE estándar y Transferencia Western para su detección. Antes de la purificación, la columna se calibró para la determinación del peso molecular (kit de marcadores de peso molecular, Sigma MW GF-200). Las concentraciones de proteína se determinaron usando DO280 nm.

25 La proteína de anticuerpo biespecífico purificada se analizó en SDS PAGE en condiciones reductoras realizada con geles preparados comercialmente de Bis Tris al 4-12 % (Invitrogen). La preparación y aplicación de las muestras se realizaron según el protocolo proporcionado por el fabricante. El peso molecular se determinó con el estándar de proteína MultiMark (Invitrogen). El gel se tiñó con Coomassie coloidal (protocolo de Invitrogen). La pureza de la proteína aislada es >95 % como se determina por SDS-PAGE.

El anticuerpo biespecífico tiene un peso molecular de aproximadamente 52 kDa en condiciones nativas como se determina con filtración en gel en PBS. Todas las construcciones se purificaron según este método.

30 Se realizó Transferencia Western usando una membrana Optitran® BA-S83 y el Módulo de Transferencia de Invitrogen según el protocolo proporcionado por el fabricante. Para la detección de la proteína de anticuerpo biespecífico, se usó un anticuerpo anti-Etiqueta His (Penta His, Qiagen). Se usó un anticuerpo anti-Ig de ratón de cabra marcado con fosfatasa alcalina (AP) (Sigma) como anticuerpo secundario y BCIP/NBT (Sigma) como sustrato. Se detectó una única banda a 52 kD correspondiente al anticuerpo biespecífico purificado.

35 **23.4. Análisis por citometría de flujo de la unión de los anticuerpos biespecíficos para CD33 y CD3 específicos entre especies**

40 Con el fin de ensayar la funcionalidad de las construcciones de anticuerpo biespecíficas específicas entre especies respecto a la capacidad de unirse a CD33 y CD3 humano y de macaco, respectivamente, se realizó un análisis FACS. Para este propósito, se usaron células CHO transfectadas con CD33 humano como se describe en el Ejemplo 23.1 y la línea celular de leucemia de células T positiva para CD3 humano HPB-ALL (DSMZ, Braunschweig, ACC483) para ensayar la unión a antígenos humanos. La reactividad de la unión a antígenos de macaco se ensayó usando el transfectante de CD33 de macaco generado descrito en el Ejemplo 23.2 y PBMC de macaco (la preparación de PBMC de macaco se realizó por centrifugación en gradiente de Ficoll de sangre periférica de monos macacos según protocolos estándar). Se incubaron 200.000 células de las líneas celulares de PBMC respectivas durante 30 min. en hielo con 50 µl de la proteína purificada de las construcciones de anticuerpo biespecíficas específicas entre especies (5 µg/ml) o sobrenadante del cultivo celular de células transfectadas que expresan las construcciones de anticuerpo biespecíficas específicas entre especies. Las células se lavaron dos veces en PBS con 2 % de FCS y la unión de la construcción se detectó con un anticuerpo anti-His murino (anticuerpo Penta His; Qiagen; diluido 1:20 en 50 µl de PBS con 2 % de FCS). Después de lavar, los anticuerpos anti-His unidos se detectaron con un anticuerpo específico de Fc gamma (Dianova) conjugado con ficoeritrina, diluido 1:100 en PBS con 2 % de FCS. El sobrenadante de las células CHO no transfectadas se usó como control negativo.

50 Se realizó citometría de flujo en un aparato FACS-Calibur; se usó el software CellQuest para adquirir y analizar los datos (Becton Dickinson biosciences, Heidelberg). La tinción para FACS y la medición de la intensidad de la fluorescencia se realizaron como se describe en Current Protocols in Immunology (Coligan, Kruisbeek, Margulies, Shevach y Strober, Wiley-Interscience, 2002).

55 La unión biespecífica a CD3 humano y de primate distinto del chimpancé de las moléculas de unión a CD3 de la invención fue claramente detectable como se muestra en Figura 33. En el análisis FACS, todas las construcciones

muestran unión a CD3 y CD33 comparado con los controles negativos respectivos. Se demuestra la especificidad entre especies de los anticuerpos biespecíficos para los antígenos CD3 y CD33 humanos y de macaco.

23.5. Bioactividad de los anticuerpos biespecíficos para CD33 y CD3 específicos entre especies

5 La bioactividad de los anticuerpos biespecíficos generados se analizó por ensayos de citotoxicidad de liberación de cromo 51 (^{51}Cr) in vitro usando las líneas celulares positivas para CD33 descritas en los Ejemplos 23.1 y 23.2. Como células efectoras, se usaron PBMC humanas deplecionadas de CD4/CD56 estimuladas o la línea de células T de macaco 4119LnPx como se especifica en las figuras respectivas.

La generación de PBMC humanas estimuladas se realizó como sigue:

10 Se recubrió una placa Petri (85 mm de diámetro, Nunc) con un anticuerpo específico anti-CD3 disponible comercialmente (p. ej., OKT3, Othoclone) en una concentración final de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ durante 1 hora a 37 °C. La proteína no unida se eliminó por una etapa de lavado con PBS. Las PBMC frescas se aislaron de sangre periférica (30 - 50 ml de sangre humana) por centrifugación en gradiente de Ficoll según protocolos estándar. Se añadieron 3 - 5 $\times 10^7$ PBMC a la placa petri precubierta en 50 ml de RPMI 1640 con glutamina estabilizada / 10 % de FCS / 20 U/ml de IL-2 (Proleukin, Chiron) y se estimularon durante 2 días. Al tercer día, las células se recogieron y se lavaron una vez con RPMI 1640. Se añadió IL-2 a una concentración final de 20 U/ml y las células se cultivaron de nuevo durante un día en el mismo medio de cultivo celular que anteriormente.

15 Las células diana se lavaron dos veces con PBS y se marcaron con 11,1 MBq de ^{51}Cr en un volumen final de 100 μl de RPMI con 50 % de FCS durante 45 minutos a 37 °C. Posteriormente, las células diana marcadas se lavaron 3 veces con 5 ml de RPMI y se usaron entonces en el ensayo de citotoxicidad. El ensayo se realizó en una placa de 96 pocillos en un volumen total de 250 μl de RPMI suplementado (como anteriormente) con una relación E:D de 10:1. Se aplicó 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de las moléculas de anticuerpo biespecíficas específicas entre especies y 20 diluciones de tres veces de las mismas. El tiempo del ensayo fue 18 horas y la citotoxicidad se midió como valores relativos de cromo liberado en el sobrenadante relacionado con la diferencia de lisis máxima (adición de Tritón-X) y lisis espontánea (sin células efectoras). Todas las mediciones se hicieron en cuadruplicado. La medición de la actividad de cromo en los sobrenadantes se realizó con un contador gamma Wizard 3" (Perkin Elmer Life Sciences GmbH, Colonia, Alemania). El análisis de los datos experimentales se realizó con Prism 4 para Windows (versión 4.02, GraphPad Software Inc., San Diego, California, EEUU). Las curvas de respuesta a la dosis sigmoidales tienen típicamente valores de $R^2 > 0,90$ como se determina por el software. Los valores de CE_{50} calculados por el programa de análisis se usaron para la comparación de la bioactividad.

20 Como se muestra en Figura 34, todas las construcciones biespecíficas específicas entre especies generadas demuestran actividad citotóxica frente a células diana positivas para CD33 humanas incitadas por PBMC humanas deplecionadas de CD4/CD56 estimuladas y frente a células diana positivas para CD33 de macaco incitadas por la línea de células T de macaco 4119LnPx.

24. Generación y caracterización de moléculas de cadena única biespecíficas para CAIX y CD3 específicas entre especies

24.1 Generación de células CHO que expresan CAIX humano

35 La secuencia codificadora de CAIX humano como se publica en GenBank (Número de acceso NM_001216) se obtuvo por síntesis génica según protocolos estándar. El fragmento de la síntesis génica se diseñó de manera que contuviera la secuencia codificadora de la proteína CAIX humana incluyendo su péptido líder (la secuencia de ADNc y de aminoácidos de la construcción se listan como SEQ Nos 604 y 605). El fragmento de la síntesis génica también se diseñó para introducir sitios de restricción al comienzo y al final del fragmento. Los sitios de restricción introducidos, XbaI en el extremo 5' y Sall en el extremo 3', se utilizaron en los siguientes procedimientos de clonación. El fragmento de la síntesis génica se clonó mediante XbaI y Sall en un plásmido designado pEF-DHFR (pEF-DHFR se describe en Raum et al. Cancer Immunol Immunother 50 (2001) 141-150) siguiendo protocolos estándar. Los procedimientos mencionados anteriormente se llevaron a cabo según protocolos estándar (Sambrook, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 3ª edición, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, Nueva York (2001)). Un clon con una secuencia de nucleótidos con secuencia verificada se transfirió en células CHO deficientes para DHFR para la expresión de la construcción en eucariotas. La expresión de la proteína en eucariotas en células CHO deficientes para DHFR se realizó como se describe por Kaufmann R.J. (1990) Methods Enzymol. 185, 537-566. La amplificación génica de la construcción se indujo por concentraciones crecientes de metotrexato (MTX) hasta una concentración final de hasta MTX 20 nM.

24.2 Generación de células CHO que expresan CAIX de macaco

40 La secuencia codificadora de CAIX de macaco como se publica en GenBank (Número de acceso XM_001088481) se obtuvo por síntesis génica según protocolos estándar. El fragmento de la síntesis génica se diseñó de manera que contuviera la secuencia codificadora de la proteína CAIX de macaco incluyendo su péptido líder (la secuencia de ADNc y de aminoácidos de la construcción se listan como SEQ Nos 606 y 607). El fragmento de la síntesis génica también se diseñó para introducir sitios de restricción al comienzo y al final del fragmento. Los sitios de restricción

introducidos, XbaI en el extremo 5' y SalI en el extremo 3', se utilizaron en los siguientes procedimientos de clonación. El fragmento de la síntesis génica se clonó mediante XbaI y SalI en un plásmido designado pEF-DHFR (pEF-DHFR se describe en Raum et al. Cancer Immunol Immunother 50 (2001) 141-150) siguiendo protocolos estándar. Los procedimientos mencionados anteriormente se llevaron a cabo según protocolos estándar (Sambrook, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 3ª edición, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, Nueva York (2001)). Un clon con una secuencia de nucleótidos con secuencia verificada se transfectó en células CHO deficientes para DHFR para la expresión de la construcción en eucariotas. La expresión de la proteína en eucariotas en células CHO deficientes para DHFR se realizó como se describe por Kaufmann R.J. (1990) Methods Enzymol. 185, 537-566. La amplificación génica de la construcción se indujo por concentraciones crecientes de metotrexato (MTX) hasta una concentración final de hasta MTX 20 nM.

24.3 Generación de moléculas de cadena única biespecíficas para CAIX y CD3 específicas entre especies

Clonación de las moléculas de unión específicas entre especies

Generalmente, se diseñaron moléculas de anticuerpo de cadena única biespecíficas, comprendiendo cada una un dominio con una especificidad de unión específico entre especies para CD3 épsilon humana y de primate distinto del chimpancé, así como un dominio con una especificidad de unión específico entre especies para CAIX humano y de primate distinto del chimpancé, como se muestra en la siguiente Tabla 7:

Tabla 7: Formatos de moléculas de anticuerpo de cadena única biespecíficas anti-CD3 y anti-CAIX específicas entre especies

SEQ ID (nucl/prot)	Formatos de construcciones de proteínas (N → C)
539/538	CA9-A8 HL x H2C HL
571/570	CA9-B2 HL x H2C HL
557/556	CA9-E8 HL x I2C HL
543/542	CA9-A8 HL x I2C HL
575/574	CA9-B2 HL x I2C HL
541/540	CA9-A8 HL x F12Q HL
573/572	CA9-B2 HL x F12Q HL

Las construcciones mencionadas anteriormente que contienen los dominios variable de cadena ligera (L) y variable de cadena pesada (H) específicos entre especies para CAIX humano y de macaco y las combinaciones de VH y VL específicas de CD3 específicas entre especies para CD3 humano y de macaco se obtuvieron por síntesis génica. Los fragmentos de la síntesis génica se diseñaron de manera que contuvieran en primer lugar un sitio Kozak para la expresión de la construcción en eucariotas, seguido por un péptido líder de inmunoglobulina de 19 aminoácidos, seguido en marco por la secuencia codificadora de la molécula de anticuerpo de cadena única biespecífica respectiva, seguido en marco por la secuencia codificadora de una etiqueta de 6 histidinas y un codón de parada. El fragmento de la síntesis génica también se diseñó para introducir sitios de restricción adecuados al comienzo y al final del fragmento. Los sitios de restricción introducidos se utilizaron en los siguientes procedimientos de clonación. El fragmento de la síntesis génica se clonó mediante estos sitios de restricción en un plásmido designado pEF-DHFR (pEF-DHFR se describe en Raum et al. Cancer Immunol Immunother 50 (2001) 141-150) siguiendo protocolos estándar. Los procedimientos mencionados anteriormente se llevaron a cabo según protocolos estándar (Sambrook, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 3ª edición, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, Nueva York (2001)). Un clon con una secuencia de nucleótidos con secuencia verificada se transfectó en células CHO deficientes para DHFR para la expresión de la construcción en eucariotas. La expresión de la proteína en eucariotas en células CHO deficientes para DHFR se realizó como se describe por Kaufmann R.J. (1990) Methods Enzymol. 185, 537-566. La amplificación génica de la construcción se indujo por concentraciones crecientes de metotrexato (MTX) hasta una concentración final de hasta MTX 20 nM.

24.4. Expresión y purificación de las moléculas de anticuerpo de cadena única biespecíficas

Las moléculas de anticuerpo de cadena única biespecíficas se expresaron en células de ovario de hámster chino (CHO). La expresión de la proteína en eucariotas en células CHO deficientes para DHFR se realizó como se describe

por Kaufmann R.J. (1990) *Methods Enzymol.* 185, 537-566. La amplificación génica de las construcciones se indujo por la adición de concentraciones crecientes de MTX hasta concentraciones finales de MTX 20 nM. Después de dos subcultivos de cultivo estacionario, las células se crecieron en botellas de cultivo rotatorias con medio líquido de soja HyQ PF CHO sin nucleósidos (con L-Glutamina 4,0 mM con 0,1 % de Pluronic F - 68; HyClone) durante 7 días antes de la recogida. Las células se retiraron por centrifugación y el sobrenadante que contenía la proteína expresada se almacenó a -20°C. Alternativamente, las construcciones se expresaron de forma transitoria en células HEK 293. La transfección se realizó con el reactivo 293fectin (Invitrogen, #12347-019) según el protocolo del fabricante.

Se usaron el Sistema Äkta® Explorer (GE Health Systems) y Software Unicorn® para cromatografía. Se realizó cromatografía de afinidad con metal inmovilizado ("IMAC") usando un Fractogel EMD chelate® (Merck) que se cargó con ZnCl₂ según el protocolo proporcionado por el fabricante. La columna se equilibró con tampón A (tampón fosfato de sodio 20 mM pH 7,2, NaCl 0,1 M) y el sobrenadante del cultivo celular (500 ml) se aplicó a la columna (10 ml) a una velocidad de flujo de 3 ml/min. La columna se lavó con tampón A para eliminar la muestra no unida. La proteína unida se eluyó usando un gradiente de dos etapas de tampón B (tampón fosfato de sodio 20 mM pH 7,2, NaCl 0,1 M, imidazol 0,5 M) según lo siguiente:

Etapa 1: 20 % de tampón B en 6 volúmenes de columna

Etapa 2: 100 % de tampón B en 6 volúmenes de columna

Las fracciones de proteína eluida de la etapa 2 se combinaron para purificación adicional. Todos los productos químicos son de grado de investigación y se adquirieron en Sigma (Deisenhofen) o Merck (Darmstadt).

La cromatografía de filtración en gel se realizó en una columna de grado preparativo HiLoad 16/60 Superdex 200 (GE/Amersham) equilibrada con tampón Equi (Citrato 25 mM, Lisina 200 mM, 5 % Glicerol, pH 7,2). Las muestras de proteínas eluidas (velocidad de flujo 1 ml/min) se sometieron a SDS-PAGE estándar y Transferencia Western para su detección. Antes de la purificación, la columna se calibró para la determinación del peso molecular (kit de marcadores de peso molecular, Sigma MW GF-200). Las concentraciones de proteína se determinaron usando DO280 nm.

La proteína de anticuerpo de cadena única biespecífico purificada se analizó en SDS PAGE en condiciones reductoras realizada con geles preparados comercialmente de Bis Tris al 4-12 % (Invitrogen). La preparación y aplicación de las muestras se realizaron según el protocolo proporcionado por el fabricante. El peso molecular se determinó con el estándar de proteínas MultiMark (Invitrogen). El gel se tiñó con Coomassie coloidal (protocolo de Invitrogen). La pureza de la proteína aislada es >95 % como se determina por SDS-PAGE.

El anticuerpo de cadena única biespecífico tiene un peso molecular de aproximadamente 52 kDa en condiciones nativas como se determina con filtración en gel en PBS. Todas las construcciones se purificaron según este método.

Se realizó Transferencia Western usando una membrana Optitrans® BA-S83 y el Módulo de Transferencia de Invitrogen según el protocolo proporcionado por el fabricante. Para detección de la proteína de anticuerpo de cadena única biespecífico, se usó un anticuerpo anti-Etiqueta His (Penta His, Qiagen). Se usó un anticuerpo anti-Ig de ratón de cabra marcado con fosfatasa alcalina (AP) (Sigma) como anticuerpo secundario y BCIP/NBT (Sigma) como sustrato. Se detectó una única banda a 52 kD correspondiente al anticuerpo de cadena única biespecífico purificado.

24.5 Análisis por citometría de flujo de la unión de los anticuerpos biespecíficos para CAIX y CD3 específicos entre especies

Con el fin de ensayar la funcionalidad de las construcciones de anticuerpo biespecíficas específicas entre especies respecto a la capacidad de unirse a CAIX y CD3 humano y de macaco, respectivamente, se realizó un análisis FACS. Para este propósito, se usaron células CHO transfectadas con CAIX humano como se describe en el Ejemplo 24.1 y la línea celular de leucemia de células T positiva para CD3 humana HPB-ALL (DSMZ, Braunschweig, ACC483) para ensayar la unión a antígenos humanos. La reactividad de la unión a antígenos de macaco se ensayó usando el transfectante de CAIX de macaco generado descrito en el Ejemplo 24.2 y una línea de células T de macaco 4119LnPx (proporcionada amablemente por el Prof. Fickenscher, Hygiene Institute, Virology, Erlangen-Nuernberg; publicado en Knappe A, et al., y Fickenscher H., *Blood* 2000, 95, 3256-61). Se incubaron 200.000 células de las líneas celulares respectivas durante 30 min en hielo con 50 µl de la proteína purificada de las construcciones de anticuerpo biespecíficas específicas entre especies (2 µg/ml) o sobrenadante del cultivo celular de células transfectadas que expresan las construcciones de anticuerpo biespecíficas específicas entre especies. Las células se lavaron dos veces en PBS con 2 % de FCS y la unión de la construcción se detectó con un anticuerpo anti-His murino (anticuerpo frente a Penta His; Qiagen; diluido 1:20 en 50 µl de PBS con 2 % de FCS). Después de lavar, los anticuerpos anti-His unidos se detectaron con un anticuerpo específico de Fc gamma (Dianova) conjugado con ficoeritrina, diluido 1:100 en PBS con 2 % de FCS. El sobrenadante de las células CHO no transfectadas se usó como control negativo para la unión a las líneas de células T. Una construcción de cadena única con especificidad de diana irrelevante se usó como control negativo para la unión a las células CHO transfectadas con CAIX.

Se realizó citometría de flujo en un aparato FACS-Calibur; se usó el software CellQuest para adquirir y analizar los datos (Becton Dickinson biosciences, Heidelberg). La tinción para FACS y la medición de la intensidad de la

fluorescencia se realizaron como se describe en Current Protocols in Immunology (Coligan, Kruisbeek, Margulies, Shevach y Strober, Wiley-Interscience, 2002).

5 La unión biespecífica de las moléculas de cadena única listadas anteriormente, que son específicas entre especies para CAIX y específicas entre especies para CD3 humano y de primate distinto del chimpancé fue claramente detectable como se muestra en la Figura 35. En el análisis FACS, todas las construcciones mostraron unión a CD3 y CAIX, comparado con los controles negativos respectivos. Se demostró la especificidad entre especies de los anticuerpos biespecíficos para los antígenos CD3 y CAIX humano y de primate distinto del chimpancé.

24.6 Bioactividad de los anticuerpos de cadena única biespecíficos para CAIX y CD3 específicos entre especies

10 La bioactividad de los anticuerpos de cadena única biespecíficos generados se analizó por ensayos de citotoxicidad de liberación de cromo 51 (^{51}Cr) in vitro usando las líneas celulares positivas para CAIX descritas en los Ejemplos 24.1 y 24.2. Como células efectoras, se usaron PBMC humanas deplecionadas de CD4/CD56 estimuladas, PBMC humanas estimuladas o la línea de células T de macaco 4119LnPx como se especifica en las figuras respectivas.

La generación de PBMC humanas estimuladas se realizó como sigue:

15 Se recubrió una placa Petri (145 mm de diámetro, Greiner) con un anticuerpo específico anti-CD3 disponible comercialmente (p. ej., OKT3, Othoclone) en una concentración final de 1 $\mu\text{g/ml}$ durante 1 hora a 37 °C. La proteína no unida se eliminó por una etapa de lavado con PBS.

20 Las PBMC frescas se aislaron de sangre periférica (30 - 50 ml de sangre humana) por centrifugación en gradiente de Ficoll según protocolos estándar. Se añadieron 3 - 5 x 10⁷ PBMC a la placa petri precubierta en 120 ml de RPMI 1640 con glutamina estabilizada / 10 % de FCS / 20 U/ml de IL-2 (Proleukin, Chiron) y se estimularon durante 2 días. Al tercer día, las células se recogieron y se lavaron una vez con RPMI 1640. Se añadió IL-2 a una concentración final de 20 U/ml y las células se cultivaron de nuevo durante un día en el mismo medio de cultivo celular que anteriormente.

La generación de las PBMC deplecionadas de CD4/CD56 estimuladas se realizó como sigue:

25 Se recubrió una placa Petri (145 mm de diámetro, Greiner) con un anticuerpo específico anti-CD3 disponible comercialmente (p. ej., OKT3, Othoclone) en una concentración final de 1 $\mu\text{g/ml}$ durante 1 hora a 37 °C. La proteína no unida se eliminó por una etapa de lavado con PBS.

30 Las PBMC frescas se aislaron de sangre periférica (30 - 50 ml de sangre humana) por centrifugación en gradiente de Ficoll según protocolos estándar. Se añadieron 3 - 5 x 10⁷ PBMC a la placa petri precubierta en 120 ml de RPMI 1640 con glutamina estabilizada / 10 % de FCS / 20 U/ml de IL-2 (Proleukin, Chiron) y se estimularon durante 2 días. Al tercer día, las células se recogieron y se lavaron una vez con RPMI 1640. Se añadió IL-2 a una concentración final de 20 U/ml y las células se cultivaron de nuevo durante un día en el mismo medio de cultivo celular que anteriormente. Mediante la depleción de las células T CD4+ y las células NK CD56+ según protocolos estándar, se enriquecieron los linfocitos T citotóxicos (CTL) CD8+.

35 Las células diana se lavaron dos veces con PBS y se marcaron con 11,1 MBq de ^{51}Cr en un volumen final de 100 μl de RPMI con 50 % de FCS durante 45 minutos a 37 °C. Posteriormente, las células diana marcadas se lavaron 3 veces con 5 ml de RPMI y se usaron entonces en el ensayo de citotoxicidad. El ensayo se realizó en una placa de 96 pocillos en un volumen total de 250 μl de RPMI suplementado (como anteriormente) con diferentes relaciones E:D de 5:1 a 50:1, que se especifican en las figuras respectivas. Se aplicaron 1 $\mu\text{g/ml}$ de las moléculas de anticuerpo de cadena única biespecíficas específicas entre especies y 20 diluciones de tres veces de las mismas. El tiempo del ensayo fue 16 horas y la citotoxicidad se midió como valores relativos de cromo liberado en el sobrenadante relacionado con la diferencia de lisis máxima (adición de Tritón-X) y lisis espontánea (sin células efectoras). Todas las mediciones se hicieron en cuadruplicado. La medición de la actividad de cromo en los sobrenadantes se realizó con un contador gamma Wizard 3" (Perkin Elmer Life Sciences GmbH, Colonia, Alemania). El análisis de los datos experimentales se realizó con Prism 4 para Windows (versión 4.02, GraphPad Software Inc., San Diego, California, EEUU). Las curvas de respuesta a la dosis sigmoidales tienen típicamente valores de R² >0,90 como se determina por el software. Los valores de CE₅₀ calculados por el programa de análisis se usaron para la comparación de la bioactividad.

45 Como se muestra en la Figura 36, todas las construcciones de anticuerpo de cadena única biespecíficas específicas entre especies generadas demostraron actividad citotóxica frente a células diana positivas para CAIX humano incitadas por PBMC humanas deplecionadas de CD4/CD56 estimuladas o PBMC estimuladas y frente a células diana positivas para CAIX de macaco incitadas por la línea de células T de macaco 4119LnPx.

25. Generación y caracterización de moléculas de cadena única biespecíficas para EpCAM y CD3 específicas entre especies

Construcción de anticuerpos biespecíficos específicos para EpCAM

La base para la construcción de anticuerpos biespecíficos específicos para EpCAM fue el anticuerpo específico de EpCAM completamente humano HD69 (Raum et al. Cancer Immunol Immunother (2001) 50: 141 ff). La VH y la VL se amplificaron por PCR a partir de ADN de HD69 según métodos estándar. VH y VL se clonaron posteriormente en un plásmido, formando así un scFv funcional (orientación VH-Conector-VL) según protocolos estándar. Esta construcción scFv se amplificó entonces por PCR usando cebadores que introducían un sitio de restricción BsrGI N-terminal y BspE1 C-terminal útiles para la clonación funcional en el formato de anticuerpo biespecífico (5'-HD69-BsrGI: 5'-gacaggtgtacactccgaggtgcagctgctcgagtctgg-3'; 3'-HD69-BspE1: 5'-tgatagtcggattgatctccagcttggtcc-3'). El producto de PCR se clonó entonces en tres vectores de expresión adecuados, comprendiendo cada uno una combinación de VH y VL específica de CD3 específica entre especies para CD3 humano y de macaco (H2C HL, F12Q HL e I2C, respectivamente), codificando así tres construcciones biespecíficas funcionales HD69 HL x H2C HL, HD69 HL x F12Q HL y HD69 HL x I2C HL. Las construcciones se transfectaron entonces en células CHO deficientes para DHFR por electroporación para la transfección estable según procedimientos estándar, dando como resultado tres combinaciones de células transfectadas, expresando cada combinación uno de los tres productos biespecíficos.

Tabla 8: Formatos de moléculas de anticuerpo de cadena única biespecíficas anti-EpCAM que comprenden una parte anti-CD3 específica entre humano-cynomolgus

SEQ ID (nucl/prot)	Formatos de construcciones de proteínas (N → C)
589/588	HD69 HL x H2C HL
591/590	HD69 HL x F12Q HL
593/592	HD69 HL x I2C HL

La bioactividad de los anticuerpos de cadena única biespecíficos generados (en sobrenadantes de cultivo de células CHO que expresan las construcciones biespecíficas respectivas) se analizó por ensayos de citotoxicidad de liberación de cromo 51 in vitro usando la línea celular positiva para EpCAM transfectada CHO-EpCAM (que expresa EpCAM humano unido en la superficie, publicado en Raum et al. Cancer Immunol Immunother (2001) 50: 141 ff) como células diana. Como células efectoras, se usaron células T positivas para CD8 humanas estimuladas. Como se muestra en la Figura 37, todas las construcciones de anticuerpo de cadena única biespecíficas generadas revelaron actividad citotóxica frente a células diana positivas para EpCAM humano incitadas por células CD8+ humanas. Como un control negativo, se usó el sobrenadante del cultivo de células CHO no transfectadas, que no reveló una citotoxicidad detectable.

Para demostrar la actividad de especificidad cruzada de las construcciones biespecíficas generadas en el brazo CD3, se realizaron análisis de citometría de flujo en los que se verificó la unión de las construcciones a células que expresan CD3 humano y células que expresan CD3 de macaco. Además, se examinó la especificidad para células positivas para EpCAM.

Brevemente, se usaron células CHO transfectadas con EpCAM humano y células T positivas para CD3 humano en PBMC humanas aisladas para ensayar la unión a antígenos humanos. La reactividad de la unión a antígeno CD3 de macaco se ensayó usando una línea de células T de macaco 4119LnPx (proporcionada amablemente por el Prof. Fickenscher, Hygiene Institute, Virology, Erlangen-Nuernberg; published in Knappe A, et al., y Fickenscher H., Blood 2000, 95, 3256-61). Se incubaron 200.000 células de las líneas celulares respectivas durante 30 min en hielo con sobrenadante del cultivo celular de células transfectadas que expresan las construcciones de anticuerpo biespecíficas para CD3 específicas entre especies. Las células se lavaron dos veces en PBS con 2 % de FCS y la unión de la construcción se detectó con un anticuerpo anti-His murino (anticuerpo frente a Penta His; Qiagen; diluido 1:20 en 50 µl PBS con 2 % de FCS). Después de lavar, los anticuerpos anti-His unidos se detectaron con un anticuerpo específico de Fc gamma (Dianova) conjugado con ficoeritrina, diluido 1:100 en PBS con 2 % de FCS. El sobrenadante de las células CHO no transfectadas se usó como control negativo para la unión a las líneas de células T.

Se realizó citometría de flujo se realizó en un aparato FACS-Calibur y se usó software CellQuest para adquirir y analizar los datos (Becton Dickinson biosciences, Heidelberg). La tinción para FACS y la medición de la intensidad de la fluorescencia se realizaron como se describe en Current Protocols in Immunology (Coligan, Kruisbeek, Margulies, Shevach y Strober, Wiley-Interscience, 2002).

La unión específica de las moléculas de cadena única, que son específicas para EpCAM humano y específicas entre especies para CD3 humano y de macaco fue claramente detectable como se muestra en la Figura 38. En el análisis por citometría de flujo, todas las construcciones mostraron unión a CD3 y EpCAM comparado con los controles negativos respectivos y la línea de células CHO negativa para EpCAM/CD3.

26 Generación y caracterización de moléculas de cadena única biespecíficas para EGFRvIII y CD3 específicas entre especies

26.1 Generación y expresión de células CHO transfectadas con EGFRvIII humano

La secuencia codificadora del dominio C-terminal, transmembrana y citoplásmico del receptor del factor de crecimiento epidérmico mutante (DeltaEGFR, de2-7 EGFR, o EGFRvIII se usan como sinónimos) que contiene una delección de 267 aminoácidos del dominio extracelular (Kuan CT, Wikstrand CJ, Bigner DD: EGF mutant receptor vIII as a molecular target in cancer therapy; *Endocr Relat Cancer*. 2001 Jun;8(2):83-96) se obtuvo por síntesis génica según protocolos estándar. El fragmento de la síntesis génica se diseñó de manera que contuviera en primer lugar un sitio Kozak para permitir la expresión de la construcción en eucariotas seguido por la secuencia codificadora de un péptido líder de 24 aminoácidos seguido en marco por la secuencia codificadora del dominio extracelular C-terminal humano, el dominio transmembrana y citoplásmico y un codón de parada. El fragmento de la síntesis génica también se diseñó para introducir sitios de restricción al comienzo y al final del fragmento de ADN. Para propósitos de clonación, se añadieron los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción XbaI y Sall en el extremo 5' y 3', respectivamente. El ADN génico sintético se digirió posteriormente con XbaI y Sall, se ligó en el vector de expresión digerido apropiadamente pEF-DHFR, y se transformó en *E.coli*. Un clon con la secuencia de nucleótidos verificada (la secuencia de ADNc y la secuencia de aminoácidos de la construcción recombinante se listan como SEQ NOs 599 y 598) se transfectó en células CHO deficientes para DHFR para la expresión de la construcción en eucariotas. La expresión de la proteína en eucariotas en células CHO deficientes para DHFR se realizó como se ha descrito anteriormente.

26.2 Generación y expresión del de EGFR vIII de cynomolgus

En analogía con el ejemplo 26.1, se creó la variante de EGFR vIII de cynomolgus por delección de los 267 aminoácidos del dominio extracelular e inserción del nuevo aminoácido glicina en el sitio de la fusión (aminoácido no. 6). El fragmento de la síntesis génica se diseñó de manera que contuviera en primer lugar un sitio Kozak para permitir la expresión de la construcción en eucariotas seguido por la secuencia codificadora de un péptido líder de 24 aminoácidos seguido en marco por la secuencia codificadora del dominio extracelular C-terminal de cynomolgus, el dominio transmembrana y citoplásmico (ambos humanos) y un codón de parada. El fragmento de la síntesis génica también se diseñó para introducir sitios de restricción al comienzo y al final del fragmento de ADN. Los sitios de restricción introducidos XbaI en el extremo 5' y Sall en el extremo 3', se utilizaron en los siguientes procedimientos de clonación. El fragmento se digirió con XbaI / Sall y se clonó en pEF-DHFR siguiendo protocolos estándar. Se usó un plásmido con secuencia verificada para transfectar células CHO/dhfr- (ATCC No. CRL 9096; cultivadas en RPMI 1640 con glutamina estabilizada obtenido de Biochrom AG Berlín, Alemania, suplementado con 10 % de FCS, 1 % de penicilina/estreptomocina, todos obtenidos de Biochrom AG Berlín, Alemania y nucleósidos de una disolución madre de reactivos de grado de cultivo celular obtenidos de Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Alemania, a una concentración final de 10 µg/ml de Adenosina, 10 µg/ml de Desoxiadenosina y 10 µg/ml de Timidina, en un incubador a 37 °C, 95 % de humedad y 7 % de CO₂). La transfección se realizó usando el Reactivo de Transfección PoliFect (Qiagen GmbH, Hilden, Alemania) y 5 µg de ADN plasmídico según el protocolo del fabricante. Después de un cultivo de 24 horas, las células se lavaron una vez con PBS y se cultivaron de nuevo en el medio de cultivo celular mencionado anteriormente excepto en que el medio no estaba suplementado con nucleósidos y se usó FCS dializado (obtenido de Biochrom AG Berlín, Alemania). Así, el medio del cultivo celular no contenía nucleósidos y de esta manera se aplicó la selección en las células transfectadas. Aproximadamente 14 días después de la transfección, se observó el crecimiento de las células resistentes. Después de 7 a 14 días adicionales, los transfectantes se ensayaron como positivos para la expresión de la construcción mediante FACS.

26.3 Generación de moléculas de cadena única biespecíficas para EGFRvIII y CD3 específicas entre especies

Generalmente, se diseñaron moléculas de anticuerpo de cadena única biespecíficas, comprendiendo cada una un dominio con una especificidad de unión para el antígeno CD3 humano y de primate distinto del chimpancé, así como un dominio con una especificidad de unión para el antígeno EGFRvIII humano y de primate distinto del chimpancé, como se muestra en la siguiente Tabla 9:

Tabla 9: Formatos de moléculas de anticuerpo de cadena única biespecíficas anti-CD3 y anti-EGFRvIII específicas entre especies

SEQ ID (nucl/prot)	Formatos de construcciones de proteínas (N → C)
708/707	V90F5 HL x I2C HL
680/679	V96A9 HL x I2C HL
694/693	V98B11 HL x I2C HL
722/721	V11A11 HL x I2C HL
736/735	V11F6 HL x I2C HL

SEQ ID (nucl/prot)	Formatos de construcciones de proteínas (N → C)
750/749	V11G7 HL x I2C HL
764/763	V17F5 HL x I2C HL
778/777	V11A4 HL x I2C HL
792/791	V17C8 HL x I2C HL
806/805	V17G9 HL x I2C HL
820/819	V17B11 HL x I2C HL
834/833	V17F11 HL x I2C HL
848/847	V16B7 HL x I2C HL
862/861	V17A4 HL x I2C HL
648/647	V207C12 HL x I2C HL

Las construcciones mencionadas anteriormente que contienen los dominios variable de cadena ligera (L) y variable cadena pesada (H) específicos entre especies para EGFR VIII humano y de cynomolgus y las combinaciones de VH y VL específicas de CD3 específicas entre especies para CD3 humano y de macaco se obtuvieron por síntesis génica. Los fragmentos de la síntesis génica se diseñaron de manera que contuvieran en primer lugar un sitio Kozak para la expresión de la construcción en eucariotas, seguido por un péptido líder de inmunoglobulina de 19 aminoácidos, seguido en marco por la secuencia codificadora de la molécula de anticuerpo de cadena única biespecífica respectiva, seguido en marco por la secuencia codificadora de una etiqueta de 6 histidinas y un codón de parada. El fragmento de la síntesis génica también se diseñó para introducir sitios de restricción adecuados al comienzo y al final del fragmento. Los sitios de restricción introducidos se utilizaron en los siguientes procedimientos de clonación. El fragmento de la síntesis génica se clonó mediante estos sitios de restricción en un plásmido designado pEF-DHFR siguiendo protocolos estándar. Un clon con una secuencia de nucleótidos con secuencia verificada se transfectó en células CHO deficientes para DHFR para la expresión de la construcción en eucariotas. La expresión de la proteína en eucariotas en células CHO deficientes para DHFR se realizó como se describe por Kaufmann R.J. (1990) *Methods Enzymol.* 185, 537-566. La amplificación génica de la construcción se indujo por concentraciones crecientes de metotrexato (MTX) hasta una concentración final de hasta MTX 20 nM. Alternativamente, las construcciones se transfectaron en células CHO deficientes para DHFR de una manera transitoria según protocolos estándar.

Los experimentos de unión por FACS se realizaron con la línea celular CHO transfectada con EGFRvIII humano para evaluar la capacidad de unión al antígeno EGFRvIII humano. La especificidad entre especies a tejido de cynomolgus se ensayó utilizando las células CHO transfectadas con el EGFRvIII de cynomolgus. Los mismos cambios en las líneas celulares se aplican a los ensayos de citotoxicidad realizados con los anticuerpos de cadena única biespecíficos para EGFRvIII y CD3 específicos entre especies. Aparte de esto, los ensayos se realizaron como se describe en los Ejemplos 4 y 5.

Como se representa en las Figuras 39, los anticuerpos de cadena única biespecíficos para EGFRvIII y CD3 específicos entre especies generados demostraron unión tanto a antígenos humanos como de cynomolgus y demostraron que son completamente específicos entre especies.

Como se muestra en las Figuras 40, todas las construcciones de anticuerpo de cadena única biespecíficas específicas entre especies generadas revelaron actividad citotóxica frente a células diana positivas para EGFRvIII humano incitadas por células CD8+ humanas y células diana positivas para EGFRvIII de cynomolgus incitadas por la línea de células T de macaco 4119LnPx. Como un control negativo, se ha usado un anticuerpo de cadena única biespecífico irrelevante.

27. Generación y caracterización de moléculas de cadena única biespecíficas para IgE y CD3 específicas entre especies

27.1 Clonación y expresión de la forma unida a membrana de IgE humana y de macaco

La línea celular de ratón J558L (obtenida de Interlab Project, Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro, Génova, Italia, ECACC 88032902), una línea celular de mieloma variante con pérdida de cadena pesada espontánea que sintetiza y secreta una cadena ligera lambda, se usó para ser complementada por una variante de cadena pesada unida a membrana de la IgE humana y de macaco, respectivamente. Con el fin de generar dichas construcciones, se obtuvieron moléculas sintéticas por síntesis génica según protocolos estándar (las secuencias de nucleótidos de las construcciones se listan como SEQ ID Nos 595 y 594). En estas construcciones, la secuencia codificadora para la cadena CD3 épsilon humana y de macaco se fusionó con la región transmembrana humana de IgE, respectivamente. La incorporación de especificidad de la cadena VH está dirigida frente al hapteno (4-hidroxi-3-nitro-fenil)acetil (NP). El fragmento de la síntesis génica también se diseñó para que contuviera un sitio Kozak para la expresión de la construcción en eucariotas y un líder de inmunoglobulina y sitios de restricción al comienzo y al final del ADN. Los sitios de restricción introducidos EcoRI en el extremo 5' y Sall en el extremo 3' se utilizaron durante la etapa de clonación en el plásmido de expresión designado pEF-DHFR. Después de la verificación de la secuencia (macaco: XM_001116734 región C épsilon de Ig macaca mulatta, ARNm; humana: NC_000014 cromosoma 14 de Homo sapiens, secuencia completa, National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>), los plásmidos se usaron para transfectar células CHO/dhfr- como se ha descrito anteriormente. La expresión de la proteína en eucariotas en células CHO deficientes para DHFR se realiza como se describe por Kaufmann R.J. (1990) Methods Enzymol. 185, 537-566. La amplificación génica de la construcción se induce por concentraciones crecientes de metotrexato (MTX) hasta una concentración final de hasta MTX 20 nM.

27.2 Generación de moléculas de cadena única biespecíficas para IgE y CD3 específicas entre especies

Generalmente, se diseñaron moléculas de anticuerpo de cadena única biespecíficas, comprendiendo cada una un dominio con una especificidad de unión para el antígeno CD3 humano y de primate distinto del chimpancé, así como un dominio con una especificidad de unión para el antígeno IgE humano y de primate distinto del chimpancé, como se muestra en la siguiente Tabla 10:

Tabla 10: Formatos de moléculas de anticuerpo de cadena única biespecíficas anti-CD3 y anti-IgE específicas entre especies

SEQ ID (nucl/prot)	Formatos de construcciones de proteínas (N → C)
1549/1548	IgE G9 HL x I2C HL
1547/1546	IgE G9 HL x F12Q HL
1545/1544	IgE G9 HL x H2C HL
1555/1554	IgE G9 LH x I2C HL
1553/1552	IgE G9 LH x F12Q HL
1551/1550	IgE G9 LH x H2C HL
1529/1528	IgE D4 LH x I2C HL
1527/1526	IgE D4 LH x F12Q HL
1525/1524	IgE D4 LH x H2C HL
1523/1522	IgE D4 HL x I2C HL
1521/1520	IgE D4 HL x F12Q HL
1519/1518	IgE D4 HL x H2C HL
1557/1556	H2C HL x IgE-G9 HL
1559/1558	F12Q HL x IgE-G9 HL

SEQ ID (nucl/prot)	Formatos de construcciones de proteínas (N → C)
1567/1566	IgE G9 LH x I2C LH
1561/1560	I2C HL x IgE G9 HL
1563/1562	I2C HL x IgE G9 LH
1565/1564	I2C LH x IgE G9 LH

5 Las construcciones mencionadas anteriormente que contienen los dominios variable de cadena ligera (L) y variable de cadena pesada (H) específicos entre especies para IgE humana y de macaco y las combinaciones de VH y VL específicas de CD3 específicas entre especies para CD3 humano y de macaco se obtuvieron por síntesis génica. Los fragmentos de la síntesis génica se diseñaron de manera que contuvieran en primer lugar un sitio Kozak para la expresión de la construcción en eucariotas, seguido por un péptido líder de inmunoglobulina de 19 aminoácidos, seguido en marco por la secuencia codificadora de la molécula de anticuerpo de cadena única biespecífica respectiva, seguido en marco por la secuencia codificadora de una etiqueta de 6 histidinas y un codón de parada. El fragmento de la síntesis génica también se diseñó para introducir sitios de restricción adecuados al comienzo y al final del fragmento. Los sitios de restricción introducidos se utilizaron en los siguientes procedimientos de clonación. El fragmento de la síntesis génica se clonó mediante estos sitios de restricción en un plásmido designado pEF-DHFR siguiendo protocolos estándar. Un clon con una secuencia de nucleótidos con secuencia verificada se transfectó en células CHO deficientes para DHFR para la expresión de la construcción en eucariotas. La expresión de la proteína en eucariotas en células CHO deficientes para DHFR se realizó como se describe por Kaufmann R.J. (1990) Methods Enzymol. 185, 537-566. La amplificación génica de la construcción se indujo por concentraciones crecientes de metotrexato (MTX) hasta una concentración final de hasta MTX 20 nM. Alternativamente, las construcciones se transfectaron en células CHO deficientes para DHFR de una manera transitoria según protocolos estándar.

20 Los experimentos de unión por FACS se realizaron con la línea celular transfectada con IgE humana J558L para evaluar la capacidad de unión a la IgE humana. La especificidad entre especies a células positivas para IgE de macaco se ensayó utilizando las células J558L transfectadas con la IgE de macaco. La línea celular J558L también se usó para los ensayos de citotoxicidad realizados con los anticuerpos de cadena única biespecíficos para IgE y CD3 específicos entre especies. Los experimentos de unión, así como los ensayos de citotoxicidad, se realizaron como se ha descrito anteriormente.

25 Como se representa en las Figuras 41, los anticuerpos de cadena única biespecíficos para IgE y CD3 específicos entre especies generados demostraron unión a ambos antígenos humanos y de cynomolgus y demostraron que eran completamente específicos entre especies.

30 Como se muestra en las Figuras 42, todas las construcciones de anticuerpo de cadena única biespecíficas específicas entre especies generadas revelaron actividad citotóxica frente a células diana positivas para IgE humana incitadas por células CD8⁺ humanas y células diana positivas para IgE de macaco incitadas por la línea de células T de macaco 4119LnPx. Como un control negativo, se ha usado un anticuerpo de cadena única biespecífico irrelevante.

28. Generación y caracterización de moléculas de cadena única biespecíficas para CD44 y CD3 específicas entre especies

28.1 Generación de células CHO que expresan CD44 humano

35 La secuencia codificadora de CD44 humano como se publica en GenBank (Número de acceso AJ251595) y que contiene también el exón CD44v6 se obtuvo por síntesis génica según protocolos estándar. El fragmento de la síntesis génica se diseñó de manera que contuviera en primer lugar un sitio Kozak para la expresión de la construcción en eucariotas, seguido por la secuencia codificadora de la proteína CD44 humana y un codón de parada (la secuencia de ADNc y de aminoácidos de la construcción se listan como SEQ Nos 608 y 609). El fragmento de la síntesis génica también se diseñó para introducir sitios de restricción al comienzo y al final del fragmento. Los sitios de restricción introducidos, EcoRI en el extremo 5' y Sall en el extremo 3', se utilizaron en los siguientes procedimientos de clonación. El fragmento de la síntesis génica se clonó mediante EcoRI y Sall en un plásmido designado pEF-DHFR (pEF-DHFR se describió en Raum et al. Cancer Immunol Immunother 50 (2001) 141-150) siguiendo protocolos estándar. Los procedimientos mencionados anteriormente se llevaron a cabo según protocolos estándar (Sambrook, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 3^a edición, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, Nueva York (2001)). Un clon con una secuencia de nucleótidos con secuencia verificada se transfectó en células CHO deficientes para DHFR para la expresión de la construcción en eucariotas. La expresión de la proteína en eucariotas en células CHO deficientes para DHFR se realizó como se describe por Kaufmann R.J. (1990) Methods Enzymol. 185, 537-566.

La amplificación génica de la construcción se indujo por concentraciones crecientes de metotrexato (MTX) hasta una concentración final de hasta MTX 20 nM.

28.2 Generación de células CHO que expresan CD44 humano sin el exón v6

5 La secuencia codificadora de CD44 humano como se publica en GenBank (Número de acceso AJ251595) deletada para la secuencia codificadora del exón v6 se obtuvo por síntesis génica según protocolos estándar. El fragmento de la síntesis génica se diseñó de manera que contuviera en primer lugar un sitio Kozak para la expresión de la construcción en eucariotas, seguido por la secuencia codificadora de la proteína CD44 humana sin el exón v6 y un codón de parada (la secuencia de ADNc y de aminoácidos de la construcción se listan como SEQ Nos 610 y 611). El fragmento de la síntesis génica también se diseñó para introducir sitios de restricción al comienzo y al final del fragmento. Los sitios de restricción introducidos, EcoRI en el extremo 5' y Sall en el extremo 3', se utilizaron en los siguientes procedimientos de clonación. El fragmento de la síntesis génica se clonó mediante EcoRI y Sall en un plásmido designado pEF-DHFR (pEF-DHFR se describe en Raum et al. Cancer Immunol Immunother 50 (2001) 141-150) siguiendo protocolos estándar. Los procedimientos mencionados anteriormente se llevaron a cabo según protocolos estándar (Sambrook, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 3ª edición, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, Nueva York (2001)). Un clon con una secuencia de nucleótidos con secuencia verificada se transfirió en células CHO deficientes para DHFR para la expresión de la construcción en eucariotas. La expresión de la proteína en eucariotas en células CHO deficientes para DHFR se realizó como se describe por Kaufmann R.J. (1990) Methods Enzymol. 185, 537-566. La amplificación génica de la construcción se indujo por concentraciones crecientes de metotrexato (MTX) hasta una concentración final de hasta MTX 20 nM.

28.3 Generación de células CHO que expresan CD44 de macaco

25 La secuencia codificadora de CD44 de macaco como se publica en GenBank (Número de acceso XM_001115359) y que contiene también el exón CD44v6 se obtuvo por síntesis génica según protocolos estándar (la secuencia de ADNc y de aminoácidos de la construcción se listan como SEQ Nos 612 y 613). En la construcción utilizada, la secuencia codificadora corresponde a CD44 de macaco excepto por una mutación puntual en la posición 1 del codón del quinto aminoácido del péptido señal de la proteína CD44, lo que produce una mutación de arginina a triptófano correspondiente a la secuencia humana. El fragmento de la síntesis génica también se diseñó para que contuviera un sitio Kozak para la expresión de la construcción en eucariotas y sitios de restricción al comienzo y al final del fragmento. Los sitios de restricción introducidos EcoRI en el extremo 5' y Sall en el extremo 3', se utilizaron en los siguientes procedimientos de clonación. El fragmento de la síntesis génica se clonó entonces mediante EcoRI y Sall en un plásmido designado pEF-DHFR (pEF-DHFR se describe en Raum et al. Cancer Immunol Immunother 50 (2001) 141-150). Un clon de este plásmido con la secuencia verificada se usó para transfectar células CHO/dhfr- como se ha descrito anteriormente.

28.4 Generación de moléculas de cadena única biespecíficas para CD44v6 y CD3 específicas entre especies

35 Generalmente, se diseñan moléculas de anticuerpo de cadena única biespecíficas, comprendiendo cada una un dominio con una especificidad de unión específico entre especies para CD3 épsilon humana y de primate distinto del chimpancé, así como un dominio con una especificidad de unión específica entre especies para CD44v6 humano y de primate distinto del chimpancé, como se muestra en la siguiente Tabla 11:

Tabla 11: Formatos de moléculas de anticuerpo de cadena única biespecíficas anti-CD3 y anti-CD44v6 específicas entre especies

SEQ ID (nucl/prot)	Formatos de construcciones de proteínas (N → C)
1589/1588	CD44-A8LHxI2C HL
1587/1586	CD44-A8HLxI2C HL

40 Las construcciones mencionadas anteriormente que contienen los dominios variable de cadena ligera (L) y variable de cadena pesada (H) específicos entre especies para CD44 humano y de macaco y las combinaciones de VH y VL específicas para CD3 específicas entre especies para CD3 humano y de macaco se obtienen por síntesis génica. Los fragmentos de la síntesis génica se diseñaron de manera que contuvieran en primer lugar un sitio Kozak para la expresión de la construcción en eucariotas, seguido por un péptido líder de inmunoglobulina de 19 aminoácidos, seguido en marco por la secuencia codificadora de la molécula de anticuerpo de cadena única biespecífica respectiva, seguido en marco por la secuencia codificadora de una etiqueta de histidina₆ y un codón de parada. El fragmento de la síntesis génica también se diseñó para introducir sitios de restricción adecuados al comienzo y al final del fragmento. Los sitios de restricción introducidos se utilizaron en los siguientes procedimientos de clonación. El fragmento de la síntesis génica se clonó mediante estos sitios de restricción en un plásmido designado pEF-DHFR (pEF-DHFR se describe en Raum et al. Cancer Immunol Immunother 50 (2001) 141-150) siguiendo protocolos estándar. Los

procedimientos mencionados anteriormente se llevaron a cabo según protocolos estándar (Sambrook, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 3ª edición, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, Nueva York (2001)). Un clon con una secuencia de nucleótidos con secuencia verificada se transfirió en células CHO deficientes para DHFR para la expresión de la construcción en eucariotas. La expresión de la proteína en eucariotas en células CHO deficientes para DHFR se realizó como se describe por Kaufmann R.J. (1990) *Methods Enzymol.* 185, 537-566. La amplificación génica de la construcción se indujo por concentraciones crecientes de metotrexato (MTX) hasta una concentración final de hasta MTX 20 nM.

28.5 Expresión y purificación de las moléculas de anticuerpo de cadena única biespecíficas

Las moléculas de anticuerpo de cadena única biespecíficas se expresaron en células de ovario de hámster chino (CHO). La expresión de la proteína en eucariotas en células CHO deficientes para DHFR se realizó como se describe por Kaufmann R.J. (1990) *Methods Enzymol.* 185, 537-566. La amplificación génica de las construcciones se indujo por la adición de concentraciones crecientes de MTX hasta concentraciones finales de MTX 20 nM. Después de dos subcultivos de cultivo estacionario, las células se crecieron en botellas de cultivo rotatorias con medio líquido de soja HyQ PF CHO sin nucleósidos (con L-Glutamina 4,0 mM con 0,1 % de Pluronic F - 68; HyClone) durante 7 días antes de la recogida. Las células se retiraron por centrifugación y el sobrenadante que contenía la proteína expresada se almacenó a -20°C. Alternativamente, las construcciones se expresaron de forma transitoria en células HEK 293. La transfección se realizó con el reactivo 293fectin (Invitrogen, #12347-019) según el protocolo del fabricante.

Se usaron el Sistema Äkta® Explorer (GE Health Systems) y Software Unicorn® para cromatografía. Se realizó cromatografía de afinidad con metal inmovilizado ("IMAC") usando un Fractogel EMD chelate® (Merck) que se cargó con ZnCl₂ según el protocolo proporcionado por el fabricante. La columna se equilibró con tampón A (tampón fosfato de sodio 20 mM pH 7,2, NaCl 0,1 M) y el sobrenadante del cultivo celular (500 ml) se aplicó a la columna (10 ml) a una velocidad de flujo de 3 ml/min. La columna se lavó con tampón A para eliminar la muestra no unida. La proteína unida se eluyó usando un gradiente de dos etapas de tampón B (tampón fosfato de sodio 20 mM pH 7,2, NaCl 0,1 M, imidazol 0,5 M) según lo siguiente:

Etapas 1: 20 % de tampón B en 6 volúmenes de columna

Etapas 2: 100 % de tampón B en 6 volúmenes de columna

Las fracciones de proteína eluida de la etapa 2 se combinaron para purificación adicional. Todos los productos químicos fueron de grado de investigación y se adquirieron en Sigma (Deisenhofen) o Merck (Darmstadt).

La cromatografía de filtración en gel se realizó en una columna de grado preparativo HiLoad 16/60 Superdex 200 (GE/Amersham) equilibrada con tampón Equi (Citrato 25 mM, Lisina 200 mM, 5 % de Glicerol, pH 7,2). Las muestras de proteínas eluidas (velocidad de flujo 1 ml/min) se sometieron a SDS-PAGE estándar y Transferencia Western para su detección. Antes de la purificación, la columna se calibró para la determinación del peso molecular (kit de marcadores de peso molecular, Sigma MW GF-200). Las concentraciones de proteína se determinaron usando DO280 nm.

La proteína de anticuerpo de cadena única biespecífica purificada se analizó en SDS PAGE en condiciones reductoras realizada con geles preparados comercialmente de Bis Tris al 4-12 % (Invitrogen). La preparación y aplicación de las muestras se realizaron según el protocolo proporcionado por el fabricante. El peso molecular se determina con el estándar de proteínas MultiMark (Invitrogen). El gel se tiñó con Coomassie coloidal (protocolo de Invitrogen). La pureza de la proteína aislada fue >95 % como se determina por SDS-PAGE.

El anticuerpo de cadena única biespecífico tiene un peso molecular de aproximadamente 52 kDa en condiciones nativas como se determina con filtración en gel en PBS. Todas las construcciones se purificaron según este método.

Se realizó Transferencia Western usando una membrana Optitran® BA-S83 y el Módulo de Transferencia de Invitrogen según el protocolo proporcionado por el fabricante. Los anticuerpos usados estaban dirigidos frente a la etiqueta histidina₆ (Penta His, Qiagen) y anti-IgG de ratón de cabra marcado con fosfatasa alcalina (AP) (Sigma), y BCIP/NBT (Sigma) como sustrato. Se detectó una única banda a 52 kD correspondiente al anticuerpo de cadena única biespecífico purificado.

28.6 Análisis por citometría de flujo de la unión de los anticuerpos biespecíficos para CD44 y CD3 específicos entre especies

Con el fin de ensayar la funcionalidad de las construcciones de anticuerpo biespecíficas específicas entre especies respecto a la capacidad de unirse a CD44 y CD3 humano y de macaco, respectivamente, se realizó un análisis FACS. Para este propósito, se usaron células CHO transfectadas con CD44 humano como se describe en el Ejemplo 28.1 y la línea celular de leucemia de células T positiva para CD3 humana HPB-ALL (DSMZ, Braunschweig, ACC483) para ensayar la unión a antígenos humanos. La reactividad de la unión a antígenos de macaco se ensayó usando el transfectante CD44 de macaco generado descrito en el Ejemplo 28.3 y PBMC de macaco (la preparación de PBMC de macaco se realizó por centrifugación en gradiente de Ficoll de sangre periférica de monos macacos según protocolos estándar). La especificidad para el exón v6 de CD44 se ensayó usando las células CHO transfectadas que

- expresaban CD44 humano sin el exón v6 generadas como se describe en el Ejemplo 28.2. Se incubaron 200.000 células de las líneas celulares respectivas o PBMC de macaco durante 30 min. en hielo con 50 µl de la proteína purificada de las construcciones de anticuerpo biespecíficas específicas entre especies (5 µg/ml) o 50 µl de un anticuerpo anti-CD44 disponible comercialmente (Becton Dickinson biosciences, Heidelberg; también 5 µg/ml). Las células se lavaron dos veces en PBS con 2 % de FCS y la unión de la construcción se detectó con un anticuerpo anti-His murino (anticuerpo frente a Penta His; Qiagen; diluido 1:20 en 50 µl de PBS con 2 % de FCS). El anticuerpo anti-His se omitió para las muestras incubadas con el anticuerpo anti-CD44 disponible comercialmente. Después de lavar, el anticuerpo anti-His o el anticuerpo anti-CD44 unido se detectó con un anticuerpo específico de Fc gamma (Dianova) conjugado con ficoeritrina, diluido 1:100 en PBS con 2 % de FCS. Se usó PBS con 2 % de FCS como control negativo.
- Se realizó citometría de flujo en un aparato FACS-Calibur; se usó el software CellQuest para adquirir y analizar los datos (Becton Dickinson biosciences, Heidelberg). La tinción para FACS y la medición de la intensidad de la fluorescencia se realizaron como se describe en Current Protocols in Immunology (Coligan, Kruisbeek, Margulies, Shevach y Strober, Wiley-Interscience, 2002).
- La unión específica de las moléculas de cadena única listadas anteriormente, que eran específicas entre especies para CD44 y específicas entre especies para CD3 humano y de primate distinto del chimpancé fue claramente detectable como se muestra en la Figura 43. En el análisis FACS, todas las construcciones mostraron unión a CD3 y CD44 comparado con los controles negativos respectivos. Se demostró la especificidad entre especies de los anticuerpos biespecíficos para los antígenos CD44 y CD3 humano y de macaco.
- La especificidad para el exón v6 de CD44 se demostró en la Figura 44 por la ausencia de unión de las construcciones a células CHO transfectadas con CD44 humano que carecía del exón v6. La expresión de CD44 por estas células se demostró por la unión comparable del anticuerpo anti-CD44 disponible comercialmente a esas células y a las células CHO transfectadas con CD44 humano de longitud completa.

28.7 Bioactividad de los anticuerpos de cadena única biespecíficos para CD44 y CD3 específicos entre especies

- La bioactividad de los anticuerpos de cadena única biespecíficos generados se analizó por ensayos de citotoxicidad de liberación de cromo 51 (⁵¹Cr) in vitro usando la línea celular positiva para CD44 descrita en el Ejemplo 28.1. Como células efectoras se usaron PBMC humanas deplecionadas de CD4/CD56 estimuladas.

La generación de PBMC humanas estimuladas se realizó como sigue:

- Se recubrió una placa Petri (145 mm de diámetro, Greiner) con un anticuerpo específico anti-CD3 disponible comercialmente (p. ej., OKT3, Orthoclone) en una concentración final de 1 µg/ml durante 1 hora a 37 °C. La proteína no unida se eliminó por una etapa de lavado con PBS. Las PBMC frescas se aislaron de sangre periférica (30 - 50 ml de sangre humana) por centrifugación en gradiente de Ficoll según protocolos estándar. Se añadieron 3 - 5 x 10⁷ PBMC a la placa petri prereducida en 120 ml de RPMI 1640 con glutamina estabilizada / 10 % de FCS / 20 U/ml de IL-2 (Proleukin, Chiron) y se estimularon durante 2 días. Al tercer día, las células se recogieron y se lavaron una vez con RPMI 1640. Se añadió IL-2 a una concentración final de 20 U/ml y las células se cultivaron de nuevo durante un día en el mismo medio de cultivo celular que anteriormente.

Mediante la depleción de las células T CD4+ y las células NK CD56+ según protocolos estándar, se enriquecieron los linfocitos T citotóxicos (CTL) CD8+.

- Las células diana se lavaron dos veces con PBS y se marcaron con 11,1 MBq de ⁵¹Cr en un volumen final de 100 µl de RPMI con 50 % de FCS durante 45 minutos a 37 °C. Posteriormente, las células diana marcadas se lavaron 3 veces con 5 ml de RPMI y se usaron entonces en el ensayo de citotoxicidad. El ensayo se realizó en una placa de 96 pocillos en un volumen total de 250 µl de RPMI suplementado (como anteriormente) con una relación E:D de 10:1. Se aplicaron 1 µg/ml de moléculas de anticuerpo de cadena única biespecíficas específicas entre especies y 20 diluciones de tres veces de las mismas. El tiempo del ensayo fue 18 horas y la citotoxicidad se midió como valores relativos de cromo liberado en el sobrenadante relacionado con la diferencia de lisis máxima (adición de Tritón-X) y lisis espontánea (sin células efectoras). Todas las mediciones se hicieron en cuadruplicado. La medición de la actividad de cromo en los sobrenadantes se realizó con un contador gamma Wizard 3" (Perkin Elmer Life Sciences GmbH, Colonia, Alemania). El análisis de los datos experimentales se realizó con Prism 4 para Windows (versión 4.02, GraphPad Software Inc., San Diego, California, EEUU). Las curvas de respuesta a la dosis sigmoidales tienen típicamente valores de R² >0,90 como se determina por el software. Los valores de CE₅₀ calculados por el programa de análisis se usaron para la comparación de la bioactividad.

Como se muestra en la Figura 45, las construcciones de anticuerpo de cadena única biespecíficas específicas entre especies generadas demostraron actividad citotóxica frente a células diana positivas para CD44 humano incitadas por PBMC humanas deplecionadas de CD4/CD56 estimuladas.

- 29. Generación y caracterización de moléculas de cadena única biespecíficas para CD30 y CD3 específicas entre especies**

29.1 Generación de células CHO que expresan CD30 humano

La secuencia codificadora de CD30 humano como se publica en GenBank (Número de acceso M83554) se obtuvo por síntesis génica según protocolos estándar. El fragmento de la síntesis génica se diseñó de manera que contuviera en primer lugar un sitio Kozak para la expresión de la construcción en eucariotas, seguido por un péptido líder de inmunoglobulina de 19 aminoácidos, seguido en marco por la secuencia codificadora de la proteína CD30 humana madura y un codón de parada (la secuencia de ADNc y de aminoácidos de la construcción se listan como SEQ Nos 1103 y 1104). El fragmento de la síntesis génica también se diseñó para introducir sitios de restricción al comienzo y al final del fragmento. Los sitios de restricción introducidos, EcoRI en el extremo 5' y Sall en el extremo 3', se utilizaron en los siguientes procedimientos de clonación. Los sitios de restricción internos se eliminaron por mutación silenciosa de la secuencia codificadora en el fragmento de la síntesis génica (BsrGI: nucleótido 243 de T a C; Sall: nucleótido 327 de A a G; Sall: nucleótido 852 de A a G; EcoRI: nucleótido 1248 de T a C). El fragmento de la síntesis génica se clonó mediante EcoRI y Sall en un plásmido designado pEF-DHFR (pEF-DHFR se describe en Raum et al. Cancer Immunol Immunother 50 (2001) 141-150) siguiendo protocolos estándar. Los procedimientos mencionados anteriormente se llevaron a cabo según protocolos estándar (Sambrook, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 3ª edición, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, Nueva York (2001)). Un clon con una secuencia de nucleótidos con secuencia verificada se transfirió en células CHO deficientes para DHFR para la expresión de la construcción en eucariotas. La expresión de la proteína en eucariotas en células CHO deficientes para DHFR se realizó como se describe por Kaufmann R.J. (1990) Methods Enzymol. 185, 537-566. La amplificación génica de la construcción se indujo por concentraciones crecientes de metotrexato (MTX) hasta una concentración final de hasta 20 MTX 20 nM.

29.2 Generación de células CHO que expresan CD30 de macaco

La secuencia de ADNc de CD30 de macaco se obtuvo por un conjunto de 4 PCR en ADNc de médula ósea de mono macaco preparada según protocolos estándar. Se usaron las siguientes condiciones de reacción: 1 ciclo a 94 °C durante 2 minutos seguido por 35 ciclos con 94 °C durante 1 minuto, 55 °C durante 1 minuto y 72 °C durante 1 minuto seguido por un ciclo terminal de 72 °C durante 3 minutos y los siguientes cebadores:

6. cebador directo: 5'-cctcgccgcgctgggactgc-3'

cebador inverso: 5'-ggtgccactggagggttccttgc-3'

7. cebador directo: 5'-gcttctccattctgtctgccagcagg-3'

cebador inverso: 5'-ggtaggggacacagcgggcacaggagttgg-3'

30 8. cebador directo: 5'-cctggcatgatctgtgccacatcagcc-3'

cebador inverso: 5'-gcgttgagctcctcctgggtctgg-3'

9. cebador directo: 5'-cctccrgcccaagctagagctgtgg-3'

cebador inverso:

5'-cgactctagagcggcgcctcactttccagaggcagctgtggcaagggtctcttccctcc-3'

35 Las reacciones de PCR se realizaron con la adición de betaína de grado PCR a una concentración final de 1M. Estas PCR generan cuatro fragmentos superpuestos, que se aislaron y secuenciaron según protocolos estándar usando los cebadores de PCR, y proporcionando de esta manera una parte de la secuencia de ADNc que codifica CD30 de macaco desde el codón 12 del péptido líder al codón 562 de la proteína madura. Para generar una construcción para la expresión de CD30 de macaco, se obtuvo un fragmento de ADNc por síntesis génica según protocolos estándar (la secuencia de ADNc y de aminoácidos de la construcción se listan como SEQ Nos 1105 y 1106). En esta construcción, la secuencia codificadora para CD30 de macaco desde el aminoácido 12 del péptido líder al aminoácido 562 de la proteína CD30 madura se fusionó en la secuencia codificadora de CD30 humano reemplazando la parte respectiva de la secuencia codificadora humana. El fragmento de la síntesis génica también se diseñó para que contuviera un sitio Kozak para la expresión de la construcción en eucariotas y sitios de restricción al comienzo y al final del fragmento que contenía el ADNc que codificaba el dominio extracelular completo de CD30 de macaco, el dominio transmembrana de CD30 de macaco y un dominio intracelular de CD30 quimérico de macaco-humano. Los sitios de restricción introducidos XbaI en el extremo 5' y Sall en el extremo 3', se utilizaron en los siguientes procedimientos de clonación. El fragmento de la síntesis génica se clonó entonces mediante XbaI y Sall en un plásmido designado pEF-DHFR (pEF-DHFR se describe en Raum et al. Cancer Immunol Immunother 50 (2001) 141-150). Un clon de este plásmido con la secuencia verificada se usó para transfectar células CHO/dhfr- como se ha descrito anteriormente.

29.3 Generación de moléculas de cadena única biespecíficas para CD30 y CD3 específicas entre especies

Clonación de moléculas de unión específicas entre especies

Generalmente, se diseñaron las moléculas de anticuerpo de cadena única biespecíficas, comprendiendo cada una un dominio con una especificidad de unión específico entre especies para CD3 épsilon humana y de primate distinto del chimpancé, así como un dominio con una especificidad de unión específico entre especies para CD30 humano y de primate distinto del chimpancé, como se muestra en la siguiente Tabla 12:

5 Tabla 12: Formatos de moléculas de anticuerpo de cadena única biespecíficas anti-CD3 y anti-CD30 específicas entre especies

SEQ ID (nucl/prot)	Formatos de construcciones de proteínas (N → C)
1126/1125	M911HLxI2CHL
1139/1138	SR3HLxI2CHL

Las construcciones mencionadas anteriormente que contienen los dominios variable de cadena ligera (L) y variable de cadena pesada (H) específicos entre especies para CD30 humano y de macaco y las combinaciones de VH y VL específicas para CD3 específicas entre especies para CD3 humano y de macaco se obtuvieron por síntesis génica. Los fragmentos de la síntesis génica se diseñaron de manera que contuvieran en primer lugar un sitio Kozak para la expresión de la construcción en eucariotas, seguido por un péptido líder de inmunoglobulina de 19 aminoácidos, seguido en marco por la secuencia codificadora de la molécula de anticuerpo de cadena única biespecífica respectiva, seguido en marco por la secuencia codificadora de una etiqueta de 6 histidinas y un codón de parada. El fragmento de la síntesis génica también se diseñó para introducir sitios de restricción adecuados al comienzo y al final del fragmento. Los sitios de restricción introducidos se utilizaron en los siguientes procedimientos de clonación. El fragmento de la síntesis génica se clonó mediante estos sitios de restricción en un plásmido designado pEF-DHFR (pEF-DHFR se describe en Raum et al. Cancer Immunol Immunother 50 (2001) 141-150) siguiendo protocolos estándar. Los procedimientos mencionados anteriormente se llevaron a cabo según protocolos estándar (Sambrook, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 3ª edición, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, Nueva York (2001)). Un clon con una secuencia de nucleótidos con secuencia verificada se transfirió en células CHO deficientes para DHFR para la expresión de la construcción en eucariotas. La expresión de la proteína en eucariotas en células CHO deficientes para DHFR se realizó como se describe por Kaufmann R.J. (1990) Methods Enzymol. 185, 537-566. La amplificación génica de la construcción se indujo por concentraciones crecientes de metotrexato (MTX) a una concentración final de hasta MTX 20 nM.

29.4 Expresión y purificación de las moléculas de anticuerpo de cadena única biespecíficas

Las moléculas de anticuerpo de cadena única biespecíficas se expresaron en células de ovario de hámster chino (CHO). La expresión de la proteína en eucariotas en células CHO deficientes para DHFR se realizó como se describe por Kaufmann R.J. (1990) Methods Enzymol. 185, 537-566. La amplificación génica de las construcciones se indujo por la adición de concentraciones crecientes de MTX hasta concentraciones finales de MTX 20 nM. Después de dos subcultivos de cultivo estacionario, las células se crecieron en botellas de cultivo rotatorias con medio líquido de soja HyQ PF CHO sin nucleósidos (con L-Glutamina 4,0 mM con 0,1 % de Pluronic F - 68; HyClone) durante 7 días antes de la recogida. Las células se retiraron por centrifugación y el sobrenadante que contenía la proteína expresada se almacenó a -20°C. Alternativamente, las construcciones se expresaron de forma transitoria en células HEK 293. La transfección se realizó con reactivo 293fectin (Invitrogen, #12347-019) según el protocolo del fabricante.

Se usaron el Sistema Äkta® Explorer (GE Health Systems) y Software Unicorn® para cromatografía. Se realizó cromatografía de afinidad con metal inmovilizado ("IMAC") usando un Fractogel EMD chelate® (Merck) que se cargó con ZnCl₂ según el protocolo proporcionado por el fabricante. La columna se equilibró con tampón A (tampón fosfato de sodio 20 mM pH 7,2, NaCl 0,1 M) y el sobrenadante del cultivo celular (500 ml) se aplicó a la columna (10 ml) a una velocidad de flujo de 3 ml/min. La columna se lavó con tampón A para eliminar la muestra no unida. La proteína unida se eluyó usando un gradiente de dos etapas de tampón B (tampón fosfato de sodio 20 mM pH 7,2, NaCl 0,1 M, imidazol 0,5 M) según el siguiente procedimiento:

Etapas 1: 20 % de tampón B en 6 volúmenes de columna

Etapas 2: 100 % de tampón B en 6 volúmenes de columna

Las fracciones de proteína eluída de la etapa 2 se combinaron para purificación adicional. Todos los productos químicos son de grado de investigación y se adquirieron en Sigma (Deisenhofen) o Merck (Darmstadt).

La cromatografía de filtración en gel se realizó en una columna de grado preparativo HiLoad 16/60 Superdex 200 (GE/Amersham) equilibrada con tampón Equi (Citrato 25 mM, Lisina 200 mM, 5 % de Glicerol, pH 7,2). Las muestras de proteínas eluídas (velocidad de flujo 1 ml/min) se sometieron a SDS-PAGE estándar y Transferencia Western para su detección. Antes de la purificación, la columna se calibró para la determinación del peso molecular (kit de

marcadores de peso molecular, Sigma MW GF-200). Las concentraciones de proteína se determinaron usando DO280 nm.

5 La proteína de anticuerpo de cadena única biespecífica purificada se analizó en SDS PAGE en condiciones reductoras realizada con geles preparados comercialmente de Bis Tris al 4-12 % (Invitrogen). La preparación y aplicación de las muestras se realizaron según el protocolo proporcionado por el fabricante. El peso molecular se determinó con el estándar de proteínas MultiMark (Invitrogen). El gel se tiñó con Coomassie coloidal (protocolo de Invitrogen). La pureza de la proteína aislada fue >95 % como se determina por SDS-PAGE.

El anticuerpo de cadena única biespecífico tiene un peso molecular de aproximadamente 52 kDa en condiciones nativas como se determina con filtración en gel en PBS. Todas las construcciones se purificaron según este método.

10 Se realizó Transferencia Western usando una membrana Optitran® BA-S83 y el Módulo de Transferencia de Invitrogen según el protocolo proporcionado por el fabricante. Los anticuerpos usados estaban dirigidos frente a la Etiqueta de His (Penta His, Qiagen) y anti-IgG de ratón de cabra marcado con fosfatasa alcalina (AP) (Sigma), y BCIP/NBT (Sigma) como sustrato. Se detectó una única banda a 52 kD correspondiente al anticuerpo de cadena única biespecífico purificado.

15 **29.5 Análisis por citometría de flujo de la unión de los anticuerpos biespecíficos para CD30 y CD3 específicos entre especies**

Con el fin de ensayar la funcionalidad de las construcciones de anticuerpo biespecíficas específicas entre especies respecto a la capacidad de unirse a CD30 y CD3 humano y de macaco, respectivamente, se realizó un análisis FACS. Para este propósito, las células CHO transfectadas con CD30 humano como se describe en el Ejemplo 29.1, la línea de células B positiva para CD30 humano MEC-1 (DSMZ, Braunschweig, ACC 497) y la línea celular de leucemia de células T positiva para CD3 humano HPB-ALL (DSMZ, Braunschweig, ACC483) se usaron para ensayar la unión a antígenos humanos. La reactividad de la unión a antígenos de macaco se ensayó usando el transfectante de CD30 de macaco generado descrito en el Ejemplo 29.2 y una línea de células T de macaco 4119LnPx (proporcionada amablemente por el Prof Fickenscher, Hygiene Institute, Virology, Erlangen-Nuernberg; publicado en Knappe A, et al., y Fickenscher H., Blood 2000, 95, 3256-61). Se incubaron 200.000 células de las líneas celulares respectivas durante 30 min en hielo con 50 µl de la proteína purificada de las construcciones de anticuerpo biespecíficas específicas entre especies (5 µg/ml). Las células se lavaron dos veces en PBS con 2 % de FCS y la unión de la construcción se detectó con un anticuerpo frente a Penta His murino (Qiagen; diluido 1:20 en 50 µl de PBS con 2 % de FCS). Después de lavar, Los anticuerpos anti His unidos se detectaron con un anticuerpo específico de Fc gamma (Dianova) conjugado con ficoeritrina, diluido 1:100 en PBS con 2 % de FCS. Se usó PBS con 2 % de FCS como un control negativo.

Se realizó citometría de flujo en un aparato FACS-Calibur, se usó el software CellQuest para adquirir y analizar los datos (Becton Dickinson biosciences, Heidelberg). La tinción para FACS y la medición de la intensidad de la fluorescencia se realizaron como se describe en Current Protocols in Immunology (Coligan, Kruisbeek, Margulies, Shevach y Strober, Wiley-Interscience, 2002).

35 La unión biespecífica de las moléculas de cadena única listadas anteriormente, que son específicas entre especies para CD30 y específicas entre especies para CD3 humano y de primate distinto del chimpancé fue claramente detectable como se muestra en la Figura 46. En el análisis FACS, todas las construcciones mostraron unión a CD3 y CD30 comparado con el control negativo. Se demostró la especificidad entre especies de los anticuerpos biespecíficos para los antígenos CD30 y CD3 humano y de macaco.

40 **29.6 Bioactividad de los anticuerpos de cadena única biespecíficos para CD30 y CD3 específico entre especies**

La bioactividad de los anticuerpos de cadena única biespecíficos generados se analizó por ensayos de citotoxicidad de liberación de cromo 51 (⁵¹Cr) in vitro usando la línea de células B positiva para CD30 humano MEC-1 (DSMZ, Braunschweig, ACC 497) y las células CHO transfectadas con CD30 de macaco descritas en el Ejemplo 29.2. Como células efectoras se usaron PBMC humanas deplecionadas de CD4/CD56 estimuladas o la línea de células T de macaco 4119LnPx, respectivamente.

La generación de PBMC humanas estimuladas se realizó como sigue:

Se recubrió una placa Petri (145 mm de diámetro, Greiner bio-one GmbH, Krefeld) con un anticuerpo específico anti-CD3 disponible comercialmente (p. ej., OKT3, Orthoclone) en una concentración final de 1 µg/ml durante 1 hora a 37 °C. La proteína no unida se eliminó por una etapa de lavado con PBS. Las PBMC frescas se aislaron de sangre periférica (30 - 50 ml de sangre humana) por centrifugación en gradiente de Ficoll según protocolos estándar. Se añadieron 3 - 5 x 10⁷ PBMC a la placa petri precubierta en 120 ml de RPMI 1640 con glutamina estabilizada / 10 % de FCS / 20 U/ml de IL-2 (Proleukin, Chiron) y se estimularon durante 2 días. Al tercer día, las células se recogieron y se lavaron una vez con RPMI 1640. Se añadió IL-2 a una concentración final de 20 U/ml y las células se cultivaron de nuevo durante un día en el mismo medio de cultivo celular que anteriormente.

55 Mediante la depleción de las células T CD4+ y las células NK CD56+ según protocolos estándar, se enriquecieron los linfocitos T citotóxicos (CTL) CD8+.

Las células diana se lavaron dos veces con PBS y se marcaron con 11,1 MBq de ^{51}Cr en un volumen final de 100 μl de RPMI con 50 % de FCS durante 60 minutos a 37 °C. Posteriormente, las células diana marcadas se lavaron 3 veces con 5 ml de RPMI y se usaron entonces en el ensayo de citotoxicidad. El ensayo se realizó en una placa de 96 pocillos en un volumen total de 250 μl de RPMI suplementado (como anteriormente) con una relación E:D de 10:1. Se aplicaron 1 $\mu\text{g/ml}$ de las moléculas de anticuerpo de cadena única biespecíficas específicas entre especies y 20 diluciones de tres veces de las mismas. El tiempo del ensayo fue 4 horas para el ensayo usando MEC-1 y PBMC humanas deplecionadas de CD4/CD56 y 18 horas para el ensayo usando CHO transfectadas con CD30 de macaco y la línea de células T de macaco 4119LnPx. La citotoxicidad se midió como valores relativos de cromó liberado en el sobrenadante relacionado con la diferencia de lisis máxima (adición de Tritón-X) y lisis espontánea (sin células efectoras). Todas las mediciones se hicieron en cuadruplicado. La medición de la actividad de cromó en los sobrenadantes se realizó con un contador gamma Wizard 3" (Perkin Elmer Life Sciences GmbH, Colonia, Alemania). El análisis de los datos experimentales se realizó con Prism 4 para Windows (versión 4.02, GraphPad Software Inc., San Diego, California, EEUU). Las curvas de respuesta a la dosis sigmoidales tienen típicamente valores de $R^2 > 0,90$ como se determina por el software. Los valores de CE_{50} calculados por el programa de análisis se usaron para la comparación de la bioactividad.

Como se muestra en la Figura 47, todas las construcciones de anticuerpo de cadena única biespecíficas específicas entre especies generadas demostraron actividad citotóxica frente a células diana positivas para CD30 humano incitadas por PBMC humanas deplecionadas de CD4/CD56 estimuladas y células diana positivas para CD30 de macaco incitadas por la línea de células T de macaco 4119LnPx.

30. Generación y caracterización de moléculas de cadena única biespecíficas para HER2 y CD3 específicas entre especies

30.1 Generación de células CHO que expresan HER2 humano

La secuencia codificadora de HER2 humano como se publica en GenBank (Número de acceso X03363) se obtuvo por síntesis génica según protocolos estándar. El fragmento de la síntesis génica se diseñó de manera que contuviera la secuencia codificadora de la proteína HER2 humana incluyendo su péptido líder (la secuencia de ADNc y de aminoácidos de la construcción se listan como SEQ Nos 1107 y 1108). El fragmento de la síntesis génica también se diseñó para introducir sitios de restricción al comienzo y al final del fragmento. Los sitios de restricción introducidos, XbaI en el extremo 5' y Sall en el extremo 3', se utilizaron en los siguientes procedimientos de clonación. El fragmento de la síntesis génica se clonó mediante XbaI y Sall en un plásmido designado pEF-DHFR (pEF-DHFR se describe en Raum et al. Cancer Immunol Immunother 50 (2001) 141-150) siguiendo protocolos estándar. Los procedimientos mencionados anteriormente se llevaron a cabo según protocolos estándar (Sambrook, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 3ª edición, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, Nueva York (2001)). Un clon con una secuencia de nucleótidos con secuencia verificada se transfectó en células CHO deficientes para DHFR para la expresión de la construcción en eucariotas. La expresión de la proteína en células CHO deficientes para DHFR se realizó como se describe por Kaufmann R.J. (1990) Methods Enzymol. 185, 537-566. La amplificación génica de la construcción se indujo por concentraciones crecientes de metotrexato (MTX) a una concentración final de hasta MTX 20 nM.

30.2 Generación de células CHO que expresan el dominio extracelular de HER2 de macaco

La secuencia codificadora de HER2 humano como se ha descrito anteriormente se modificó para codificar los aminoácidos 123 a 1038 de la proteína HER2 de macaco como se publica en GenBank (Número de acceso XP_001090430). La secuencia codificadora para esta proteína quimérica se obtuvo por síntesis génica según protocolos estándar (la secuencia de ADNc y de aminoácidos de la construcción se listan como SEQ Nos 1109 y 1110). El fragmento de la síntesis génica también se diseñó para que contuviera un sitio Kozak para la expresión de la construcción en eucariotas y sitios de restricción al comienzo y al final del fragmento. Los sitios de restricción introducidos XbaI en el extremo 5' y Sall en el extremo 3', se utilizaron en los siguientes procedimientos de clonación. El fragmento de la síntesis génica se clonó entonces mediante XbaI y Sall en un plásmido designado pEF-DHFR (pEF-DHFR se describe en Raum et al. Cancer Immunol Immunother 50 (2001) 141-150). Un clon de este plásmido con la secuencia verificada se usó para transfectar células CHO/dhfr- como se ha descrito anteriormente.

30.3 Generación de moléculas de cadena única biespecíficas para HER2 y CD3 específicas entre especies

Clonación de moléculas de unión específicas entre especies

Generalmente, se diseñan las moléculas de anticuerpo de cadena única biespecíficas, comprendiendo cada una un dominio con una especificidad de unión específica entre especies para CD3 épsilon humana y de primate distinto del chimpancé, así como un dominio con una especificidad de unión específica entre especies para HER2 humano y de macaco, como se muestra en la siguiente Tabla 13:

Tabla 13: Formatos de moléculas de anticuerpo de cadena única biespecíficas anti-CD3 y anti-HER2 específicas entre especies

SEQ ID (nucl/prot)	Formatos de construcciones de proteínas (N → C)
1153/1152	2D3 HL x I2C HL
1167/1166	3E1 HL x I2C HL

Las construcciones mencionadas anteriormente que contienen los dominios variable de cadena ligera (L) y variable de cadena pesada (H) específicos entre especies para HER2 humano y de macaco y las combinaciones de VH y VL específicas para CD3 específicas entre especies para CD3 humano y de macaco se obtuvieron por síntesis génica. Los fragmentos de la síntesis génica se diseñaron de manera que contuvieran en primer lugar un sitio Kozak para la expresión de la construcción en eucariotas, seguido por un péptido líder de inmunoglobulina de 19 aminoácidos, seguido en marco por la secuencia codificadora de la molécula de anticuerpo de cadena única biespecífica respectiva, seguido en marco por la secuencia codificadora de una etiqueta de 6 histidinas y un codón de parada. El fragmento de la síntesis génica también se diseñó para introducir sitios de restricción adecuados al comienzo y al final del fragmento. Los sitios de restricción introducidos se utilizaron en los siguientes procedimientos de clonación. El fragmento de la síntesis génica se clonó mediante estos sitios de restricción en un plásmido designado pEF-DHFR (pEF-DHFR se describe en Raum et al. Cancer Immunol Immunother 50 (2001) 141-150) siguiendo protocolos estándar. Los procedimientos mencionados anteriormente se llevaron a cabo según protocolos estándar (Sambrook, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 3ª edición, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, Nueva York (2001)). Un clon con una secuencia de nucleótidos con secuencia verificada se transfirió en células CHO deficientes para DHFR para la expresión de la construcción en eucariotas. La expresión de la proteína en eucariotas en células CHO deficientes para DHFR se realizó como se describe por Kaufmann R.J. (1990) Methods Enzymol. 185, 537-566. La amplificación génica de la construcción se indujo por concentraciones crecientes de metotrexato (MTX) hasta una concentración final de hasta MTX 20 nM.

30.4 Expresión y purificación de las moléculas de anticuerpo de cadena única biespecíficas

Las moléculas de anticuerpo de cadena única biespecíficas se expresaron en células de ovario de hámster chino (CHO). La expresión de la proteína en eucariotas en células CHO deficientes para DHFR se realizó como se describe por Kaufmann R.J. (1990) Methods Enzymol. 185, 537-566. La amplificación génica de las construcciones se indujo por la adición de concentraciones crecientes de MTX hasta concentraciones finales de MTX 20 nM. Después de dos subcultivos de cultivo estacionario, las células se crecen en botellas de cultivo rotatorias con medio líquido de soja HyQ PF CHO sin nucleósidos (con L-Glutamina 4,0 mM con 0,1 % de Pluronic F - 68; HyClone) durante 7 días antes de la recogida. Las células se retiraron por centrifugación y el sobrenadante que contenía la proteína expresada se almacenó a -80°C. La transfección se realizó con reactivo 293fectin (Invitrogen, #12347-019) según el protocolo del fabricante.

Se usaron el Sistema Äkta® Explorer (GE Health Systems) y Software Unicorn® para cromatografía. Se realizó cromatografía de afinidad con metal inmovilizado ("IMAC") usando un Fractogel EMD chelate® (Merck) que se cargó con ZnCl₂ según el protocolo proporcionado por el fabricante. La columna se equilibró con tampón A (tampón fosfato de sodio 20 mM pH 7,2, NaCl 0,1 M) y el sobrenadante del cultivo celular (500 ml) se aplicó a la columna (10 ml) a una velocidad de flujo de 3 ml/min. La columna se lavó con tampón A para eliminar la muestra no unida. La proteína unida se eluyó usando un gradiente de dos etapas de tampón B (tampón fosfato de sodio 20 mM pH 7,2, NaCl 0,1 M, imidazol 0,5 M) según lo siguiente:

Etapas 1: 20 % de tampón B en 6 volúmenes de columna

Etapas 2: 100 % de tampón B en 6 volúmenes de columna

Las fracciones de proteína eluida de la etapa 2 se combinaron para purificación adicional. Todos los productos químicos fueron de grado de investigación y se adquirieron en Sigma (Deisenhofen) o Merck (Darmstadt).

La cromatografía de filtración en gel se realizó en una columna de grado preparativo HiLoad 16/60 Superdex 200 (GE/Amersham) equilibrada con tampón Equi (Citrato 25 mM, Lisina 200 mM, 5 % de Glicerol, pH 7,2). Las muestras de proteínas eluidas (velocidad de flujo 1 ml/min) se sometieron a SDS-PAGE estándar y Transferencia Western para su detección. Antes de la purificación, la columna se calibró para la determinación del peso molecular (kit de marcadores de peso molecular, Sigma MW GF-200). Las concentraciones de proteína se determinaron usando DO280 nm.

La proteína de anticuerpo de cadena única biespecífico purificada se analizó en SDS PAGE en condiciones reductoras realizada con geles preparados comercialmente de Bis Tris al 4-12 % (Invitrogen). La preparación y aplicación de las muestras se realizaron según el protocolo proporcionado por el fabricante. El peso molecular se determinó con el estándar de proteínas MultiMark (Invitrogen). El gel se tiñó con Coomassie coloidal (protocolo de Invitrogen). La pureza de la proteína aislada fue >95 % como se determina por SDS-PAGE.

El anticuerpo de cadena única biespecífico tiene un peso molecular de aproximadamente 52 kDa en condiciones nativas como se determina con filtración en gel in PBS. Todas las construcciones se purificaron según este método.

5 Se realizó Transferencia Western usando una membrana Optitran® BA-S83 y el Módulo de Transferencia de Invitrogen según el protocolo proporcionado por el fabricante. Para la detección de la proteína de anticuerpo de cadena única biespecífico se usó un anticuerpo anti-Etiqueta His (Penta His, Qiagen). Se usó un anticuerpo anti-Ig de ratón de cabra marcado con fosfatasa alcalina (AP) (Sigma) como anticuerpo secundario y BCIP/NBT (Sigma) como sustrato. Se detectó una única banda a 52 kD correspondiente al anticuerpo de cadena única biespecífico purificado.

30.5 Análisis por citometría de flujo de la unión de los anticuerpos biespecíficos para HER2 y CD3 específicos entre especies

10 Con el fin de ensayar la funcionalidad de las construcciones de anticuerpo biespecíficas específicas entre especies respecto a la capacidad de unirse a HER2 y CD3 humano y de macaco, respectivamente, se realizó un análisis FACS. Para este propósito, las células CHO transfectadas con HER2 humano como se describe en el Ejemplo 30.1 y la línea celular de leucemia de células T positiva para CD3 humano HPB-ALL (DSMZ, Braunschweig, ACC483) se usan para ensayar la unión a antígenos humanos. La reactividad de la unión a antígenos de macaco se ensayó usando el transfectante HER2 de macaco generado descrito en el Ejemplo 30.2 y una línea de células T de macaco 4119LnPx (proporcionada amablemente por el Prof. Fickenscher, Hygiene Institute, Virology, Erlangen-Nuernberg; publicado en Knappe A, et al., y Fickenscher H., Blood 2000, 95, 3256-61). Se incubaron 200.000 células de las líneas celulares respectivas durante 30 min en hielo con 50 µl de la proteína purificada de las construcciones de anticuerpo biespecíficas específicas entre especies (2 µg/ml). Las células se lavaron dos veces en PBS con 2 % de FCS y la unión de la construcción se detectó con un anticuerpo anti-His murino (anticuerpo frente a Penta His; Qiagen; diluido 1:20 en 50 µl de PBS con 2 % de FCS). Después de lavar, los anticuerpos anti-His unidos se detectaron con un anticuerpo específico de Fc gamma (Dianova) conjugado con ficoeritrina, diluido 1:100 en PBS con 2 % de FCS. Se usó PBS con 2 % de FCS como control negativo para la unión a las líneas de células T, así como a las células CHO transfectadas con HER2.

25 Se realizó citometría de flujo en un aparato FACS-Calibur; se usó el software CellQuest para adquirir y analizar los datos (Becton Dickinson biosciences, Heidelberg). La tinción para FCS y la medición de la intensidad de la fluorescencia se realizaron como se describe en Current Protocols in Immunology (Coligan, Kruisbeek, Margulies, Shevach y Strober, Wiley-Interscience, 2002).

30 La unión biespecífica de las moléculas de cadena única listadas anteriormente, que son específicas entre especies para HER2 y específicas entre especies para CD3 humano y de primate distinto del chimpancé fue claramente detectable como se muestra en la Figura 48. En el análisis FACS, todas las construcciones mostraron unión a CD3 y HER2 comparado con los controles negativos respectivos. Se demostró la especificidad entre especies de los anticuerpos biespecíficos para los antígenos CD3 y HER2 humano y de macaco.

30.6 Bioactividad de los anticuerpos de cadena única biespecíficos para HER2 y CD3 específicos entre especies

35 La bioactividad de los anticuerpos de cadena única biespecíficos generados se analizó por ensayos de citotoxicidad de liberación de cromo 51 (⁵¹Cr) in vitro usando las líneas celulares positivas para HER2 descritas en los Ejemplos 30.1 y 30.2. Como células efectoras se usaron PBMC humanas deplecionadas de CD56 no estimuladas o la línea de células T de macaco 4119LnPx como se especifica en las figuras respectivas.

40 La generación de PBMC humanas deplecionadas de CD56 no estimuladas se realizó como sigue: Las PBMC frescas se aislaron de sangre periférica (30 - 50 ml de sangre humana) por centrifugación en gradiente de Ficoll según protocolos estándar. La depleción de las células NK CD56+ NK se llevó a cabo según protocolos estándar.

45 Las células diana se lavaron dos veces con PBS y se marcaron con 11,1 MBq de ⁵¹Cr en un volumen final de 100 µl de RPMI con 50 % de FCS durante 45 minutos a 37 °C. Posteriormente, las células diana marcadas se lavaron 3 veces con 5 ml de RPMI y se usaron entonces en el ensayo de citotoxicidad. El ensayo se realizó en una placa de 96 pocillos en un volumen total de 250 µl de RPMI suplementado (como anteriormente) con una relación E:D de 10:1. Se aplicaron 1 µg/ml de las moléculas de anticuerpo de cadena única biespecíficas específicas entre especies y 15 - 21 diluciones de cinco veces de las mismas. El tiempo del ensayo fue 18 horas y la citotoxicidad se midió como valores relativos de cromo liberado en el sobrenadante relacionado con la diferencia de lisis máxima (adición de Tritón-X) y lisis espontánea (sin células efectoras). Todas las mediciones se hicieron en cuadruplicado. La medición de la actividad de cromo en los sobrenadantes se realizó con un contador gamma Wizard 3" (Perkin Elmer Life Sciences GmbH, Colonia, Alemania). El análisis de los datos experimentales se realizó con Prism 4 para Windows (versión 4.02, GraphPad Software Inc., San Diego, California, EEUU). Las curvas de respuesta a la dosis sigmoidales tienen típicamente valores de R² >0,90 como se determina por el software. Los valores de CE₅₀ calculados por el programa de análisis se usaron para la comparación de la bioactividad.

55 Como se muestra en la Figura 49, todas las construcciones de anticuerpo de cadena única biespecíficas específicas entre especies generadas demostraron actividad citotóxica frente a células diana positivas para HER2 humano

incitadas por PBMC deplecionadas de CD56 no estimuladas y frente a células diana positivas para HER2 de macaco incitadas por la línea de células T de macaco 4119LnPx.

31. Purificación de las moléculas de cadena única biespecíficas específicas entre especies por un procedimiento de afinidad basado en el epítipo de CD3 épsilon independiente de contexto correspondiente a los aminoácidos 1-27 N-terminales

31.1 Generación de una columna de afinidad que presenta el epítipo de CD3 épsilon independiente de contexto aislado correspondiente a los aminoácidos 1-27 N-terminales

El plásmido para la expresión de la construcción 1-27 CD3-Fc que consiste en los aminoácidos 1-27 N-terminales de la cadena CD3 épsilon humana fusionados con la región bisagra y Fc gamma de la inmunoglobulina IgG1 humana descrita anteriormente (Ejemplo 3; la secuencia de ADNc y la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión recombinante se listan como SEQ ID NOs 350 y 349) se transfectó en células CHO deficientes para DHFR para la expresión de la construcción en eucariotas. La expresión de la proteína en eucariotas en células CHO deficientes para DHFR se realizó como se describe por Kaufmann R.J. (1990) *Methods Enzymol.* 185, 537-566. La amplificación génica de la construcción se indujo por concentraciones crecientes de metotrexato (MTX) a una concentración final de hasta 20 nM. Después de dos subcultivos de cultivo estacionario, las células se crecieron en botellas de cultivo rotatorias con medio líquido de soja HyQ PF CHO sin nucleósidos (con L-Glutamina 4,0 mM con 0,1 % de Pluronic F - 68; HyClone) durante 7 días antes de la recogida. Las células se retiraron por centrifugación y el sobrenadante que contenía la proteína expresada se almacenó a -20°C. Para el aislamiento de la proteína de fusión se preparó una columna de afinidad de anti-Fc humano de cabra según protocolos estándar usando un anticuerpo específico anti-fragmento Fc de IgG humana de cabra purificado por afinidad disponible comercialmente con una reacción cruzada mínima para las proteínas séricas bovinas, de caballo y de ratón (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd.). Usando esta columna de afinidad, la proteína de fusión se aisló del sobrenadante del cultivo celular en un Sistema Äkta Explorer (GE Amersham) y se eluyó con ácido cítrico. El eluato se neutralizó y se concentró. Después de dializar frente a tampón de acoplamiento sin amina, la proteína de fusión purificada se acopló a una columna HiTrap de 1 ml activada con N-Hidroxi-Succinimida NHS (GE Amersham).

Después del acoplamiento, los grupos NHS remanentes se bloquearon y la columna se lavó y se almacenó a 5 °C en tampón de almacenamiento que contenía azida de sodio al 0,1 %.

31.2 Purificación de las moléculas de cadena única biespecíficas específicas entre especies usando una columna de afinidad de péptido CD3 humano

Se esterilizaron por filtración 200 ml del sobrenadante del cultivo celular de células que expresan moléculas de cadena única biespecíficas específicas entre especies a través de un filtro de 0,2 µm y se aplicaron a la columna de afinidad del péptido CD3 usando un Sistema Äkta Explorer (GE Amersham).

La columna se lavó entonces con disolución salina tamponada con fosfato PBS pH 7,4 para eliminar por lavado la muestra no unida. La elución se hizo con tampón ácido pH 3,0 que contenía Ácido cítrico 20 mM y cloruro de sodio 1 M. La proteína eluida se neutralizó inmediatamente con Trishidroximetilamina TRIS 1 M pH 8,3 contenida en los tubos de recogida del recolector de fracciones.

El análisis de proteínas se hizo por SDS PAGE y Transferencia Western.

Para SDS PAGE, se usan Geles de BisTris al 4-12 % (Invitrogen). El tampón de operación fue 1 x MES-SDS-Puffer (Invitrogen). Como estándar de proteína, se aplicaron 15 µl de Estándar de Proteínas Definido preteñido (Invitrogen). La electroforesis se realizó durante 60 minutos a 200 voltios 120 mA máx. Los geles se lavaron en agua desmineralizada y se tiñeron con Coomassie durante una hora. Los geles se destiñeron en agua desmineralizada durante 3 horas. Las fotografías se hacen con un sistema de documentación Syngene Gel.

Para la Transferencia Western se generó un duplicado del gel de SDS PAGE y las proteínas se electrotransfirieron en una membrana de nitrocelulosa. La membrana se bloqueó con 2 % de albúmina de suero bovino en PBS y se incubó con un anticuerpo Penta His murino biotinilado (Qiagen). Como reactivo secundario se usó un conjugado de estreptavidina fosfatasa alcalina (DAKO). Las transferencias se revelaron con disolución de sustrato BCIP/NBT (Pierce).

Como se demuestra en las Figuras 50, 51 y 52, el uso de una columna de afinidad del péptido CD3 humano como se ha descrito anteriormente permite la purificación altamente eficiente de las moléculas de cadena única biespecíficas del sobrenadante del cultivo celular. Los anticuerpos de cadena única anti-CD3 específicos entre especies contenidos en las moléculas de cadena única biespecíficas permiten, por lo tanto, mediante sus propiedades de unión específica, un método de purificación eficiente genérico en una etapa para las moléculas de cadena única biespecíficas específicas entre especies, sin la necesidad de ninguna etiqueta unida solamente para propósitos de purificación.

32. Ensayo de farmacocinética genérico para las moléculas de cadena única biespecíficas específicas entre especies

32.1 Producción de 1-27 CD3-Fc para uso en el ensayo farmacocinético

5 La secuencia codificadora de los aminoácidos 1-27 N-terminales de la cadena CD3 épsilon humana fusionados con la región bisagra y Fc gamma de la inmunoglobulina IgG1 humana se obtuvo por síntesis génica según protocolos estándar (la secuencia de ADNc y la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión recombinante se listan como SEQ ID NOs 1111 y 1112). El fragmento de la síntesis génica se diseñó de manera que contuviera en primer lugar un sitio Kozak para la expresión de la construcción en eucariotas, seguido por un péptido líder de inmunoglobulina de 19 aminoácidos, seguido en marco por la secuencia codificadora de los primeros 27 aminoácidos de la parte extracelular de la cadena CD3 épsilon humana madura, seguido en marco por la secuencia codificadora de la región bisagra y la parte Fc gamma de IgG1 humana y un codón de parada. El fragmento de la síntesis génica también se diseñó para introducir sitios de restricción al comienzo y al final del ADNc que codifica la proteína de fusión. Los sitios de restricción introducidos, EcoRI en el extremo 5' y Sall en el extremo 3', se utilizaron en los siguientes procedimientos de clonación. El fragmento de la síntesis génica se clonó mediante EcoRI y Sall en un plásmido designado pEF-DHFR (pEF-DHFR se describe en Raum et al. Cancer Immunol Immunother 50 (2001) 141-150) siguiendo protocolos estándar. Los procedimientos mencionados anteriormente se llevaron a cabo según protocolos estándar (Sambrook, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 3ª edición, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, Nueva York (2001)). Un clon con una secuencia de nucleótidos con secuencia verificada se transfirió en células CHO deficientes para DHFR para la expresión de la construcción en eucariotas. La expresión de la proteína en eucariotas en células CHO deficientes para DHFR se realizó como se describe por Kaufmann R.J. (1990) Methods Enzymol. 185, 537-566. La amplificación génica de la construcción se indujo por concentraciones crecientes de metotrexato (MTX) hasta una concentración final de hasta MTX 20 nM. Después de dos subcultivos de cultivo estacionario, las células se crecieron en botellas de cultivo rotatorias con medio líquido de soja HyQ PF CHO sin nucleósidos (con L-Glutamina 4,0 mM con 0,1 % de Pluronic F - 68; HyClone) durante 7 días antes de la recogida. Las células se retiraron por centrifugación y el sobrenadante que contenía la proteína expresada se almacenó a -20°C. Para el aislamiento de la proteína de fusión, se preparó una columna de afinidad de anti-Fc humano de cabra según protocolos estándar usando un anticuerpo específico anti-fragmento Fc de IgG humana de cabra purificado por afinidad disponible comercialmente con una reacción cruzada mínima para las proteínas séricas bovinas, de caballo y de ratón (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd.). Usando esta columna de afinidad, la proteína de fusión se aisló del sobrenadante del cultivo celular en un Sistema Äkta Explorer (GE Amersham) y se eluyó con ácido cítrico. El eluato se neutralizó y se concentró.

32.2 Ensayo farmacocinético para moléculas de cadena única biespecíficas específicas entre especies

El ensayo se basa en la tecnología ECL-ELISA usando detección con marcaje con rutenio en placas de carbono medida en un dispositivo Sektor Imager (MSD). En una primera etapa, las placas de carbono (MSD Placa de Alta Unión de 96 pocillos Cat: L15xB-3) se recubrieron con 5 µl/pocillo a 50 ng/ml de la 1-27 CD3-Fc purificada descrita en el Ejemplo 32.1. La placa se secó entonces toda la noche a 25 °C. Posteriormente, las placas se bloquearon con 5 % de BSA (Paesel&Lorei #100568) en PBS a 150 µl/pocillo durante 1h a 25 °C en un incubador con agitación (700 rpm). En la siguiente etapa, las placas se lavaron tres veces con 0,05 % de Tween en PBS. Se generó una curva estándar en 50 % de suero de macaco en PBS por la dilución seriada 1:4 empezando a 100 ng/ml de la molécula de cadena única biespecífica específica entre especies respectiva que se va a detectar en el ensayo. Las muestras de control de calidad (QC) se prepararon en 50 % de suero de macaco en PBS en un intervalo de 1 ng/ml a 50 ng/ml de la molécula de cadena única biespecífica específica entre especies respectiva dependiendo de las concentraciones séricas de muestra esperadas. Las muestras estándar, de QC o desconocidas se transfirieron a las placas de carbono a 10 µl/pocillo y se incubaron durante 90 min a 25 °C en el incubador con agitación (700 rpm). Posteriormente, las placas se lavaron tres veces con 0,05 % de Tween en PBS. Para la detección, se añadieron 25 µl/pocillo de anticuerpo frente a penta-His-Biotina (Qiagen, 200 µg/ml en 0,05 % de Tween en PBS) y se incubó durante 1 h a 25 °C en un incubador con agitación (700 rpm). En una segunda etapa de detección, se añadieron 25 µl/pocillo de disolución de Estreptavidina-SulfoTag (MSD; Cat: R32AD-1; Lote: W0010903) y se incubó durante 1 h a 25 °C en un incubador con agitación (700 rpm). Posteriormente, las placas se lavaron tres veces con 0,05 % de Tween en PBS. Finalmente, se añadieron 150 µl/pocillo de Tampón de Lectura MSD (MSD, Cat: R9ZC-1) y las placas se leyeron en el dispositivo Sektor Imager.

Las Figuras 53 y 54 demuestran la idoneidad de la detección de las moléculas de cadena única biespecíficas específicas entre especies en muestras de suero de monos macacos para las moléculas de cadena única biespecíficas específicas entre especies. Los anticuerpos de cadena única anti-CD3 específicos entre especies contenidos en las moléculas de cadena única biespecíficas permiten, por lo tanto, mediante sus propiedades de unión específica, un ensayo genérico altamente sensible para la detección de las moléculas de cadena única biespecíficas específicas entre especies. El ensayo mostrado anteriormente puede usarse en el contexto de estudios toxicológicos formales que son necesarios para el desarrollo de fármacos y puede adaptarse fácilmente para la medición de muestras de pacientes en conexión con la aplicación clínica de las moléculas de cadena única biespecíficas específicas entre especies.

33. Generación de proteínas de fusión transmembrana recombinantes de los aminoácidos 1-27 N-terminales de CD3 épsilon de diferentes primates distintos de chimpancés fusionados con EpCAM de mono cynomolgus (1-27 CD3-EpCAM).

33.1 Clonación y expresión de 1-27 CD3-EpCAM

5 Se aisló CD3 épsilon de diferentes primates distintos de chimpancés (tití, tamarín, mono ardilla) y suido. Las secuencias codificadoras de los aminoácidos 1-27 N-terminales de la cadena CD3 épsilon de la madura humana, de tití común (*Callithrix jacchus*), de tamarín con cabeza de algodón (*Saguinus oedipus*), mono ardilla común (*Saimiri sciureus*) y suido doméstico (*Sus scrofa*; usado como control negativo) fusionadas con el extremo N de EpCAM de cynomolgus etiquetado con Flag se obtuvieron por síntesis génica según protocolos estándar (la secuencia de ADNc y la secuencia de aminoácidos de las proteínas de fusión recombinantes se listan como SEQ ID NOs 351 a 360). Los fragmentos de la síntesis génica se diseñaron de manera que contuvieran en primer lugar un sitio BsrGI para permitir la fusión en el marco de lectura correcto con la secuencia codificadora de un péptido líder de inmunoglobulina de 19 aminoácidos ya presente en el vector de expresión diana, que estaba seguido en marco por la secuencia codificadora de los aminoácidos 1-27 N-terminales de la parte extracelular de la cadena CD3 épsilon maduras, que estaba seguido en marco por la secuencia codificadora de una etiqueta Flag y seguido en marco por la secuencia codificadora de la proteína transmembrana EpCAM de cynomolgus madura. Los fragmentos de la síntesis génica también se diseñaron para introducir un sitio de restricción en el extremo del ADNc que codifica la proteína de fusión. Los sitios de restricción introducidos BsrGI en el extremo 5' y Sall en el extremo 3', se utilizaron en los siguientes procedimientos de clonación. Los fragmentos de la síntesis génica se clonaron entonces mediante BsrGI y Sall en un derivado del plásmido designado pEF-DHFR (pEF-DHFR se describe en Raum et al. Cancer Immunol Immunother 50 (2001) 141-150), que ya contiene la secuencia codificadora del péptido líder de inmunoglobulina de 19 aminoácidos siguiendo protocolos estándar. Se usaron plásmidos de secuencia verificada para transfectar células CHO deficientes para DHFR para la expresión de la construcción en eucariotas. La expresión de la proteína en eucariotas en células CHO deficientes para DHFR se realizó como se describe por Kaufmann R.J. (1990) Methods Enzymol. 185, 537-566. La amplificación génica de la construcción se indujo por concentraciones crecientes de metotrexato (MTX) hasta una concentración final de hasta MTX 20 nM.

Los transfectantes se ensayaron para determinar la expresión en la superficie celular de la proteína transmembrana recombinante mediante un ensayo FACS según protocolos estándar. Para este propósito, un número de $2,5 \times 10^5$ células se incubaron con 50 μ l del anticuerpo anti-Flag M2 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Alemania) a 5 μ g/ml en PBS con 2 % de FCS. El anticuerpo unido se detectó con un fragmento F(ab')₂ purificado por afinidad conjugado con R-Ficoeritrina, anti-IgG de ratón de cabra, específico del fragmento Fc-gamma 1:100 en PBS con 2 % de FCS (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Newmarket, Suffolk, Reino Unido). Se realizó citometría de flujo en un aparato FACS-Calibur, se usó el software CellQuest para adquirir y analizar los datos (Becton Dickinson biosciences, Heidelberg). La tinción para FACS y la medición de la intensidad de la fluorescencia se realizaron como se describe en Current Protocols in Immunology (Coligan, Kruisbeek, Margulies, Shevach y Strober, Wiley-Interscience, 2002).

La expresión de las proteínas de fusión transmembrana recombinantes etiquetadas con Flag que consistían en EpCAM de cynomolgus y los aminoácidos 1-27 N-terminales de la cadena CD3 épsilon humana, de tití, de tamarín, de mono ardilla y de suido, respectivamente, en células transfectadas es claramente detectable (Figura 55).

40 33.2 Clonación y expresión del anticuerpo de cadena única anti-CD3 específico entre especies I2C HL en la forma de un anticuerpo IgG1

Con el fin de proporcionar medios mejorados para la detección de la unión del anticuerpo de cadena única anti-CD3 específico entre especies, la especificidad de I2C VHVL se convierte en un anticuerpo IgG1 con IgG1 murina y regiones constantes kappa murinas. Las secuencias de ADNc que codifican la cadena pesada del anticuerpo IgG se obtuvieron por síntesis génica según protocolos estándar. Los fragmentos de la síntesis génica se diseñaron de manera que contuvieran en primer lugar un sitio Kozak para permitir la expresión de la construcción en eucariotas, que está seguido por un péptido líder de inmunoglobulina de 19 aminoácidos, que está seguido en marco por la secuencia codificadora de la región variable de cadena pesada o región variable de cadena ligera, seguido en marco por la secuencia codificadora de la región constante de cadena pesada de IgG1 murina como se publica en GenBank (Número de acceso AB097849) o la secuencia codificadora de la región constante de cadena ligera kappa murina como se publica en GenBank (Número de acceso D14630), respectivamente.

Se introdujeron sitios de restricción al comienzo y al final del ADNc que codifica la proteína de fusión. Los sitios de restricción EcoRI en el extremo 5' y Sall en el extremo 3' se usaron para los siguientes procedimientos de clonación. Los fragmentos de la síntesis génica se clonaron mediante EcoRI y Sall en un plásmido designado pEF-DHFR (pEF-DHFR se describe en Raum et al. Cancer Immunol Immunother 50 (2001) 141-150) para la construcción de cadena pesada y pEFADA (pEFADA se describe en Raum et al. Cancer Immunol Immunother 50 (2001) 141-150) para la construcción de cadena ligera según protocolos estándar. Se usaron plásmidos con la secuencia verificada para la cotransfección de las construcciones de cadena ligera y pesada respectivas en células CHO deficientes para DHFR para la expresión de la construcción en eucariotas. La expresión de la proteína en eucariotas en células CHO deficientes para DHFR se realizó como se describe por Kaufmann R.J. (1990) Methods Enzymol. 185, 537-566. La

amplificación génica de las construcciones se indujo por concentraciones crecientes de metotrexato (MTX) hasta una concentración final de hasta MTX 20 nM y desoxicofurcina (dCF) hasta una concentración final de hasta dCF 300 nM.

5 Después de dos subcultivos de cultivo estacionario, el sobrenadante del cultivo celular se recogió y se usó en el experimento posterior.

33.3 Unión del anticuerpo de cadena única anti-CD3 específico entre especies I2C HL en la forma de un anticuerpo IgG1 a 1-27 CD3-EpCAM

10 La unión de la construcción I2C IgG1 generada a los aminoácidos 1-27 N-terminales de las cadenas CD3 épsilon humana, de tití, de tamarín y de mono ardilla, respectivamente, fusionados con Ep-CAM de cynomolgus como se describe en el Ejemplo 33.1 se ensayó en un ensayo FACS según protocolos estándar. Para este propósito, un número de $2,5 \times 10^5$ células se incubaron con 50 μ l de sobrenadante de cultivo celular que contenía la construcción I2C IgG1 como se describe en el Ejemplo 33.2. La unión del anticuerpo se detectó con un fragmento F(ab')₂ purificado por afinidad conjugado con R-Ficoeritrina, anti-IgG de ratón de cabra, específico del fragmento Fc gamma diluido 1:100 en PBS con 2 % de FCS (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Newmarket, Suffolk, Reino Unido). Se realizó citometría de flujo en un aparato FACS-Calibur, se usó el software CellQuest para adquirir y analizar los datos (Becton Dickinson biosciences, Heidelberg). La tinción para FACS y la medición de la intensidad de la fluorescencia se realizaron como se describe en Current Protocols in Immunology (Coligan, Kruisbeek, Margulies, Shevach y Strober, Wiley-Interscience, 2002).

20 Como se muestra en la Figura 56, se observó la unión de la construcción I2C IgG1 a los transfectantes que expresaban las proteínas de fusión transmembrana recombinantes que consistían en los aminoácidos 1-27 N-terminales de CD3 épsilon humana, de tití, de tamarín o de mono ardilla fusionados con EpCAM de cynomolgus comparado con el control negativo que consistía en los aminoácidos 1-27 N-terminales de CD3 épsilon de suido fusionados con EpCAM de cynomolgus. Así, se demostró la especificidad entre especies en múltiples primates de I2C. Las señales obtenidas con el anticuerpo anti Flag M2 y la construcción I2C IgG1 fueron comparables, indicando una actividad de unión fuerte de la especificidad específica entre especies de I2C a los aminoácidos 1-27 N-terminales de CD3 épsilon.

34. Unión de la molécula de unión anti-CD3 específica entre especies I2C a la cadena CD3 épsilon humana con y sin etiqueta His6 N-terminal

30 Un anticuerpo IgG1 quimérico con la especificidad de unión de I2C como se describe en el Ejemplo 33.2 específico para CD3 épsilon se ensayó para determinar su unión a CD3 épsilon humana con y sin etiqueta His6 N-terminal. La unión del anticuerpo a las líneas celulares EL4 transfectadas con CD3 épsilon humana con His6 como se describe en el Ejemplo 6.1 y CD3 épsilon humana de tipo salvaje como se describe en el Ejemplo 5.1, respectivamente, se ensayó por un ensayo FACS según protocolos estándar. Se incubaron $2,5 \times 10^5$ células de los transfectantes con 50 μ l de sobrenadante de cultivo celular que contenía la construcción I2C IgG1 o 50 μ l de los anticuerpos control respectivos a 5 μ g/ml en PBS con 2 % de FCS. Como control negativo se usó un control de isotipo apropiado y como control positivo para la expresión de las construcciones el anticuerpo específico de CD3 UCHT-1, respectivamente. La detección de la etiqueta His6 se realizó con el anticuerpo frente a penta His (Qiagen). La unión de los anticuerpos se detectó con un fragmento F(ab')₂ purificado por afinidad conjugado con R-Ficoeritrina, anti-IgG de ratón de cabra, específico del fragmento Fc gamma diluido 1:100 en PBS con 2 % de FCS (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Newmarket, Suffolk, Reino Unido). Se realizó citometría de flujo en un aparato FACS-Calibur, se usó el software CellQuest se usó para adquirir y analizar los datos (Becton Dickinson biosciences, Heidelberg). La tinción para FACS y la medición de la intensidad de la fluorescencia se realizaron como se describe en Current Protocols in Immunology (Coligan, Kruisbeek, Margulies, Shevach y Strober, Wiley-Interscience, 2002).

45 La unión comparable del anticuerpo anti-CD3 humano UCHT-1 a ambos transfectantes demuestra niveles aproximadamente iguales de expresión de las construcciones. La unión del anticuerpo frente a penta His confirmó la presencia de la etiqueta His6 en la construcción His6-CD3 humano, pero no en la construcción de tipo salvaje.

Comparado con la línea celular EL4 transfectada con CD3 épsilon humana de tipo salvaje, se detectó una pérdida clara de unión de la construcción I2C IgG1 a CD3 épsilon humana con una etiqueta His6 N-terminal. Estos resultados muestran que es esencial un extremo N libre de CD3 épsilon para la unión de la especificidad de unión I2C anti-CD3 específica entre especies a la cadena CD3 épsilon humana (Figura 57).

50 35. Construcciones de anticuerpo de cadena única biespecíficas dirigidas a CD3 humano y de primate distinto del chimpancé y a epítomos específicos de tumor de Muc-1

55 La secuencia VH de la línea germinal de anticuerpo humano VH3 3-72 (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) se eligió como contexto de marco para CDRH1 (SEQ ID 1486), CDRH2 (SEQ ID 1487) y CDRH3 (SEQ ID 1488). Asimismo, la secuencia VH de la línea germinal de anticuerpo humano VH3 3-73 (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) se eligió como contexto de marco para CDRH1 (SEQ ID 1492), CDRH2 (SEQ ID 1493) y CDRH3 (SEQ ID 1494). Para cada VH humana, tenían que sintetizarse varios oligonucleótidos degenerados que se superpusieran en una cadena terminal de aproximadamente 15-20 nucleótidos. Para este propósito, cada segundo cebador fue un cebador antisentido. Para VH3 3-72, se usaron los siguientes oligonucleótidos:

ES 2 695 047 T3

5' VH72-A-XhoI

GAAGTGAAGCTTCTCGAGTCTGGAGGAGGCTTGGTGCAACCTGGAGGATCCMT
GARACTCTCTTGTGCTGCT

3' VH72-B

CTGGCGGACCCAGTCCATCCAGGCATCACTAAAAGTGAATCCAGAAGCAGCAC
AAGAGAG

5 5' VH72-C

GACTGGGTCCGCCAGKCTCCAGRGAAGGGGCTTGAGTGGGTTGSTGAAATTAG
AAACAAAGCCAAT

3' VH72-D

TTTGAATCATCTCTTGAGATGGTGAACCTCCCTTTCACAGACTCATCATAATAT
GTTGCATGATTATTGGCTTTGTTTCT

5' VH72-E

10 AGAGATGATTCCAAAARTAGMSTGTACCTGCAAATGAWMAGCTTAARARCTGAA
GACTGSCSTTTATTACTGTACTGGG

3' VH72-F-BstEII

GACCGTGGTGACCAGAGTCCCCTGGCCCCAGTTAGCAAACCTCCCCAGTACAGT
AATA

Para VH3 3-73, los oligonucleótidos fueron como sigue:

5' VH73-A-XhoI

15 CAAGTTCAGCTGCTCGAGTCTGGAGGAGGCTTGGTGCAACCTGGAGGATCC

3' VH73-B

CCAGTTCATCCAGTAGTACTGAAAGTGAATCCAGAGGCARACAGGAGAGTTT
CAKGGATCCTCCAGGTTG

5' VH73-C

TACTGGATGAACTGGGTCCGCCAGKCTYCAGRGAAGGGGCTTGAGTGGGTTGS
TGAAATTAGATTGAAATCTAAT

20 3' VH73-D

TTTGAATCATCTCTTGAGATGGTGAACCTCCCTTTCACAGACTCCGCATAATGT
GTTGCATAATTATTAGATTTCAATCT

5' VH73-E

AGAGATGATTCCAAAARTASTGYCTACCTGCAAATGAACARCTTAARARCTGAAG
ACACTGSCRITTTATTACTGTACGGGA

3' VH73-F-BstEII

25 GACCGTGGTGACCGTGGTCCCCTTGGCCCCAGTAAGCAAATTGTCCCACTCCCG
TACAGTAATA

Cada uno de estos conjuntos de cebadores abarca la secuencia VH completa correspondiente.

En cada conjunto de cebadores, se mezclaron en cantidades iguales (p. ej., 1 µl de cada cebador (preparaciones madre de cebadores 20 a 100 µM) a una reacción de PCR de 20 µl) y se añadieron a una mezcla de PCR que consistía

en tampón de PCR, nucleótidos y Taq polimerasa. Esta mezcla se incubó a 94 °C durante 3 minutos, 65 °C durante 1 minuto, 62 °C durante 1 minuto, 59 °C durante 1 minuto, 56 °C durante 1 minuto, 52 °C durante 1 minuto, 50 °C durante 1 minuto y a 72°C durante 10 minutos en un ciclador de PCR. Posteriormente, el producto se corrió en una electroforesis en gel de agarosa y el producto con un tamaño de 200 a 400 se aisló del gel según métodos estándar.

- 5 Cada producto VH de PCR se usó entonces como un molde para una reacción estándar de PCR usando cebadores que incorporan sitios de restricción para la clonación N-terminales y C-terminales adecuados. El fragmento de ADN con el tamaño correcto (para una VH aproximadamente 350 nucleótidos) se aisló por electroforesis en gel de agarosa según métodos estándar. De esta manera, se amplificó suficiente fragmento de ADN de VH.

- 10 La secuencia de VL de la línea germinal de anticuerpo humano VklI A18 (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) se eligió como contexto de marco para CDRL1 (SEQ ID 1489), CDRL2 (SEQ ID 1490) y CDRL3 (SEQ ID 1491). Asimismo, la secuencia de VL de la línea germinal de anticuerpo humano VL7 7a (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) se eligió como contexto de marco para CDRL1 (SEQ ID 1495), CDRL2 (SEQ ID 1496) y CDRL3 (SEQ ID 1497). Para cada VL humana, tenían que sintetizarse varios oligonucleótidos degenerados que se superpusieran en una cadena terminal de aproximadamente 15-20 nucleótidos. Para este propósito, cada segundo cebador fue un cebador antisentido. Los sitios de restricción necesarios para la clonación posterior en los oligonucleótidos se delecionaron. Para VklI A18, se usaron los siguientes oligonucleótidos:

5' Vk2A18-A-Sacl

**CCTGATGAGCTCGTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGYCTGTCASTCYTGGA
SAKCMAGCTTCCATCTCTTGC**

3' Vk2A18-B

20 **CCAATATAAATAGGTGTTTCCATTGTTGTGTACCAGGTTCTGACTAGATCTGCAA
GAGATGGAAGC**

5' Vk2A18-C

**ACCTATTTATATTGGTWCCTGCAGAAGYCAGGCCAGTCTCCAMAGCTCCTGATT
TATAGGGCTTCCATC**

3' Vk2A18-D

**CTTGAGTGTGAAATCTGTCYCTGATCCACTGCCACTGAACCTGTCTGGGACCCC
AGAAAATCGGATGGAAGCCCTATA**

- 25 5' Vk2A18-E

**ACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATSTGGGAGTTTAT
TWCTGCTTTCAAGGTACACAT**

3' Vk2A18-F-BsiWI/Spel

**CCCGATACTAGTCGTACGTTTGATTTCCAGCTTGGTGCCTTGACCGAACGTCCA
CGGAACATGTGTACCTTGAAAGCA**

Para VL7 7a los oligonucleótidos fueron como sigue:

- 30 5' Vlam7a-A-Sacl

**CCTGCAGAGCTCGTTGTGACTCAGGAAYCTKCACTCACCRYATCACCTGGTGRA
ACAGTCACACTCACTTGT**

3' Vlam7a-B

**CCAGTTGGCATAGTTACTTGTGTAACAGCCCCAGTACTTGAGCGACAAGTGAG
TGTGACTGT**

5' Vlam7a-C

- 35 **AACTATGCCAACTGGKTCOAASAAAAACCAGRTCAKKYAYYCMSTGSTCTAATAK
RTGGTACCAACAACCGA**

3' Vlam7a-D

**GGTGAGGGCAGCCTTGYCTCCAANKCAGGGAGCCTGAGAATCTGGCAGGARYM
CMTGGTGCTCGGTTGTTGGTACC**

5' Vlam7a-E

**AAGGCTGCCCTCACCMTCWCAGGGGYACAGMCTGAGGATGAGGCARWATATT
WCTGTGCTCTATGGTACAGC**

5 3' Vlam7a-F-BsiWI/Spel

**CCAGTAACTAGTCGTACGTAGGACAGTCAGTTTGGTTCCTCCACCGAACACCCA
ATGGTTGCTGTACCATAGAGCACA**

Cada uno de estos conjuntos de cebadores abarca la secuencia de VL completa correspondiente.

10 En cada conjunto de cebadores, se mezclaron en cantidades iguales (p. ej., 1 µl de cada cebador (preparaciones madre de cebadores 20 a 100 µM) a una reacción de PCR de 20 µl) y se añadieron a una mezcla de PCR que consistía en tampón de PCR, nucleótidos y Taq polimerasa. Esta mezcla se incubó a 94 °C durante 3 minutos, 65 °C durante 1 minuto, 62 °C durante 1 minuto, 59 °C durante 1 minuto, 56 °C durante 1 minuto, 52 °C durante 1 minuto, 50 °C durante 1 minuto y a 72°C durante 10 minutos en un ciclador de PCR. Posteriormente, el producto se corrió en una electroforesis en gel de agarosa y el producto con un tamaño de 200 a 400 se aisló del gel según métodos estándar.

15 Cada producto VL de PCR se usó entonces como un molde para una reacción estándar de PCR usando cebadores que incorporan sitios de restricción para la clonación N-terminales y C-terminales adecuados. El fragmento de ADN con el tamaño correcto (para una VL aproximadamente 330 nucleótidos) se aisló por electroforesis en gel de agarosa según métodos estándar. De esta manera, se amplificó suficiente fragmento de ADN de VL.

20 El producto VH final de PCR basado en VH3 3-72 (es decir, el repertorio de VH humana/humanizada) se combinó entonces con el producto VL final de PCR basado en Vkl A18 (es decir, el repertorio de VL humana/humanizada) y el producto VH final de PCR basado en VH3 3-73 (es decir, el repertorio de VH humana/humanizada) con el producto VL final de PCR basado en VL7 7a (es decir, el repertorio de VL humana/humanizada) en el vector de exposición en fago pComb3H5Bhis para formar dos bibliotecas diferentes de scFv funcionales a partir de las cuales - después de la exposición en fago filamentoso - se seleccionaron agentes de unión anti-Muc-1, se cribaron, se identificaron y se confirmaron como se describe a continuación:

25 Se ligaron 450 ng de los fragmentos de cadena ligera (digeridos con SacI-Spel) con 1.400 ng del fagémido pComb3H5Bhis (digerido con SacI-Spel; fragmento grande). La biblioteca de anticuerpos combinatoria resultante se transformó entonces en 300 µl de células Escherichia coli XL1 Blue electrocompetentes por electroporación (2,5 kV, cubeta con 0,2 cm de separación, 25 µFD, 200 Ohm, pulsador génico Biorad) dando como resultado una biblioteca con un tamaño de más 10⁷ clones independientes. Después de una hora de expresión fenotípica, los transformantes positivos se seleccionaron por resistencia a carbenicilina codificada por el vector pComb3H5BHis en 30 100 ml de cultivo en súper caldo (SB) líquido toda la noche. Las células se recogieron por centrifugación y se llevó a cabo la preparación de plásmidos usando un kit de preparación de plásmidos disponible comercialmente (Qiagen).

35 Se ligaron 2.800 ng de este ADN plasmídico que contenía la biblioteca VL (digerido con XhoI-BstEII; fragmento grande) con 900 ng de los fragmentos V de cadena pesada (digeridos con XhoI-BstEII) y se transformaron de nuevo en dos partes alícuotas de 300 µl de células E. coli XL1 Blue electrocompetentes por electroporación (2,5 kV, cubeta con 0,2 cm de separación, 25 µFD, 200 Ohm) dando como resultado una biblioteca de VH-VL scFv (fragmento variable de cadena única) con un tamaño total de más de 10⁷ clones independientes.

40 Después de la expresión fenotípica y adaptación lenta a carbenicilina, las células de E. coli que contenían la biblioteca de anticuerpos se transfirieron en medio de selección SB-Carbenicilina (50 µg/mL). Las células de E. coli que contenían la biblioteca de anticuerpos se infectaron entonces con una dosis infecciosa de 10¹² partículas de fago auxiliar VCSM13 dando como resultado la producción y secreción del fago filamentoso M13, en donde la partícula de fago contiene ADN monocatenario de pComb3H5BHis que codifica un fragmento scFv y presentaba la proteína scFv correspondiente como una fusión de traducción a la proteína de cubierta de fago III. Este conjunto de fagos que presentaban la biblioteca de anticuerpos se usó para la selección de entidades de unión a antígeno.

45 **Generación de células CHO que expresan MUC-1 humano**

La secuencia codificadora de MUC-1 humano como se publica en GenBank (Número de acceso J05581) se obtuvo por síntesis génica según protocolos estándar. El fragmento de la síntesis génica se diseñó de manera que contuviera en primer lugar un sitio Kozak para la expresión de la construcción en eucariotas, seguido por la secuencia codificadora de la proteína MUC-1 humana y un codón de parada (la secuencia de ADNc y de aminoácidos de la construcción se listan como SEQ NOs 1498 y 1499). En el fragmento de la síntesis génica la secuencia de repetición interna

(nucleótidos 382 a 441) de MUC-1, que sólo está contenida una vez en la versión depositada en GenBank está contenida dieciséis veces lo que refleja las múltiples repeticiones en MUC-1 expresado fisiológicamente. El fragmento de la síntesis génica también se diseñó para introducir sitios de restricción al comienzo y al final del fragmento. Los sitios de restricción introducidos, EcoRI en el extremo 5' y Sall en el extremo 3', se utilizaron en los siguientes procedimientos de clonación. Los sitios de restricción XmaI internos se eliminaron por mutación silenciosa de la secuencia codificadora en el fragmento de la síntesis génica (nucleótido 441 de C a T; éste es el último nucleótido de la primera repetición y por lo tanto mutado de forma idéntica en las 15 secuencias de repetición posteriores; y el nucleótido 2160 de G a C). El fragmento de la síntesis génica se clonó mediante EcoRI y Sall en un plásmido designado pEF-DHFR (pEF-DHFR se describe en Raum et al. Cancer Immunol Immunother 50 (2001) 141-150) siguiendo protocolos estándar. Los procedimientos mencionados anteriormente se llevaron a cabo según protocolos estándar (Sambrook, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 3ª edición, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, Nueva York (2001)). Un clon con una secuencia de nucleótidos con secuencia verificada se transfirió en células CHO deficientes para DHFR para la expresión de la construcción en eucariotas. La expresión de la proteína en eucariotas en células CHO deficientes para DHFR se realizó como se describe por Kaufmann R.J. (1990) Methods Enzymol. 185, 537-566. La amplificación génica de la construcción se indujo por concentraciones crecientes de metotrexato (MTX) hasta una concentración final de hasta MTX 20 nM.

Para la selección de entidades de unión a antígeno, la biblioteca de fagos que portaba el repertorio de scFv clonado se recogió del sobrenadante de cultivo respectivo por precipitación con PEG8000/NaCl y centrifugación. Aproximadamente 1.011 a 1.012 partículas de fago scFv se resuspendieron en 0,4 ml de PBS/0,1 % de BSA y se incubaron con 105 a 107 células CHO transfectadas con Muc-1 (véase el ejemplo Muc-1 RoK) durante 1 hora en hielo con agitación lenta. Estas células CHO transfectadas con Muc-1 se recogieron previamente por centrifugación, se lavaron en PBS y se resuspendieron en PBS/1 % de FCS (que contenía Azida Na). Los fagos scFv que no se unen específicamente a las células CHO transfectadas con Muc-1 se eliminaron con hasta cinco etapas de lavado con PBS/1 % de FCS (que contenía Azida Na). Después de lavar, las entidades de unión se eluyeron de las células mediante la resuspensión de las células en HCl-glicina pH 2,2 (incubación de 10 min con agitación con vórtex posterior) y después de la neutralización con Tris 2 M pH 12, el eluato se usó para la infección de un cultivo fresco de E. coli XL1 Blue no infectado (DO600 > 0,5). El cultivo de E. coli que contenía células de E. coli transducidas con éxito con una copia de fagémido, que codifica un fragmento scFv humano/humanizado, se seleccionaron de nuevo por resistencia a carbenicilina y posteriormente se infectaron con el fago auxiliar VCMS 13 para iniciar la segunda ronda de presentación de anticuerpos y selección in vitro. Normalmente, se llevaron a cabo un total de 4 a 5 rondas de selecciones.

Con el fin de cribar para encontrar agentes de unión específicos de Muc-1, el ADN plasmídico correspondiente a 4 y 5 rondas de reconocimiento y selección se aisló de cultivos de E. coli después de la selección. Para la producción de proteína scFv soluble, los fragmentos de ADN de VH-VL se escindieron de los plásmidos (XhoI-SpeI). Estos fragmentos se clonaron mediante los mismos sitios de restricción en el plásmido pComb3H5BFlag/His que se diferenciaba del pComb3H5BHis original en que la construcción de expresión (p. ej., scFv) incluye una etiqueta Flag (DYKDDDDK) entre el scFv y la etiqueta de His6 y se delecionaron las proteínas de fago adicionales. Después de la ligación, cada conjunto (diferentes rondas de reconocimiento y selección) de ADN plasmídico se transformó en 100 µl de E. coli TG1 o XLI blue competentes por choque térmico y se sembró en placas en agar LB con carbenicilina. Se tomaron colonias únicas en 100 µl de LB carb (50 µg/ml).

Las E. coli transformadas con pComb3H5BHis que contenían un segmento de VL y VH producen scFv soluble en cantidades suficientes después de la escisión del fragmento del gen III e inducción con IPTG 1 mM. Debido a una secuencia señal adecuada, la cadena scFv se exportó al periplasma donde se pliega en una conformación funcional.

Se tomaron colonias bacterianas únicas de E. coli TG1 de las placas de transformación para preparaciones periplásmicas a pequeña escala y se crecieron en medio SB (p. ej., 10 ml) suplementado con MgCl₂ 20 mM y 50 µg/ml de carbenicilina (y se redisolieron en PBS (p. ej., 1 ml) después de la recogida. Mediante cuatro rondas de congelación a -70 °C y descongelación a 37 °C, la membrana exterior de las bacterias se destruyó por choque de temperatura y las proteínas periplásmicas solubles incluyendo los scFv se liberaron al sobrenadante. Después de la eliminación de las células intactas y restos celulares por centrifugación, se recogió el sobrenadante que contenía los scFv anti-Muc-1 y se usó para la identificación de agentes de unión específicos de Muc-1 como sigue:

La unión de los scFv a Muc-1 se ensayó por citometría de flujo en células CHO transfectadas con Muc-1; las células CHO no transfectadas se usaron como control negativo.

Para la citometría de flujo, se incubaron 2,5x10⁵ células con 50 µl de preparación periplásmica de scFv o con 5 µg/ml de scFv purificado en 50 µl de PBS con 2 % de FCS. La unión de scFv se detectó con un anticuerpo anti-His (Anticuerpo frente a Penta-His, sin BSA, Qiagen GmbH, Hilden, FRG) a 2 µg/ml en 50 µl de PBS con 2 % de FCS. Como un reactivo de la segunda etapa, se usa un fragmento F(ab')₂ purificado por afinidad conjugado con R-Ficoeritrina, anti-IgG de ratón de cabra (específico del fragmento Fc-gamma), diluido 1:100 en 50 µl de PBS con 2 % de FCS (Dianova, Hamburgo, FRG). Las muestras se midieron en un FACSScan (BD biosciences, Heidelberg, FRG).

Los clones únicos se analizaron entonces para determinar propiedades favorables y secuencia de aminoácidos. Los scFv específicos de Muc-1 se convirtieron en anticuerpos de cadena única biespecíficos recombinantes uniéndolos

mediante un conector Gly₄Ser₁ con el scFv específico de CD3 I2C (SEQ ID 185) o cualquier otro scFv específico de CD3 de la invención para dar como resultado construcciones con la organización de dominios V_H_{Muc1} - (Gly₄Ser₁)₃ - V_L_{Muc1} - Gly₄Ser₁-V_H_{CD3} - (Gly₄Ser₁)₃ - V_L_{CD3} u organizaciones de dominios alternativas. Para la expresión en células CHO, las secuencias codificadoras de (i) un líder de cadena pesada de inmunoglobulina N-terminal que comprende un codón de inicio incluido en una secuencia consenso Kozak y (ii) una etiqueta His₆ C-terminal seguido por un codón de parada se unieron ambos en marco con la secuencia de nucleótidos que codifica los anticuerpos de cadena única biespecíficos antes de la inserción del fragmento de ADN resultante como se obtiene por síntesis génica en el sitio de clonación múltiple del vector de expresión pEF-DHFR (Raum et al. Cancer Immunol Immunother 50 (2001) 141-150). La transfección estable de células CHO deficientes para DHFR, la selección de transfectantes positivos para DHFR que secretan los anticuerpos de cadena única biespecíficos en el sobrenadante del cultivo y la amplificación génica con metotrexato para incrementar los niveles de expresión se llevaron a cabo como se describe (Mack et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995) 7021-7025). Todos los demás procedimientos del estado de la técnica se llevaron a cabo según protocolos estándar (Sambrook, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 3^a edición, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, Nueva York (2001)).

La identificación de construcciones de anticuerpo de cadena única biespecíficas funcionales se llevó a cabo por análisis por citometría de flujo del sobrenadante del cultivo de células CHO transfectadas. Para este propósito, la unión a CD3 se ensayó en la línea celular de leucemia de células T positiva para CD3 humano HPB-ALL (DSMZ, Braunschweig, ACC483) y en la línea de células T de macaco 4119LnPx. La unión a epítomos de Muc-1 específicos de tumor se ensayó en células CHO transfectadas con Muc-1. Se incubaron 200.000 células de la línea celular respectiva durante 30 min. en hielo con 50 µl del sobrenadante del cultivo celular. Las células se lavaron dos veces en PBS con 2 % de FCS y la construcción de anticuerpo de cadena única biespecífica unida se detectó con un anticuerpo anti-His murino (anticuerpo frente a Penta His; Qiagen; diluido 1:20 en 50 µl de PBS con 2 % de FCS). Después de lavar, los anticuerpos anti-His unidos se detectaron con un anticuerpo específico de Fc gamma (Dianova) conjugado con ficocitrina, diluido 1:100 en PBS con 2 % de FCS. El sobrenadante de las células CHO no transfectadas se usó como control negativo.

Se realizó citometría de flujo en un aparato FACS-Calibur; se usó el software CellQuest para adquirir y analizar los datos (Becton Dickinson biosciences, Heidelberg). La tinción para FACS y la medición de la intensidad de la fluorescencia se realizaron como se describe en Current Protocols in Immunology (Coligan, Kruisbeek, Margulies, Shevach y Strober, Wiley-Interscience, 2002).

Sólo se seleccionaron para uso adicional aquellas construcciones que mostraron unión biespecífica a CD3 humano y de macaco, así como a epítomos de Muc-1 específicos de tumor.

Para la producción de proteínas, las células CHO que expresaban anticuerpo de cadena única biespecífico completamente funcional y adaptadas a medio líquido de soja HyQ PF CHO sin nucleósidos (con L-Glutamina 4,0 mM con 0,1 % de Pluronic F - 68; HyClone) se crecieron en botellas de cultivo rotatorias con medio líquido de soja HyQ PF CHO sin nucleósidos (con L-Glutamina 4,0 mM con 0,1 % de Pluronic F - 68; HyClone) durante 7 días. El sobrenadante del cultivo se aclaró de células por centrifugación y se almacenó a -20 °C hasta la purificación. Como equipamiento de cromatografía para la purificación del anticuerpo de cadena única biespecífico del sobrenadante de los cultivos, se usaron el Sistema Äkta® Explorer (GE Health Systems) y Software Unicorn®. Se realizó cromatografía de afinidad con metal inmovilizado ("IMAC") usando un Fractogel EMD chelate® (Merck) que se cargó con ZnCl₂ según el protocolo proporcionado por el fabricante. La columna se equilibró con tampón A (tampón fosfato de sodio 20 mM pH 7,2, NaCl 0,1 M) y el sobrenadante del cultivo celular (500 ml) se aplicó a la columna (10 ml) a una velocidad de flujo de 3 ml/min. La columna se lavó con tampón A para eliminar la muestra no unida. La proteína unida se eluyó usando un gradiente de dos etapas de tampón B (tampón fosfato de sodio 20 mM pH 7,2, NaCl 0,1 M, imidazol 0,5 M) según lo siguiente:

Etapa 1: 20 % de tampón B en 6 volúmenes de columna

Etapa 2: 100 % de tampón B en 6 volúmenes de columna

Las fracciones de proteína eluída de la etapa 2 se combinaron para purificación adicional. Todos los productos químicos fueron de grado de investigación y se adquirieron en Sigma (Deisenhofen) o Merck (Darmstadt).

La cromatografía de filtración en gel se realizó en una columna de grado preparativo HiLoad 16/60 Superdex 200 (GE/Amersham) equilibrada con tampón Equi (Citrato 25 mM, Lisina 200 mM, 5 % de Glicerol, pH 7,2). Las muestras de proteínas eluidas (velocidad de flujo 1 ml/min) se sometieron a SDS-PAGE estándar y Transferencia Western para su detección. Antes de la purificación, la columna se calibró para la determinación del peso molecular (kit de marcadores de peso molecular, Sigma MW GF-200). Las concentraciones de proteína se determinaron usando DO280 nm.

La proteína de anticuerpo de cadena única biespecífico purificada se analizó en SDS PAGE en condiciones reductoras realizada con geles preparados comercialmente de Bis Tris al 4-12 % (Invitrogen). La preparación y aplicación de las muestras se realizaron según el protocolo proporcionado por el fabricante. El peso molecular se determinó con el

estándar de proteínas MultiMark (Invitrogen). El gel se tiñó con Coomassie coloidal (protocolo de Invitrogen). La pureza de la proteína aislada es >95 % como se determina por SDS-PAGE.

El anticuerpo de cadena única biespecífico tiene un peso molecular de aproximadamente 52 kDa en condiciones nativas como se determina con filtración en gel en PBS. Todas las construcciones se purificaron según este método.

5 Se realizó Transferencia Western usando una membrana Optitran® BA-S83 y el Módulo de Transferencia de Invitrogen según el protocolo proporcionado por el fabricante. Para la detección de la proteína del anticuerpo de cadena única biespecífico se usó un anticuerpo anti-Etiqueta His (Penta His, Qiagen). Se usó un anticuerpo anti-Ig de ratón de cabra marcado con fosfatasa alcalina (AP) (Sigma) como anticuerpo secundario y BCIP/NBT (Sigma) como sustrato. Se detectó una única banda a 52 kD correspondiente al anticuerpo de cadena única biespecífico purificado.

10 La potencia en el sistema humano y del primate distinto del chimpancé de anticuerpos de cadena única biespecíficos que interaccionan con CD3 humano y de macaco y con epítomos de Muc-1 específicos de tumor se determinó por un ensayo de citotoxicidad basado en la liberación de cromo 51 (⁵¹Cr) usando células CHO transfectadas con Muc-1 como células diana y PBMC humanas deplecionadas de CD4/CD56 estimuladas o la línea de células T de macaco 4119LnPx como células efectoras.

15 La generación de PBMC humanas estimuladas se realizó como sigue:

Se recubrió una placa Petri (145 mm de diámetro, Nunc) con un anticuerpo específico anti-CD3 disponible comercialmente (p. ej., OKT3, Othoclone) en una concentración final de 1 µg/ml durante 1 hora a 37 °C. La proteína no unida se eliminó por una etapa de lavado con PBS. Las PBMC frescas se aislaron de sangre periférica (30 - 50 ml de sangre humana) por centrifugación en gradiente de Ficoll según protocolos estándar. Se añadieron 3 - 5 x 10⁷ PBMC a la placa petri precubierta en 120 ml de RPMI 1640 con glutamina estabilizada / 10 % de FCS /20 U/ml de IL-2 (Proleukin, Chiron) y se estimularon durante 2 días. Al tercer día, las células se recogieron y se lavaron una vez con RPMI 1640. Se añadió IL-2 a una concentración final de 20 U/ml y las células se cultivaron de nuevo durante un día en el mismo medio de cultivo celular que anteriormente.

25 Las células diana se lavaron dos veces con PBS y se marcaron con 11,1 MBq de ⁵¹Cr en un volumen final de 100 µl de RPMI con 50 % de FCS durante 45 minutos a 37 °C. Posteriormente, las células diana marcadas se lavaron 3 veces con 5 ml de RPMI y se usaron entonces en el ensayo de citotoxicidad. El ensayo se realizó en una placa de 96 pocillos en un volumen total de 250 µl de RPMI suplementado (como anteriormente) con una relación E:D de 10:1. Se aplicaron 1 µg/ml de las moléculas de anticuerpo de cadena única biespecíficas específicas entre especies y 20 diluciones de tres veces de las mismas. El tiempo del ensayo fue 18 horas y la citotoxicidad se midió como valores relativos de cromo liberado en el sobrenadante relacionado con la diferencia de lisis máxima (adición de Tritón-X) y lisis espontánea (sin células efectoras). Todas las mediciones se hicieron en cuadruplicado. La medición de la actividad de cromo en los sobrenadantes se realizó con un contador gamma Wizard 3" (Perkin Elmer Life Sciences GmbH, Colonia, Alemania). El análisis de los datos experimentales se realizó con Prism 4 para Windows (versión 4.02, GraphPad Software Inc., San Diego, California, EEUU). Las curvas de respuesta a la dosis sigmoidales tienen típicamente valores de R² >0,90 como se determina por el software. Los valores de CE₅₀ como una medida de la potencia se calcularon por el programa de análisis.

36. Generación de moléculas de cadena única biespecíficas para CD33 y CD3 específicas entre especies

36.1 Generación de moléculas de cadena única biespecíficas para CD33 y CD3 específicas entre especies

40 Generalmente, se diseñaron moléculas de anticuerpo de cadena única biespecíficas, comprendiendo cada una un dominio con una especificidad de unión específica entre especies para CD3 épsilon humana y de macaco, así como un dominio con una especificidad de unión específica entre especies para CD33 humano y de macaco, como se muestra en la siguiente Tabla 14:

Tabla 14: Formatos de moléculas de anticuerpo de cadena única biespecíficas anti-CD3 y anti-CD33 específicas entre especies

SEQ ID (nucl/prot)	Formatos de construcciones de proteínas (N → C)
1341/1340	I2CHLxAF5HL
1339/1338	F12QHLxAF5HL
1337/1336	H2CHLxAF5HL

45

Las construcciones mencionadas anteriormente que contienen los dominios variable de cadena ligera (L) y variable de cadena pesada (H) específicos entre especies para CD33 humano y de macaco y las combinaciones de VH y VL específicas para CD3 específicas entre especies para CD3 humano y de macaco se obtuvieron por síntesis génica. Los fragmentos de la síntesis génica se diseñaron de manera que contuvieran en primer lugar un sitio Kozak para la expresión de la construcción en eucariotas, seguido por un péptido líder de inmunoglobulina de 19 aminoácidos, seguido en marco por la secuencia codificadora de la molécula de anticuerpo de cadena única biespecífica respectiva, seguido en marco por la secuencia codificadora de una etiqueta histidina₆ y un codón de parada. El fragmento de la síntesis génica también se diseñó para introducir sitios de restricción adecuados al comienzo y al final del fragmento. Los sitios de restricción introducidos se utilizaron en los siguientes procedimientos de clonación. El fragmento de la síntesis génica se clonó mediante estos sitios de restricción en un plásmido designado pEF-DHFR (pEF-DHFR se describe en Raum et al. *Cancer Immunol Immunother* 50 (2001) 141-150) siguiendo protocolos estándar. Los procedimientos mencionados anteriormente se llevaron a cabo según protocolos estándar (Sambrook, *Molecular Cloning; A Laboratory Manual*, 3ª edición, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, Nueva York (2001)). Un clon con una secuencia de nucleótidos con secuencia verificada se transfirió en células CHO deficientes para DHFR para la expresión de la construcción en eucariotas. La expresión de la proteína en eucariotas en células CHO deficientes para DHFR se realizó como se describe por Kaufmann R.J. (1990) *Methods Enzymol.* 185, 537-566. La amplificación génica de la construcción se indujo por concentraciones crecientes de metotrexato (MTX) hasta una concentración final de hasta MTX 20 nM. Después de dos subcultivos de cultivo estacionario, el sobrenadante del cultivo celular se recogió y se usó en los experimentos posteriores.

36.2 Análisis por citometría de flujo de la unión de los anticuerpos biespecíficos para CD33 y CD3 específicos entre especies

Con el fin de ensayar la funcionalidad de las construcciones de anticuerpo biespecíficas específicas entre especies respecto a la capacidad de unirse a CD33 y CD3 humano y de macaco, respectivamente, se realiza un análisis FACS. Para este propósito, se usaron células CHO transfectadas con CD33 humano como se describe en el Ejemplo 23.1 y la línea celular de leucemia de células T positiva para CD3 humano HPB-ALL (DSMZ, Braunschweig, ACC483) para ensayar la unión a antígenos humanos. La reactividad de la unión a antígenos de macaco se ensayó usando el transfectante de CD33 de macaco generado descrito en el Ejemplo 23.2 y PBMC de macaco (la preparación de PBMC de macaco se realizó por centrifugación en gradiente de Ficoll de sangre periférica de monos macacos según protocolos estándar). Se incubaron 200.000 células de las líneas celulares respectivas o PBMC durante 30 min. en hielo con 50 µl de sobrenadante del cultivo celular de células transfectadas que expresan las construcciones de anticuerpo biespecíficas específicas entre especies. Las células se lavaron dos veces en PBS con 2 % de FCS y la unión de la construcción se detectó con un anticuerpo anti-His murino (anticuerpo frente a Penta His; Qiagen; diluido 1:20 en 50 µl de PBS con 2 % de FCS). Después de lavar, los anticuerpos anti-His unidos se detectaron con un anticuerpo específico de Fc gamma (Dianova) conjugado con ficoeritrina, diluido 1:100 en PBS con 2 % de FCS. El sobrenadante de las células CHO no transfectadas se usó como control negativo.

Se realizó citometría de flujo en un aparato FACS-Calibur; se usó el software CellQuest para adquirir y analizar los datos (Becton Dickinson biosciences, Heidelberg). La tinción para FACS y la medición de la intensidad de la fluorescencia se realizaron como se describe en *Current Protocols in Immunology* (Coligan, Kruisbeek, Margulies, Shevach y Strober, Wiley-Interscience, 2002).

La unión biespecífica de las moléculas de cadena única listadas anteriormente, que eran específicas entre especies para CD33 y específicas entre especies para CD3 humano y de primate distinto del chimpancé fue claramente detectable como se muestra en la Figura 60. En el análisis FACS, todas las construcciones mostraron unión a CD3 y CD33 comparado con los controles negativos respectivos. Se demostró la especificidad entre especies de los anticuerpos biespecíficos para los antígenos CD3 y CD33 humano y de macaco.

36.3. Bioactividad de anticuerpos de cadena única biespecíficos para CD33 y CD3 específicos entre especies

La bioactividad de los anticuerpos de cadena única biespecíficos generados se analizó por ensayo de citotoxicidad de liberación de cromo 51 (⁵¹Cr) in vitro usando las líneas celulares positivas para CD33 descritas en los Ejemplos 23.1 y 23.2. Como células efectoras, se usaron PBMC humanas deplecionadas de CD4/CD56 estimuladas o la línea de células T de macaco 4119LnPx como se especifica en las figuras respectivas.

Se recubrió una placa Petri (145 mm de diámetro, Greiner bio-one GmbH, Kremsmünster) con un anticuerpo específico anti-CD3 disponible comercialmente (p. ej., OKT3, Orthoclone) en una concentración final de 1 µg/ml durante 1 hora a 37 °C. La proteína no unida se eliminó por una etapa de lavado con PBS. Las PBMC frescas se aislaron de sangre periférica (30 - 50 ml de sangre humana) por centrifugación en gradiente de Ficoll según protocolos estándar. Se añadieron 3 - 5 x 10⁷ PBMC a la placa Petri prereducida en 120 ml de RPMI 1640 con glutamina estabilizada / 10 % de FCS / 20 U/ml de IL-2 (Proleukin, Chiron) y se estimularon durante 2 días. Al tercer día, las células se recogieron y se lavaron una vez con RPMI 1640. Se añadió IL-2 a una concentración final de 20 U/ml y las células se cultivaron de nuevo durante un día en el mismo medio de cultivo celular que anteriormente.

Mediante la depleción de las células T CD4+ y las células NK CD56+ según protocolos estándar, se enriquecieron los linfocitos T citotóxicos (CTL) CD8+.

Las células diana se lavaron dos veces con PBS y se marcaron con 11,1 MBq de ^{51}Cr en un volumen final de 100 μl de RPMI con 50 % de FCS durante 45 minutos a 37 °C. Posteriormente, las células diana marcadas se lavaron 3 veces con 5 ml de RPMI y se usaron entonces en el ensayo de citotoxicidad. El ensayo se realizó en una placa de 96 pocillos en un volumen total de 250 μl de RPMI suplementado (como anteriormente) con una relación E:D de 10:1. Se aplicaron el sobrenadante de las células que expresan las moléculas del anticuerpo de cadena única biespecíficas específicas entre especies en una concentración final de 50 % y 20 diluciones de tres veces de las mismas. El tiempo del ensayo es 18 horas y la citotoxicidad se midió como valores relativos de cromo liberado en el sobrenadante relacionado con la diferencia de lisis máxima (adición de Tritón-X) y lisis espontánea (sin células efectoras). Todas las mediciones se hicieron en cuadruplicado. La medición de la actividad de cromo en los sobrenadantes se realizó con un contador gamma Wizard 3" (Perkin Elmer Life Sciences GmbH, Colonia, Alemania). El análisis de los datos experimentales se realizó con Prism 4 para Windows (versión 4.02, GraphPad Software Inc., San Diego, California, EEUU). Las curvas de respuesta a la dosis sigmoidales tienen típicamente valores de $R^2 > 0,90$ como se determina por el software. Los valores de CE_{50} calculados por el programa de análisis se usaron para la comparación de la bioactividad.

Como se muestra en la Figura 61, todas las construcciones de anticuerpo de cadena única biespecíficas específicas entre especies generadas demuestran actividad citotóxica frente a células diana positivas para CD33 humano incitadas por PBMC humanas deplecionadas de CD4/CD56 estimuladas y frente a células diana positivas para CD33 de macaco incitadas por la línea de células T de macaco 4119LnPx.

37. Redistribución de células T de chimpancé circulantes después de exposición a una molécula de unión a CD3 biespecífica convencional dirigida a una molécula diana que está ausente de las células sanguíneas circulantes

Se sometió un único chimpancé macho a una escalada de la dosis con la construcción de anticuerpo biespecífica EpCAM/CD3 de cadena única administrada por vía intravenosa (Schlereth (2005) Cancer Res 65: 2882). Como en la construcción de anticuerpo biespecífica CD19/CD3 de cadena única convencional (Loffler (2000, Blood, Volumen 95, Número 6) o WO 99/54440), el brazo de CD3 de dicha construcción EpCAM/CD3 también está dirigido a un epítipo dependiente de contexto convencional de CD3 humano y de chimpancé. En el día 0, el animal recibió 50ml de PBS/5 % de HSA sin material de ensayo, seguido por 50ml de PBS/5 % de HSA más construcción de anticuerpo biespecífica EpCAM/CD3 de cadena única a 1,6, 2,0, 3,0 y 4,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en los días 7, 14, 21 y 28, respectivamente. El periodo de infusión fue 2 horas por administración. Para cada infusión semanal, el chimpancé se sedó con 2-3 mg/kg de Telazol intramuscularmente, se intubó y se puso en anestesia de isoflurano/O₂ con presiones sanguíneas medias estables. Se puso un segundo catéter intravenoso en una extremidad opuesta para recoger muestras de sangre completa (heparinizada) en los puntos de tiempo indicados en la Figura 62 para el análisis por FACS de células sanguíneas circulantes. Después de una lisis estándar de eritrocitos, las células T se tiñeron con un anticuerpo marcado con FITC que reaccionaba con CD2 de chimpancé (Becton Dickinson) y el porcentaje de células T por linfocitos totales se determinó por citometría de flujo. Como se muestra en la Figura 62, cada administración de construcción de anticuerpo biespecífica EpCAM/CD3 de cadena única indujo una caída rápida de las células T circulantes como se observa con la construcción de anticuerpo biespecífica CD19/CD3 de cadena única en pacientes con B-NHL, que no tenían esencialmente células B diana circulantes (linfoma). Como no hay células diana positivas para EpCAM en la sangre circulante de los seres humanos y los chimpancés, la caída de las células T circulantes después de la exposición a la construcción de anticuerpo biespecífica EpCAM/CD3 de cadena única puede atribuirse solamente a una señal, que las células T reciben a través de la interacción pura del brazo de CD3 de la construcción con un epítipo de CD3 dependiente de contexto convencional en ausencia de ningún entrecruzamiento mediado por células diana. Como la redistribución de las células T inducida a través de su exposición a la construcción de anticuerpo biespecífica CD19/CD3 de cadena única en los pacientes con B-NHL, que no tenían esencialmente células B diana circulantes (linfoma), la redistribución de las células T en el chimpancé después de la exposición a la construcción de anticuerpo biespecífica EpCAM/CD3 de cadena única puede explicarse por un cambio conformacional de CD3 después del evento de unión a un epítipo de CD3 dependiente de contexto dando como resultado además al incremento transitorio de la adhesividad de las células T al endotelio de los vasos sanguíneos (véase el Ejemplo 20). Este descubrimiento confirma que las moléculas de unión a CD3 convencionales dirigidas a epítopos de CD3 dependientes de contexto - solamente a través de esta interacción - pueden dar lugar a un patrón de redistribución de las células T de la sangre periférica, que está asociado con el riesgo de eventos adversos en el SNC en los seres humanos como se describe en el Ejemplo 20.

38. Unión específica de clones de scFv al extremo N de CD3 epsilon humana

38.1 Expresión bacteriana de construcciones de scFv en *E. coli* XL1 Blue

Como se ha mencionado previamente, *E. coli* XL1 Blue transformadas con pComb3H5Bhis/Flag que contiene un segmento VL y VH producen scFv soluble en cantidades suficientes después de la escisión del fragmento del gen III e inducción con IPTG 1 mM. La cadena scFv se exporta al periplasma donde se pliega en una conformación funcional.

Los siguientes clones de scFv se eligieron para este experimento:

i) ScFv 4-10, 3-106, 3-114, 3-148, 4-48, 3-190 y 3-271 como se describe en WO 2004/106380.

ii) ScFv de los clones de unión a anti-CD3épsilon humana H2C, F12Q e I2C como se describe en la presente memoria.

Para las preparaciones periplásmicas, las células bacterianas transformadas con los plásmidos que contienen el scFv respectivos que permiten la expresión periplásmica se crecieron en medio SB suplementado con MgCl₂ 20 mM y 50 µg/ml de carbenicilina y se redisolviéron en PBS después de la recogida. Mediante cuatro rondas de congelación a -70°C y descongelación a 37 °C, la membrana exterior de las bacterias se destruyó por choque osmótico y las proteínas periplásmicas solubles incluyendo los scFv se liberaron en el sobrenadante. Después de la eliminación de las células intactas y los restos celulares, el sobrenadante que contenía los scFv humanos anti-CD3 humano se recogieron y se usaron para examen adicional. Estos sobrenadantes crudos que contenían scFv se denominarán además preparaciones periplásmicas (PPP).

38.2 Unión de scFv a la proteína de fusión CD3 épsilon (aa 1-27)-Fc humana

Se llevaron a cabo experimentos de ELISA mediante el recubrimiento de los pocillos de placas de plástico de 96 pocillos (Nunc, maxisorb) con la proteína de fusión CD3 épsilon (aa 1-27)-Fc humana típicamente a 4 °C toda la noche. La disolución de recubrimiento del antígeno se retiró entonces, los pocillos se lavaron una vez con PBS/0,05 % de Tween 20 y posteriormente se bloquearon con PBS/3 % de BSA durante al menos una hora. Después de la retirada de la disolución de bloqueo, se añadieron disoluciones de PPP y control a los pocillos y se incubó durante típicamente una hora a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron entonces tres veces con PBS/0,05 % de Tween 20. La detección de scFv unidos al antígeno inmovilizado se llevó a cabo usando un anticuerpo anti etiqueta FLAG marcado con Biotina (M2 anti Flag-Bio, Sigma, típicamente a una concentración final de 1 µg/ml en PBS) y se detectó con una Estreptavidina marcada con peroxidasa (Dianova, 1 µg/ml en PBS). La señal se reveló mediante la adición de disolución de sustrato ABTS y se midió a una longitud de onda de 405 nm. La unión inespecífica de las muestras de ensayo al agente de bloqueo y/o a la parte de IgG1 humana de la proteína de fusión CD3 épsilon (aa 1-27)-Fc humana se examinó llevando a cabo el ensayo idéntico con los mismos reactivos y programa de tiempo idéntico en placas ELISA que se recubrieron con IgG1 humana (Sigma). Se usó PBS como un control negativo.

Como se muestra en la Figura 63, los scFv H2C, F12Q e I2C muestran señales de unión fuertes en la proteína de fusión CD3 épsilon (aa 1-27)-Fc humana. Los scFv humanos 3-106, 3-114, 3-148, 3-190, 3-271, 4-10 y 4-48 (como se describe en WO 2004/106380) no muestran ninguna unión significativa por encima del nivel del control negativo.

Para excluir la posibilidad de que la unión positiva de los scFv H2C, F12Q e I2C a los pocillos recubiertos con la proteína de fusión CD3 épsilon (aa 1-27)-Fc humana pudiera deberse a la unión a BSA (usado como agente de bloqueo) y/o a la parte Fc gamma de IgG1 humana de la proteína de fusión CD3 épsilon (aa 1-27)-Fc humana, se realizó un segundo experimento de ELISA en paralelo. En este segundo experimento de ELISA, todos los parámetros fueron idénticos a los del primer experimento de ELISA, excepto que en el segundo experimento de ELISA se recubrió con IgG1 humana (Sigma) en lugar de con la proteína de fusión CD3 épsilon (aa 1-27)-Fc humana. Como se muestra en la Figura 64, ninguno de los scFv ensayados mostró ninguna unión significativa a BSA y/o a IgG1 humana por encima del nivel de fondo.

Tomados conjuntamente, estos resultados permiten la conclusión de que las moléculas de unión a CD3 convencionales que reconocen un epítipo de CD3 épsilon dependiente de contexto (p. ej., como se describe en WO 2004/106380) no se unen específicamente a la región CD3 épsilon humana (aa 1-27), mientras los scFv H2C, F12Q e I2C que se unen a un epítipo de CD3 épsilon independiente de contexto, muestran claramente una unión específica a los 27 aminoácidos N-terminales de CD3 épsilon humana.

39. Generación de moléculas de cadena única biespecíficas para CD44 y CD3 específicas entre especies

39.1 Clonación de moléculas de unión específicas entre especies

Generalmente, se diseñan moléculas de anticuerpo de cadena única biespecíficas, comprendiendo cada una un dominio con una especificidad de unión específica entre especies para CD3 épsilon humana y de macaco, así como un dominio con una especificidad de unión específica entre especies para CD44 humano y de macaco, como se muestra en la siguiente tabla 15.

Tabla 15: Formatos de moléculas de anticuerpo de cadena única biespecíficas anti-CD3 y anti-CD44 específicas entre especies

SEQ ID (nucl/prot)	Formatos de construcciones de proteínas (N → C)
1589/1588	CD44-A8 LH x I2C HL
1603/1602	CD44-C2 HL x I2C HL
1631/1630	CD44-H3 HL x I2C HL

SEQ ID (nucl/prot)	Formatos de construcciones de proteínas (N → C)
1617/1616	CD44-F6 HL x I2C HL

Las construcciones mencionadas anteriormente que contienen los dominios variable de cadena pesada (VH) y variable de cadena ligera (VL) específicos entre especies para CD44 humano y de macaco y los dominios VH y VL específicos entre especies para CD3 humano y de macaco se obtuvieron por síntesis génica. Los fragmentos de la síntesis génica se diseñaron de manera que contuvieran en primer lugar un sitio Kozak para la expresión de la construcción en eucariotas, seguido por un péptido líder de inmunoglobulina de 19 aminoácidos, seguido en marco por la secuencia codificadora de la molécula de anticuerpo de cadena única biespecífica respectiva, seguido en marco por la secuencia codificadora de una etiqueta histidina₆ y un codón de parada. El fragmento de la síntesis génica también se diseñó para introducir sitios de restricción N y C-terminales adecuados. El fragmento de la síntesis génica se clonó mediante estos sitios de restricción en un plásmido designado pEF-DHFR (pEF-DHFR se describe en Raum et al. Cancer Immunol Immunother 50 (2001) 141-150) según protocolos estándar (Sambrook, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 3ª edición, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, Nueva York (2001)). Un clon con una secuencia de nucleótidos con secuencia verificada se transfirió en células de ovario de hámster chino (CHO) deficientes para dihidrofolato reductasa (DHFR) para la expresión de la construcción en eucariotas.

39.2 Expresión de las moléculas de anticuerpo de cadena única biespecíficas

Las construcciones biespecíficas se expresaron de forma transitoria en células CHO deficientes para DHFR. Brevemente, se cultivaron 4×10^5 células por construcción en 3 ml de medio completo RPMI 1640 con glutamina estabilizada suplementado con 10 % de suero fetal de ternera, 1 % de penicilina/estreptomina y nucleósidos de una disolución madre de reactivos de grado de cultivo celular (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Alemania) a una concentración final de 10 µg/ml de Adenosina, 10 µg/ml de Desoxiadenosina y 10 µg/ml de Timidina, en un incubador a 37 °C, 95 % de humedad y 7 % de CO₂ un día antes de la transfección. La transfección se realizó con el Reactivo de Transfección Eugene HD (Roche, # 04709691001) según el protocolo del fabricante. Se mezclaron 94 µl de medio OptiMEM (Invitrogen) y 6 µl de Eugene HD y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadieron 1,5 µg de ADN por construcción, se mezcló y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Mientras tanto, las células CHO deficientes para DHFR se lavaron con 1x PBS y se resuspendieron en 1,5 ml de medio completo RPMI 1640. La mezcla de transfección se diluyó con 600 µl de medio completo RPMI 1640, se añadió a las células y se incubó toda la noche a 37 °C, 95 % de humedad y 7 % de CO₂. Al día siguiente de la transfección, el volumen de incubación de cada estrategia se amplió a 5 ml de medio completo RPMI 1640. El sobrenadante se recogió después de 3 días de incubación.

39.3 Análisis por citometría de flujo de la unión de los anticuerpos biespecíficos para CD44 y CD3 específicos entre especies

Con el fin de ensayar la funcionalidad de las construcciones de anticuerpo biespecíficas específicas entre especies respecto a la capacidad de unirse a CD44 y CD3 humano y de macaco, respectivamente, se realizó un análisis FACS. Para este propósito, las células CHO transfectadas con CD44 humano (como se describe en el Ejemplo 28.1) y la línea celular de leucemia de células T positiva para CD3 humano HPB-ALL (DSMZ, Braunschweig, ACC483) se usaron para ensayar la unión a antígenos humanos. La reactividad de la unión a antígenos de macaco se ensayó usando el transfectante de CD44 de macaco generado (descrito en el Ejemplo 28.3) y una línea de células T de macaco 4119LnPx (proporcionada amablemente por el Prof. Fickenscher, Hygiene Institute, Virology, Erlangen-Nuernberg; publicado en Knappe A, et al., y Fickenscher H., Blood 2000, 95, 3256-61). Para demostrar la especificidad de las construcciones de anticuerpo biespecíficas específicas entre especies para CD44, la unión a CD44delv6 humano (CD44 al que se delecionó el exón v6) se ensayó usando células CHO transfectadas con CD44delv6 humano (generación descrita en el Ejemplo 28.2). Se incubaron 200.000 células de las líneas celulares respectivas durante 30 min en hielo con 50 µl de los sobrenadantes celulares de células transfectadas que expresan las construcciones de anticuerpo biespecíficas específicas entre especies. Las células se lavaron dos veces en PBS con 2 % de FCS y la unión de la construcción se detectó con un anticuerpo anti-His murino (anticuerpo frente a Penta His; Qiagen; diluido 1:20 en 50 µl de PBS con 2 % de FCS). Después de lavar, los anticuerpos anti-His unidos se detectaron con un anticuerpo específico de Fc gamma (Dianova) conjugado con ficoeritrina, diluido 1:100 en PBS con 2 % de FCS. El sobrenadante de las células CHO no transfectadas se usó como control negativo para la unión a las líneas de células T. Una construcción de cadena única con especificidad de diana irrelevante se usó como control negativo para la unión a las células CHO transfectadas con CD44 y CD44delv6.

Se realizó citometría de flujo en un aparato FACS-Calibur; se usó el software CellQuest para adquirir y analizar los datos (Becton Dickinson biosciences, Heidelberg). La tinción para FACS y la medición de la intensidad de la fluorescencia se realizaron como se describe en Current Protocols in Immunology (Coligan, Kruisbeek, Margulies, Shevach y Strober, Wiley-Interscience, 2002).

La unión biespecífica de las moléculas de cadena única listadas anteriormente, que son específicas entre especies para CD44 y específicas entre especies para CD3 humano y de macaco, fue claramente detectable como se muestra en la Figura 65 a-d. No se observó unión de las moléculas a CD44delv6 en la Figura 65 e. Se demostró claramente, por lo tanto, la especificidad entre especies de los anticuerpos biespecíficos para los antígenos de CD3 y CD44 humano y de macaco.

39.4 Bioactividad de anticuerpos de cadena única biespecíficos para CD44 y CD3 específicos entre especies

La bioactividad de los anticuerpos de cadena única biespecíficos generados se analizó por ensayos de citotoxicidad de liberación de cromo 51 (^{51}Cr) in vitro usando la línea celular positiva para CD44 humano descrita en 28.1. Como células efectoras, se usaron PBMC humanas deplecionadas de CD4/CD56 estimuladas, PBMC humanas estimuladas como se especifica en la figura respectiva.

La generación de las PBMC deplecionadas de CD4/CD56 estimuladas se realizó como sigue:

El recubrimiento de una placa Petri (145 mm de diámetro, Greiner bio-one GmbH, Kremsmünster) se llevó a cabo con un anticuerpo específico anti-CD3 disponible comercialmente (p. ej., OKT3, Othoclone) en una concentración final de 1 $\mu\text{g/ml}$ durante 1 hora a 37 °C. La proteína no unida se eliminó por una etapa de lavado con PBS. Las PBMC frescas se aislaron de sangre periférica (30 - 50 ml de sangre humana) por centrifugación en gradiente de Ficoll según protocolos estándar. Se añadieron 3 - 5 x 10⁷ PBMC a la placa petri precubierta en 120 ml de RPMI 1640 con glutamina estabilizada /10 % de FCS / 20 U/ml de IL-2 (Proleukin, Chiron) y se estimularon durante 2 días. Al tercer día, las células se recogieron y se lavaron una vez con RPMI 1640. Se añadió IL-2 a una concentración final de 20 U/ml y las células se cultivaron de nuevo durante un día en el mismo medio de cultivo celular que anteriormente. Mediante la depleción de las células T CD4+ y las células NK CD56+ según protocolos estándar, se enriquecieron los linfocitos T citotóxicos (CTL) CD8+.

Las células diana se lavaron dos veces con PBS y se marcaron con 11,1 MBq de ^{51}Cr en un volumen final de 100 μl de RPMI con 50 % de FCS durante 45 minutos a 37 °C. Posteriormente, las células diana marcadas se lavaron 3 veces con 5 ml de RPMI y se usaron entonces en el ensayo de citotoxicidad. El ensayo se realizó en una placa de 96 pocillos en un volumen total de 250 μl de RPMI suplementado (como anteriormente) con una relación E:D 10:1. Se aplicaron el sobrenadante de las células que contenía las moléculas de anticuerpo de cadena única biespecíficas específicas entre especies y 20 diluciones de dos veces de las mismas para el ensayo de citotoxicidad humano. El tiempo del ensayo fue 18 horas y la citotoxicidad se midió como valores relativos de cromo liberado en el sobrenadante relacionado con la diferencia de lisis máxima (adición de Tritón-X) y lisis espontánea (sin células efectoras). Todas las mediciones se hicieron en cuadruplicado. La medición de la actividad de cromo en los sobrenadantes se realizó con un contador gamma Wizard 3" (Perkin Elmer Life Sciences GmbH, Colonia, Alemania). El análisis de los datos experimentales se realizó con Prism 4 para Windows (versión 4.02, GraphPad Software Inc., San Diego, California, EEUU). Las curvas de respuesta a la dosis sigmoidales tienen típicamente valores de R² >0,90 como se determina por el software. Los valores de CE₅₀ calculados por el programa de análisis se usaron para la comparación de la bioactividad.

Como se muestra en la Figura 66, todas las construcciones de anticuerpo de cadena única biespecíficas específicas entre especies generadas demostraron actividad citotóxica frente a células diana positivas para CD44 incitadas por PBMC humanas deplecionadas de CD4/CD56 estimuladas.

40. Generación de un fragmento de anticuerpo de cadena única en tándem biespecífico para el antígeno de VHC y CD3 específico entre especies

40. 1. Generación de células CHO que expresan la glicoproteína de cubierta de VHC E2 (Genotipos 1a y 1b de VHC)

Las secuencias codificadoras de la glicoproteína de cubierta E2 del virus de la hepatitis C (VHC) (Genotipo 1a y 1b de VHC, aislados de VHC de los respectivos subtipos; secuencias determinadas según protocolos estándar) cada una como proteínas de fusión de traducción con el dominio transmembrana e intracelular de CD4 humano se obtuvieron por síntesis génica según protocolos estándar. Los fragmentos de la síntesis génica se diseñaron de manera que contuvieran en primer lugar un sitio Kozak para la expresión de la construcción en eucariotas, seguido por la secuencia codificadora de un péptido señal de 14 aminoácidos, seguido por la secuencia codificadora de los primeros 278 (genotipo 1a) o 279 (genotipo 1b) aminoácidos de la glicoproteína de cubierta E2 de VHC, una secuencia de epítipo myc duplicado y la secuencia codificadora del dominio transmembrana e intracelular de CD4 humano correspondiente a los aminoácidos 372 a 433 de la proteína madura (como se publica en GenBank número de acceso M12807) y un codón de parada (las secuencias de ADNc y de aminoácidos de las construcciones se listaron como SEQ ID NOS VHC-1 a VHC-4, genotipos 1a y 1b, respectivamente). Los fragmentos de la síntesis génica también se diseñaron para introducir sitios de restricción al comienzo y al final del fragmento. Los sitios de restricción introducidos, EcoRI en el extremo 5' y Sall en el extremo 3', se utilizaron en los siguientes procedimientos de clonación. Los fragmentos de la síntesis génica se clonaron mediante EcoRI y Sall en un plásmido designado pEF-DHFR (pEF-DHFR se describe en Raum et al. Cancer Immunol Immunother 50 (2001) 141-150) siguiendo protocolos estándar. Los procedimientos mencionados anteriormente se llevaron a cabo según protocolos estándar (Sambrook, Molecular Cloning; A

Laboratory Manual, 3ª edición, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, Nueva York (2001)). Un clon con una secuencia de nucleótidos con secuencia verificada se transfectó en células CHO deficientes para DHFR para la expresión de la construcción en eucariotas. La expresión de la proteína en eucariotas en células CHO deficientes para DHFR se realizó como se describe por Kaufmann R.J. (1990) *Methods Enzymol.* 185, 537-566. La amplificación génica de la construcción se indujo por concentraciones crecientes de metotrexato (MTX) hasta una concentración final de hasta MTX 20 nM. Finalmente, se generaron dos líneas celulares: una línea celular CHO con el dominio de E2 de VHC genotipo 1a expresado en la superficie y otra línea celular CHO con el dominio de E2 de VHC genotipo 1b expresado en la superficie.

40.2 Clonación de un fragmento de anticuerpo de cadena única en tándem biespecífico entre especies

10 Generalmente, se diseñó un fragmento de anticuerpo de cadena única en tándem biespecífico, que comprende un dominio con una especificidad de unión específica entre especies para CD3épsilon humana y de macaco, así como un dominio con una especificidad de unión para VHC, como se muestra en la siguiente Tabla 16:

Tabla 16: Formato de un fragmento de anticuerpo de cadena única en tándem biespecífico anti-CD3 específico entre especies y específico de antígeno anti-VHC

SEQ ID (nucl/prot)	Formato de la construcción de proteína (N → C)
1664/1663	HC1LHxI2CHL

15 La construcción mencionada anteriormente que contiene los dominios variable de cadena ligera (L) y variable de cadena pesada (H) específicos para antígenos de VHC y combinaciones de VH y VL específicas entre especies para CD3 humano y de macaco se obtuvieron por síntesis génica. El fragmento de la síntesis génica se diseñó de manera que contuviera en primer lugar un sitio Kozak para la expresión de la construcción en eucariotas, seguido por un péptido líder de inmunoglobulina de 19 aminoácidos, seguido en marco por la secuencia codificadora del fragmento de anticuerpo de cadena única en tándem biespecífico, seguido en marco por la secuencia codificadora de una etiqueta histidina₆ y un codón de parada. El fragmento de la síntesis génica también se diseñó para introducir sitios de restricción adecuados al comienzo y al final del fragmento. Los sitios de restricción introducidos se utilizaron en los siguientes procedimientos de clonación. El fragmento de la síntesis génica se clonó mediante estos sitios de restricción en un plásmido designado pEF-DHFR (pEF-DHFR se describe en Raum et al. *Cancer Immunol Immunother* 50 (2001) 141-150) siguiendo protocolos estándar. Los procedimientos mencionados anteriormente se llevaron a cabo según protocolos estándar (Sambrook, *Molecular Cloning*; A Laboratory Manual, 3ª edición, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, Nueva York (2001)). Un clon con una secuencia de nucleótidos con secuencia verificada se transfectó en células CHO deficientes para DHFR para la expresión en eucariotas del fragmento de anticuerpo de cadena única en tándem biespecífico. La expresión de la proteína en eucariotas en células CHO deficientes para DHFR se realizó como se describe por Kaufmann R.J. (1990) *Methods Enzymol.* 185, 537-566. La amplificación génica de la construcción se indujo por concentraciones crecientes de metotrexato (MTX) hasta una concentración final de hasta MTX 20 nM.

40.3 Expresión y purificación del fragmento de anticuerpo de cadena única en tándem biespecífico

35 El fragmento de anticuerpo de cadena única en tándem biespecífico se expresó en células de ovario de hámster chino (CHO). La expresión de la proteína en eucariotas en células CHO deficientes para DHFR se realizó como se describe por Kaufmann R.J. (1990) *Methods Enzymol.* 185, 537-566. La amplificación génica de las construcciones se indujo por la adición de concentraciones crecientes de MTX hasta concentraciones finales de MTX 20 nM. Después de dos subcultivos de cultivo estacionario, las células se crecieron en botellas de cultivo rotatorias con medio líquido de soja HyQ PF CHO sin nucleósidos (con L-Glutamina 4,0 mM con 0,1 % de Pluronic F - 68; HyClone) durante 7 días antes de la recogida. Las células se retiraron por centrifugación y el sobrenadante que contenía la proteína expresada se almacenó a -20 °C. Alternativamente, las construcciones se expresaron de forma transitoria en células HEK 293. La transfección se realiza con el reactivo 293fectin (Invitrogen, #12347-019) según el protocolo del fabricante.

45 Se usaron el Sistema Äkta® Explorer (GE Health Systems) y Software Unicorn® para cromatografía. Se realizó cromatografía de afinidad con metal inmovilizado ("IMAC") usando un Fractogel EMD chelate® (Merck) que se cargó con ZnCl₂ según el protocolo proporcionado por el fabricante. La columna se equilibró con tampón A (tampón fosfato de sodio 20 mM pH 7,2, NaCl 0,1 M) y el sobrenadante del cultivo celular (500 ml) se aplicó a la columna (10 ml) a una velocidad de flujo de 3 ml/min. La columna se lavó con tampón A para eliminar la muestra no unida. La proteína unida se eluyó usando un gradiente de dos etapas de tampón B (tampón fosfato de sodio 20 mM pH 7,2, NaCl 0,1 M, imidazol 0,5 M) según lo siguiente:

Etapas 1: 20 % de tampón B en 6 volúmenes de columna

Etapas 2: 100 % de tampón B en 6 volúmenes de columna

Las fracciones de proteína eluída de la etapa 2 se combinaron para purificación adicional. Todos los productos químicos fueron de grado de investigación y se adquirieron en Sigma (Deisenhofen) o Merck (Darmstadt).

La cromatografía de filtración en gel se realizó en una columna de grado preparativo HiLoad 16/60 Superdex 200 (GE/Amersham) equilibrada con tampón Equi (Citrato 25 mM, Lisina 200 mM, 5 % de Glicerol, pH 7,2). Las muestras de proteínas eluidas (velocidad de flujo 1 ml/min) se sometieron a SDS-PAGE estándar y Transferencia Western para su detección. Antes de la purificación, la columna se calibró para la determinación del peso molecular (kit de marcadores de peso molecular, Sigma MW GF-200). Las concentraciones de proteína se determinaron usando DO280 nm.

El fragmento de anticuerpo de cadena única en tándem biespecífico purificado se analizó en SDS PAGE en condiciones reductoras realizada con geles preparados comercialmente de Bis Tris al 4-12 % (Invitrogen). La preparación y aplicación de las muestras se realizaron según el protocolo proporcionado por el fabricante. El peso molecular se determinó con el estándar de proteínas MultiMark (Invitrogen). El gel se tiñó con Coomassie coloidal (protocolo de Invitrogen). La pureza de la proteína aislada fue >95 % como se determina por SDS-PAGE.

El fragmento de anticuerpo de cadena única en tándem biespecífico tiene un peso molecular de aproximadamente 52 kDa en condiciones nativas como se determina por filtración en gel en PBS. Se realizó Transferencia Western usando una membrana Optitrans® BA-S83 y el Módulo de Transferencia de Invitrogen según el protocolo proporcionado por el fabricante. Los anticuerpos usados están dirigidos frente a la Etiqueta His (Penta His, Qiagen) y anti-Ig de ratón de cabra marcado con fosfatasa alcalina (AP) (Sigma), y BCIP/NBT (Sigma) como sustrato. Se detectó una única banda a 52 kD correspondiente al fragmento de anticuerpo de cadena única en tándem biespecífico purificado.

40.4 Análisis por citometría de flujo de la unión del fragmento de anticuerpo de cadena única en tándem biespecífico para el antígeno de VHC y CD3 específico entre especies

Con el fin de ensayar la funcionalidad del fragmento de anticuerpo de cadena única en tándem biespecífico específico entre especies respecto a la capacidad de unirse al antígeno de VHC y a CD3 humano y de macaco, respectivamente, se realizó un análisis FACS. Para este propósito, las células CHO transfectadas con antígeno E2 de VHC de dos genotipos de VHC diferentes (1a y 1b) como se describe en el Ejemplo 40.1, la línea celular de leucemia de células T positiva para CD3 humano HPB-ALL (DSMZ, Braunschweig, ACC483) y la línea de células T de macaco 4119LnPx se usaron para ensayar la unión a los antígenos respectivos. Se incubaron 200.000 células de las líneas celulares respectivas durante 30 min. en hielo con 50 µl de sobrenadante del cultivo celular de células transfectadas que expresan la construcción de anticuerpo biespecífico específico entre especies. Las células se lavaron dos veces en PBS con 2 % de FCS y la unión del fragmento de anticuerpo de cadena única en tándem biespecífico se detectó con un anticuerpo anti-His murino (anticuerpo frente a Penta His; Qiagen; diluido 1:20 en 50 µl de PBS con 2 % de FCS). Después de lavar, los anticuerpos anti-His unidos se detectaron con un anticuerpo específico de Fc gamma (Dianova) conjugado con ficoeritrina, diluido 1:100 en PBS con 2 % de FCS. PBS con 2 % de FCS.

Se realizó citometría de flujo en un aparato FACS-Calibur; se usó el software CellQuest para adquirir y analizar los datos (Becton Dickinson biosciences, Heidelberg). La tinción para FACS y la medición de la intensidad de la fluorescencia se realizaron como se describe en Current Protocols in Immunology (Coligan, Kruisbeek, Margulies, Shevach y Strober, Wiley-Interscience, 2002).

La unión biespecífica del fragmento de anticuerpo de cadena única en tándem biespecífico al antígeno de VHC y a CD3 humano y de primate distinto del chimpancé fue claramente detectable como se muestra en la Figura 67. En el análisis FACS, el fragmento de anticuerpo de cadena única en tándem biespecífico mostró unión a los antígenos de CD3 y VHC comparado con los controles negativos respectivos. Se demostró la especificidad entre especies del fragmento de anticuerpo de cadena única en tándem biespecífico para CD3 humano y de macaco, por una parte, y la especificidad para VHC, por otra parte.

40.5 Bioactividad del fragmento de anticuerpo de cadena única en tándem biespecífico para el antígeno de VHC y CD3 específico entre especies

La bioactividad del fragmento de anticuerpo de cadena única en tándem biespecífico se analizó por ensayos de citotoxicidad de liberación de cromo 51 (⁵¹Cr) in vitro usando la línea celular positiva para el antígeno de VHC descrita en el Ejemplo 40.1. Como células efectoras se usaron PBMC humanas deplecionadas de CD4/CD56 estimuladas de dos donantes diferentes.

Se recubrió una placa Petri (145 mm de diámetro, Greiner bio-one GmbH, Kremsmünster) con un anticuerpo específico anti-CD3 disponible comercialmente (p. ej., OKT3, Orthoclone) en una concentración final de 1 µg/ml durante 1 hora a 37 °C. La proteína no unida se eliminó por una etapa de lavado con PBS. Las PBMC frescas se aislaron de sangre periférica (30 - 50 ml de sangre humana) por centrifugación en gradiente de Ficoll según protocolos estándar. Se añadieron 3 - 5 x 10⁷ PBMC a la placa Petri precubierta en 120 ml de RPMI 1640 con glutamina estabilizada / 10 % de FCS / 20 U/ml de IL-2 (Proleukin, Chiron) y se estimularon durante 2 días. Al tercer día, las células se recogieron y se lavaron una vez con RPMI 1640. Se añadió IL-2 a una concentración final de 20 U/ml y las células se cultivaron de nuevo durante un día en el mismo medio de cultivo celular que anteriormente.

Mediante la depleción de las células T CD4+ y las células NK CD56+ según protocolos estándar, se enriquecieron los linfocitos T citotóxicos (CTL) CD8+.

5 Las células diana se lavaron dos veces con PBS y se marcaron con 11,1 MBq de ⁵¹Cr en un volumen final de 100 µl de RPMI con 50 % de FCS durante 45 minutos a 37 °C. Posteriormente, las células diana marcadas se lavaron 3 veces con 5 ml de RPMI y se usaron entonces en el ensayo de citotoxicidad. El ensayo se realizó en una placa de 96 pocillos en un volumen total de 250 µl de RPMI suplementado (como anteriormente) con una relación E:D de 10:1. Se aplicaron 76,4 µg/ml del fragmento de anticuerpo de cadena única en tándem biespecífico específico entre especies y 20 diluciones de dos veces del mismo. El tiempo del ensayo fue 18 horas y la citotoxicidad se midió como valores relativos de cromo liberado en el sobrenadante relacionado con la diferencia de lisis máxima (adición de Tritón-X) y lisis espontánea (sin células efectoras). Todas las mediciones se hicieron en cuadruplicado. La medición de la actividad de cromo en los sobrenadantes se realizó con un contador gamma Wizard 3" (Perkin Elmer Life Sciences GmbH, Colonia, Alemania). El análisis de los datos experimentales se realizó con Prism 4 para Windows (versión 4.02, GraphPad Software Inc., San Diego, California, EEUU).

15 Como se muestra en la Figura 68, el fragmento de anticuerpo de cadena única en tándem biespecífico específico entre especies demostró actividad citotóxica frente a células diana positivas para el antígeno de VHC humano.

41. Fragmentos de anticuerpo de cadena única en tándem biespecíficos dirigidos a CD3 humano y de primate distinto del chimpancé y a antígenos del virus de la hepatitis presentados en la superficie de células infectadas

41.1 Virus de la hepatitis B (VHB)

20 Se usaron los siguientes oligonucleótidos degenerados, que se superponen mutuamente en una cadena terminal de aproximadamente 15-20 nucleótidos, y en donde cada segundo cebador es un cebador antisentido, para proporcionar un contexto de secuencia de VH humana para CDRH1 (SEQ ID 1634), CDRH2 (SEQ ID 1635) y CDRH3 (SEQ ID 1636):

5'C8-VH-A-Xhol

CCACTTCTCGAGTCTGGCGSCGRASTGMWGMAGCCTGGCGSCTCCSTGMRGS
TGTCCTGCRMGGCCTCCGGC

25 3'C8-VH-B

CCCTGGAGCCTGCCGCACCCAGGACATGGCGTAGCCGGWGAAGGTGWAGCC
GGAGGCCYGCAGGA

5'C8-VH-C

CGGCAGGCTCCAGGGMAGGACTGGAATGGRTGRGCTCCATCTCCGGCTCCG
GCGGCTCCACCTACTACGCCGACTCCGTGAAGGGCCGG

3'C8-VH-D

CTTGGCGCAGTAGTACASGGCGGTGTCCTCGGMCCGCAGGGAGYTCAKCTSCA
KGTACASGGTGYTCKTGGAGKTGTCCCGGSTATTGTGAMCCGGCCCTTCACG

30 GA

3'C8-VH-E-BstEII

GACCGTGGTGACCAGGGTGCCCTGGCCCCAGTTGCCAGAGGGAAGTAGTAG
ATGGAGGAGCCGTAGTATTCTGCCGGCCAGGAGGCTTGGCGCAGTAGTA

35 Estos conjuntos de cebadores abarcan la secuencia completa de VH. En este conjunto, los cebadores se mezclaron en cantidades iguales (p. ej., 1 µl de cada cebador (preparaciones madre de cebadores 20 a 100 µM) a una reacción de PCR de 20 µl) y se añadieron a una mezcla de PCR que consistía en tampón de PCR, nucleótidos y Taq polimerasa. Esta mezcla se incubó a 94 °C durante 3 minutos, 65 °C durante 1 minuto, 62 °C durante 1 minuto, 59 °C durante 1 minuto, 56 °C durante 1 minuto, 52 °C durante 1 minuto, 50 °C durante 1 minuto y a 72°C durante 10 minutos en un ciclador de PCR. Posteriormente, el producto se corrió en una electroforesis en gel de agarosa y el producto con un tamaño de 200 a 400 se aisló del gel según métodos estándar.

40 El producto VH de PCR resultante se usó entonces como un molde para una reacción estándar de PCR usando cebadores que incorporan sitios de restricción para clonación N-terminales y C-terminales adecuados (cebador 5'C8-

VH-A-XhoI y cebador 3'C8-VH-E-BstEII). El fragmento de ADN con el tamaño correcto (para una VH aproximadamente 350 nucleótidos) se aisló por electroforesis en gel de agarosa según métodos estándar. De esta manera, se amplificó suficiente fragmento de ADN de VH.

- 5 Se usaron los siguientes oligonucleótidos degenerados, que se superponen mutuamente en una cadena terminal de aproximadamente 15-20 nucleótidos, y en donde cada segundo cebador es un cebador antisentido, para proporcionar un contexto de secuencia de VL humana para CDRL1 (SEQ ID 1639), CDRL2 (SEQ ID 1640) y CDRL3 (SEQ ID 1641), que estaban asociados a CDRH1 (SEQ ID 1634), CDRH2 (SEQ ID 1635) y CDRH3 (SEQ ID 1636):

5'C8-VI-A-SacI

**CCTCAAGAGCTCGCCCTGAYGCAGCCTSCCTCCGTGTCGGTGKCCCYTGGCMA
GACCGCCMGCATCACCTGCGGCGGCAAC**

- 10 3'C8-VI-B

**CAGCACAGGGGMCTGTCCTGGCTTCTGCTGATACCAGTGCACGGACTTGGAGC
CGATGTTGTTGCCGCCGCAGGTGAT**

5'C8-VI-C

**CAGAAGCCAGGACAGKCCCCTGTGCTGGTCRTATACGACGACTCCGACCGCCC
TTCCGGCATCCCTGAGCGGTTCTCCGGCTCC**

3'C8-VI-D

- 15 **GACCTGGCAGTAGTAGTCGGCCTCGTCCMYGGCCTSCRCCCSGGAGATGGTCA
GGGTGRCGGTGKTGCCGGAGYTGAGCCGGAGAACCG**

3'C8-VI-E-BsiWI/Spel

**CCCGATACTAGTCGTACGCAGCACGGTCAGCTTTGTTCCGCCGCCAAACACCA
CCAGGTCGGAGGAGGAGTCCCAGACCTGGCAGTAGTAGTCGGC**

- 20 Este conjunto de cebadores abarca la secuencia completa de VL correspondiente. En este conjunto, los cebadores se mezclaron en cantidades iguales (p. ej., 1 µl de cada cebador (preparaciones madre de cebadores 20 a 100 µM) a una reacción de PCR de 20 µl) y se añadieron a una mezcla de PCR que consistía en tampón de PCR, nucleótidos y Taq polimerasa. Esta mezcla se incubó a 94 °C durante 3 minutos, 65 °C durante 1 minuto, 62 °C durante 1 minuto, 59 °C durante 1 minuto, 56 °C durante 1 minuto, 52 °C durante 1 minuto, 50 °C durante 1 minuto y a 72°C durante 10 minutos en un ciclador de PCR. Posteriormente, el producto se corrió en una electroforesis en gel de agarosa y el producto con un tamaño de 200 a 400 se aisló del gel según métodos estándar.

- 25 El producto VL de PCR resultante se usó entonces como un molde para una reacción estándar de PCR usando cebadores que incorporan sitios de restricción para clonación N-terminales y C-terminales adecuados (cebador 5'C8-VI-A-SacI y cebador 3'C8-VI-E-BsiWI/Spel). El fragmento de ADN con el tamaño correcto (para una VL aproximadamente 330 nucleótidos) se aisló por electroforesis en gel de agarosa según métodos estándar. De esta manera, se amplificó suficiente fragmento de ADN de VL.

- 30 El producto VH de PCR final (es decir, el repertorio de VH humano/humanizado) se combinó entonces con su producto VL de PCR final respectivo (es decir, el repertorio de VL humano/humanizado) en el vector de exposición en fago pComb3H5Bhis para formar una biblioteca de fragmentos de anticuerpo scFv funcionales de los que - después de exposición en fago filamentoso - se seleccionaron agentes de unión anti-HBS, se cribaron, se identificaron y se confirmaron como se describe a continuación:

- 35 Se ligaron 450 ng de los fragmentos de la cadena ligera (digeridos con SacI-Spel) con 1.400 ng del fagémido pComb3H5Bhis (digerido con SacI-Spel; fragmento grande). La biblioteca de anticuerpos combinatoria resultante se transformó entonces en 300 ul de células de Escherichia coli XL1 Blue electrocompetentes por electroporación (2,5 kV, cubeta con 0,2 cm de separación, 25 uFD, 200 Ohm, pulsador génico Biorad) dando como resultado una biblioteca con un tamaño de más de 10⁷ clones independientes. Después de una hora de expresión fenotípica, los transformantes positivos se seleccionaron por resistencia a carbenicilina codificada por el vector pComb3H5Bhis en 100 ml de cultivo en súper caldo (SB) líquido toda la noche. Las células se recogieron entonces por centrifugación y se llevó a cabo la preparación de plásmidos usando un kit de preparación de plásmidos disponible comercialmente (Qiagen).
- 40

5 Se ligaron 2.800 ng de este ADN plasmídico que contenía la biblioteca de VL (digerido con XhoI-BstEII; fragmento grande) con 900 ng de los fragmentos V de cadena pesada (digerido con XhoI-BstEII) y se transformó de nuevo en dos partes alícuotas de 300 ul de células de E. coli XL1 Blue electrocompetentes por electroporación (2,5 kV, cubeta con 0,2 cm de separación, 25 uFD, 200 Ohm) dando como resultado una biblioteca con un tamaño total de fragmentos de anticuerpo scFv de VH-VL de más de 10^7 clones independientes.

10 Después de la expresión fenotípica y la adaptación lenta a carbenicilina, las células de E. coli que contenían la biblioteca de anticuerpo se transfirieron a medio de selección SB-Carbenicilina (50 µg/mL). Las células de E. coli que contenían la biblioteca de anticuerpo se infectaron entonces con una dosis infecciosa de 10^{12} partículas de fago auxiliar VCSM13 dando como resultado la producción y secreción de fago filamentoso M13, en donde la partícula de fago contiene ADN de pComb3H5BHis monocatenario que codifica un fragmento de anticuerpo scFv y presentaba el fragmento de anticuerpo scFv correspondiente como una fusión de traducción con la proteína de cubierta del fago III. Este conjunto de fagos que presentan la biblioteca de anticuerpo se usó para la selección de entidades de unión a antígeno.

15 Asimismo, el procedimiento anterior se aplicó para otro agente de unión diana. Para este propósito, se usaron los siguientes oligonucleótidos degenerados, que se superponen mutuamente en una cadena terminal de aproximadamente 15-20 nucleótidos, y en donde cada segundo cebador es un cebador antisentido, para proporcionar un contexto de secuencia de VH humana para CDRH1 (SEQ ID 1669), CDRH2 (SEQ ID 1670) y CDRH3 (SEQ ID 1671):

5'C9-VH-A-XhoI

CCACTTCTCGAGTCTGGGGSAGRGGTGRWGMAGCCTGGGRSGTCCSTGARAS

20 **TTCCTGTGCAGCCTCTGGA**

3'C9-VH-B

CCACTCCAGCCCCTKGCCTGGAGCCTGGCGGACCCAGTGTATGCCATAATTAC

TGAAGGTGWATCCAGAGGCTGCACAGGA

5'C9-VH-C

GCTCCAGGCMAGGGGCTGGAGTGGRTGGSACTTATATCATATGATGGAAATAA

GAAATTCTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGA

25 3'C9-VH-D

GTAATATACAGCCGTGTCCTCAGRTCTCAGGCTGCTCAKTTSCAKATMCACCGT

GYTCKTAGAAGTGTCTCTGGTSATGGYGAMTCGGCCCTTCACGGAGTC

3'C9-VH-E-BstEII

GACCGTGGTGACCAGGGTTCCTGGCCCCAGTAGTCAAATTCACCCAGTACA

AGGCAATACCCAGATTTTCGCACAGTAATATACAGCCGTGTC

30 Como cebadores para la reacción de PCR estándar final para incorporar sitios de restricción para la clonación N-terminales y C-terminales adecuados en VH se usaron los oligonucleótidos 5'C9-VH-A-XhoI y 3'C9-VH-E-BstEII.

35 De forma análoga a VH, se usaron los siguientes oligonucleótidos degenerados, que se superponen mutuamente en una cadena terminal de aproximadamente 15-20 nucleótidos, y en donde cada segundo cebador es un cebador antisentido, para proporcionar un contexto de secuencia de VL humana para CDRL1 (SEQ ID 1672), CDRL2 (SEQ ID 1673) y CDRL3 (SEQ ID 1674), que estaban asociados con CDRH1 (SEQ ID 1669), CDRH2 (SEQ ID 1670) y CDRH3 (SEQ ID 1671):

5'C9-VI-A-Sacl

CCTCAAGAGCTCGWACTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGYGGCCCCAGGACA

GAMGGYCAYGATTTCTGTGGGGGAAAC

3'C9-VI-B

GCCTGGCWKCTGCTGATACCAGTGCACGGTTGTA CTCCAATGTTGTTTCCCC
ACAGGAAAT

5'C9-VI-C

TGGTATCAGCAGMWGCCAGGCMGGCCCCTRWGCTGSTCRTCATGATGATA
ACGAGCGACCCTCAGGGATCCCTGASCGATTCTCTGGCTCC

3'C9-VI-D

CACTTGACAATAATAGTCGGCCTCATCCCCGGYTTSGASCCYGKTGATGSYAG
5 GGTGGCCGAGGTCCCAGASTTGGAGCCAGAGAATCG

3'C9-VI-E-BsiWI/Spel

CCCGATACTAGTCGTACGTAGGACGGTCAGCTTCGTCCCTCCGCCGAATACCA
CATGATCACTACCACTATCCCACACTTGACAATAATAGTC

Como cebadores para la reacción de PCR estándar final para incorporar sitios de restricción para la clonación N-terminales y C-terminales adecuados en VL se usaron los oligonucleótidos 5'C9-VI-A-SacI y 3'C9-VI-E-BsiWI/Spel.

- 10 Para la selección de las entidades de unión a antígeno, la biblioteca de fagos que porta el repertorio de scFv clonado se recogió del sobrenadantes del cultivo respectivo por precipitación con PEG (polietilenglicol) 8000/NaCl y centrifugación. Aproximadamente 10^{11} a 10^{12} partículas de fago scFv se resuspenden en 0,4 ml de PBS/0,1 % de BSA y se incuban con antígeno HBS inmovilizado (p. ej., EngerixR -B, GlaxoSmithKline, Alemania; HBvaxPro™, Aventis Pasteur MSD SNC, Francia) durante 2 h con agitación suave a 37 °C. El antígeno HBS inmovilizado (p. ej., 5 µg/ml de PBS) se utilizó para recubrir los pocillos y los pocillos se bloquearon posteriormente según protocolos estándar.
- 15

Las partículas de fago que presentaban fragmentos de anticuerpo scFv que no se unen específicamente al antígeno diana se eliminaron por etapas de lavado con PBS/0,1 % de BSA (puede añadirse Tween 20 a la disolución de lavado para incrementar la astringencia del lavado). Después de lavar, las entidades de unión se eluyeron usando HCl-glicina pH 2,2 y después de neutralizar con Tris 2 M pH 12, el eluato se usó para la infección de un cultivo fresco no infectado de E. coli XL1 Blue.

20

- Para eluir las entidades de unión fuerte remanentes en los pocillos eluidos, se añadieron 200 µl de un cultivo fresco de E. coli XL1 blue (DO600 > 0,5) a los pocillos eluidos y se incubaron durante 10 minutos más con agitación suave. Ambos cultivos de E. coli se mezclaron entonces y las células transducidas con éxito con una copia de fagémido, que codifica un fragmento de anticuerpo scFv humano, se seleccionaron de nuevo por resistencia a carbenicilina y posteriormente se infectaron con el fago auxiliar VCMS 13 para iniciar la segunda ronda de exposición de anticuerpo y selección in vitro. Normalmente, se llevó a cabo un total de 4 a 5 rondas de selección.
- 25

- Con el fin de cribar agentes de unión específicos para HBS, el ADN plasmídico correspondiente a 4 y 5 rondas de reconocimiento y selección se aisló de cultivos de E. coli después de la selección. Para la producción de fragmento de anticuerpo scFv soluble, se escindieron fragmentos de ADN de VH-VL de los plásmidos (XhoI-Spel). Estos fragmentos se clonaron mediante los mismos sitios de restricción en el plásmido pComb3H5BFlag/His que se diferencia del pComb3H5BHis original en que la construcción de expresión (p. ej., fragmento de anticuerpo scFv) incluye una etiqueta Flag (DYKDDDDK) entre el fragmento de anticuerpo scFv y la etiqueta His₆ y las proteínas de fago adicionales se deleccionaron. Después de la ligación, cada conjunto (diferentes rondas de reconocimiento y selección) de ADN plasmídico se transformó en 100 µl de E. coli TG1 o XL1 blue competentes por choque térmico y se sembraron en placas en agar LB con carbenicilina. Se tomaron colonias únicas en 100 µl de LB carb (50 µg/ml).
- 30
- 35

Las E. coli transformadas con pComb3H5BHis que contenían un segmento de VL y VH producen fragmento de anticuerpo scFv soluble en cantidades suficientes después de la escisión del fragmento del gen III e inducción con IPTG 1 mM. Debido a una secuencia señal adecuada, el fragmento de anticuerpo scFv se exportó al periplasma donde se pliega en una conformación funcional.

- 40 Se tomaron colonias bacterianas únicas de E. coli TG1 de las placas de transformación para preparaciones periplásmicas a pequeña escala y se crecieron en medio SB (p. ej., 10 ml) suplementado con MgCl₂ 20 mM y 50µg/ml de carbenicilina (y se redisolviaron en PBS (p. ej., 1 ml) después de la recogida. Mediante cuatro rondas de congelación a -70 °C y descongelación a 37 °C, la membrana exterior de las bacterias se destruyó por choque térmico y las proteínas periplásmicas solubles incluyendo los fragmentos de anticuerpo scFv se liberaron en el sobrenadante.
- 45 Después de la eliminación de las células intactas y restos celulares por centrifugación, el sobrenadante que contenía los fragmentos de anticuerpo scFv anti-HBS se recogieron y se usaron para la identificación de agentes de unión específicos de HBS como sigue:

El antígeno HBS se utilizó para recubrir pocillos de placas de plástico de 96 pocillos (Nunc, maxisorb) típicamente a 4 °C toda la noche. Los pocillos se lavaron una vez con PBS/0,05 % de Tween 20 y posteriormente se bloquearon con PBS/3 % de BSA durante al menos una hora. Después de la retirada de la disolución de bloqueo, se añadieron preparaciones de periplasma y disoluciones control a los pocillos y se incubó durante típicamente una hora a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron entonces tres veces con PBS/0,05 % de Tween 20. La detección de fragmentos de anticuerpo scFv y anticuerpos control unidos al antígeno inmovilizado se llevó a cabo usando un anticuerpo monoclonal murino anti-His₆ o anti etiqueta FLAG (Qiagen anti-PentaHis y M2 anti Flag Sigma, típicamente cada uno a una concentración final de 1 µg/ml en PBS) detectados con un anticuerpo policlonal de cabra anti-fragmento Fab de ratón marcado con peroxidasa (Dianova, 1µg/ml en PBS). La señal se reveló mediante la adición de disolución de sustrato ABTS y se midió a una longitud de onda de 405 nm. La unión inespecífica de las muestras de ensayo al agente de bloqueo se examinó llevando a cabo los ensayos idénticos con los mismos reactivos y programa de tiempo idéntico en placas ELISA que no se recubrieron con antígeno, sino que se bloquearon con BSA sólo.

Para excluir la posibilidad de que la unión positiva pudiera deberse a la unión a BSA (que se va a usar como un agente de bloqueo en el primer experimento de ELISA), se realizó un segundo experimento de ELISA en paralelo. En este segundo experimento de ELISA, todos los parámetros fueron idénticos a aquellos en el primer experimento de ELISA, excepto que en el segundo experimento de ELISA no tiene lugar el recubrimiento con antígeno, sino sólo el bloqueo con BSA.

Con el fin de identificar aquellos fragmentos de anticuerpo scFv específicos para HBS identificados por ELISA, que también se unen al antígeno HBS cuando se presenta en la superficie de células infectadas por VHB, se llevó a cabo inmunofluorescencia indirecta con fragmento de anticuerpo scFv etiquetado con FLAG seguido por anticuerpo anti-FLAG conjugado con FITC en células HepG2.2.15 (Bohne F, Chmielewski M, Ebert G, et al. T cells redirected against hepatitis B virus surface proteins eliminate infected hepatocytes. *Gastroenterology* 2008; 134:239-47) según protocolos estándar (p. ej., *Current Protocols in Immunology*, Coligan, Kruisbeek, Margulies, Shevach y Strober, Wiley-Interscience, 2002, unidad 21.3). Las células HepG2 no infectadas sirvieron como control negativo. Las condiciones del cultivo de las células HepG2.2.15 para una exposición óptima del antígeno HBS en la superficie celular las han descrito Bohne et al. (Bohne F, Chmielewski M, Ebert G, et al. T cells redirected against hepatitis B virus surface proteins eliminate infected hepatocytes. *Gastroenterology* 2008; 134:239-47).

Los clones que se confirmó que se unían específicamente al antígeno HBS en la superficie de células infectadas por VHB se analizaron entonces para determinar propiedades favorables de la proteína y la secuencia de aminoácidos. Los fragmentos de anticuerpo scFv específicos para HBS se convirtieron en fragmentos de anticuerpos de cadena única en tándem biespecíficos recombinantes uniéndoles mediante un conector Gly₄Ser₁ con el fragmento de anticuerpo scFv específico para CD3 I2C (SEQ ID 185) o cualquier otro fragmento de anticuerpo scFv específico para CD3 de la invención para dar como resultado construcciones con la organización de dominios VH_{Muc1} - (Gly₄Ser₁)₃ - VL_{Muc1}- Gly₄Ser₁-VH_{CD3} - (Gly₄Ser₁)₃ - VL_{CD3} u organizaciones de dominios alternativas. Para la expresión en células CHO, las secuencias codificadoras de (i) un líder de la cadena pesada de inmunoglobulina N-terminal que comprende un codón de inicio incluido en una secuencia consenso Kozak y (ii) una etiqueta His₆ C-terminal seguido por un codón de parada se unieron ambos en marco a la secuencia de nucleótidos que codifica los fragmentos de anticuerpo de cadena única en tándem biespecíficos antes de la inserción del fragmento de ADN resultante como se obtiene por síntesis génica en el sitio de clonación múltiple del vector de expresión pEF-DHFR (Raum et al. *Cancer Immunol Immunother* 50 (2001) 141-150). La transfección estable de las células CHO deficientes para DHFR, la selección de transfectantes positivos para DHFR que secretan los anticuerpos de cadena única biespecíficos en el sobrenadante del cultivo y la amplificación génica con metotrexato para incrementar los niveles de expresión se llevaron a cabo como se describe (Mack et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995) 7021-7025). Todos los demás procedimientos del estado de la técnica se llevaron a cabo según protocolos estándar (Sambrook, *Molecular Cloning*; A Laboratory Manual, 3ª edición, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, Nueva York (2001)).

Los fragmentos de anticuerpo de cadena única en tándem biespecíficos funcionales se identificaron por ELISA y citometría de flujo usando el sobrenadante de cultivos de células CHO transfectadas. Para este propósito, la unión a CD3 se ensayó en la línea celular de leucemia de células T positiva para CD3 humano HPB-ALL (DSMZ, Braunschweig, ACC483) y en la línea de células T de macaco 4119LnPx. Se incubaron 200.000 células de la línea celular respectiva durante 30 min. en hielo con 50 µl de sobrenadante de cultivo celular. Las células se lavaron dos veces en PBS con 2 % de FCS y el fragmento de anticuerpo de cadena única en tándem biespecífico unido se detectó con un anticuerpo anti-His murino (anticuerpo frente a Penta His; Qiagen; diluido 1:20 en 50 µl de PBS con 2 % de FCS). Después de lavar, los anticuerpos anti-His unidos se detectaron con un anticuerpo específico de Fc gamma (Dianova) conjugado con ficoeritrina, diluido 1:100 en PBS con 2 % de FCS. El sobrenadante de las células CHO no transfectadas se usó como control negativo.

Se realizó citometría de flujo en un aparato FACS-Calibur; se usa el software CellQuest para adquirir y analizar los datos (Becton Dickinson biosciences, Heidelberg). La tinción para FACS y la medición de la intensidad de la fluorescencia se realizan como se describe en *Current Protocols in Immunology* (Coligan, Kruisbeek, Margulies, Shevach y Strober, Wiley-Interscience, 2002). La unión al antígeno HBS se ensayó por ELISA como se ha descrito anteriormente. La detección del fragmento de anticuerpo de cadena única en tándem biespecífico unido se llevó a cabo usando un anticuerpo monoclonal murino anti-His₆ (Qiagen anti-PentaHis típicamente a una concentración final

de 1 µg/ml en PBS) seguido por un anticuerpo policlonal de cabra anti-fragmento Fab de ratón conjugado con peroxidasa (Dianova, 1 µg/ml en PBS).

Sólo se seleccionaron para uso adicional aquellas construcciones que mostraron unión biespecífica a CD3 humano y de macaco, así como al antígeno HBS.

5 Para la producción de proteínas, las células CHO que expresaban fragmentos de anticuerpo de cadena única en tándem biespecíficos completamente funcionales y estaban adaptadas a medio líquido de soja HyQ PF CHO sin nucleósidos (con L-Glutamina 4,0 mM con 0,1 % de Pluronic F - 68; HyClone) se crecieron en botellas de cultivo rotatorias con medio líquido de soja HyQ PF CHO sin nucleósidos (con L-Glutamina 4,0 mM con 0,1 % de Pluronic F - 68; HyClone) durante 7 días. El sobrenadante de los cultivos se aclaró de células por centrifugación y se almacenó a
10 a -20°C hasta la purificación. Como equipo de cromatografía para la purificación del fragmento de anticuerpo de cadena única en tándem biespecífico del sobrenadante del cultivo, se usaron el Sistema Äkta® Explorer (GE Health Systems) y Software Unicorn®. Se realizó cromatografía de afinidad con metal inmovilizado ("IMAC") usando un Fractogel EMD chelate® (Merck) que se cargó con ZnCl₂ según el protocolo proporcionado por el fabricante. La columna se equilibró con tampón A (tampón fosfato de sodio 20 mM pH 7,2, NaCl 0,1 M) y el sobrenadante del cultivo celular (500 ml) se aplicó a la columna (10 ml) a una velocidad de flujo de 3 ml/min. La columna se lavó con tampón A para eliminar la muestra no unida. La proteína unida se eluyó usando un gradiente de dos etapas de tampón B (tampón fosfato de sodio 20 mM pH 7,2, NaCl 0,1 M, imidazol 0,5 M) según lo siguiente:

Etapa 1: 20 % de tampón B en 6 volúmenes de columna

20 Etapa 2: 100 % de tampón B en 6 volúmenes de columna

Las fracciones de proteína eluída de la etapa 2 se combinaron para purificación adicional. Todos los productos químicos son de grado de investigación y se adquirieron en Sigma (Deisenhofen) o Merck (Darmstadt).

25 La cromatografía de filtración en gel se realizó en una columna de grado preparativo HiLoad 16/60 Superdex 200 (GE/Amersham) equilibrada con tampón Equi (Citrato 25 mM, Lisina 200 mM, 5 % de Glicerol, pH 7,2). Las muestras de proteínas eluídas (velocidad de flujo 1 ml/min) se sometieron a SDS-PAGE estándar y Transferencia Western para su detección. Antes de la purificación, la columna se calibró para la determinación del peso molecular (kit de marcadores de peso molecular, Sigma MW GF-200). Las concentraciones de proteína se determinan usando DO280 nm.

30 El fragmento de anticuerpo de cadena única en tándem biespecífico purificado se analizó en SDS PAGE en condiciones reductoras realizada con geles preparados comercialmente de Bis Tris al 4-12 % (Invitrogen). La preparación y aplicación de las muestras se realizaron según el protocolo proporcionado por el fabricante. El peso molecular se determinó con el estándar de proteínas MultiMark (Invitrogen). El gel se tiñó con Coomassie coloidal (protocolo de Invitrogen). La pureza de la proteína aislada es >95 % como se determina por SDS-PAGE.

35 El fragmento de anticuerpo de cadena única en tándem biespecífico tiene un peso molecular de aproximadamente 52 kDa en condiciones nativas como se determina con filtración en gel en PBS. Todas las construcciones se purificaron según este método.

40 Se realizó Transferencia Western usando una membrana Optitran® BA-S83 y el Módulo de Transferencia de Invitrogen según el protocolo proporcionado por el fabricante. Para la detección de los fragmentos de anticuerpo de cadena única en tándem biespecíficos, se usó un anticuerpo anti-Etiqueta His (Penta His, Qiagen). Se usó un anticuerpo anti-Ig de ratón de cabra marcado con fosfatasa alcalina (AP) (Sigma) como anticuerpo secundario y BCIP/NBT (Sigma) como sustrato. Se detectó una única banda a 52 kD correspondiente al fragmento de anticuerpo de cadena única en tándem biespecífico purificado.

45 La potencia en el sistema humano y de primate distinto del chimpancé de fragmentos de anticuerpo de cadena única en tándem biespecíficos que interaccionan con CD3 humano y de macaco y con antígeno HBS se determinó por un ensayo de citotoxicidad no radiactivo usando células HepG2.2.15 como células diana como se describe por Bohne et al. (Bohne F, Chmielewski M, Ebert G, et al. T cells redirected against hepatitis B virus surface proteins eliminated infected hepatocytes. Gastroenterology 2008; 134:239-47) y PBMC humanas deplecionadas de CD4/CD56 estimuladas o la línea de células T de macaco 4119LnPx en lugar de células T transducidas con un receptor de células T quimérico como células efectoras. Con el fin de obtener curvas de respuesta a la dosis, la concentración de cada fragmento de anticuerpo de cadena única en tándem biespecífico (en lugar de la relación E:D como se describe por Bohne et al.) se tituló en el ensayo de citotoxicidad a una relación E:D fija (p. ej., 10:1 o 5:1).

La generación de PBMC humanas estimuladas se realizó como sigue:

55 Se recubrió una placa Petri (85 mm de diámetro, Nunc) con un anticuerpo específico anti-CD3 disponible comercialmente (p. ej., OKT3, Othoclone) en una concentración final de 1 µg/ml durante 1 hora a 37 °C. La proteína no unida se eliminó por una etapa de lavado con PBS. Las PBMC frescas se aislaron de sangre periférica (30 - 50 ml de sangre humana) por centrifugación en gradiente de Ficoll según protocolos estándar. Se añadieron 3 - 5 x 10⁷

PBMC a la placa petri prereducida en 50 ml de RPMI 1640 con glutamina estabilizada / 10 % de FCS /20 U/ml de IL-2 (Proleukin, Chiron) y se estimularon durante 2 días. Al tercer día, las células se recogieron y se lavaron una vez con RPMI 1640. Se añadió IL-2 a una concentración final de 20 U/ml y las células se cultivaron de nuevo durante un día en el mismo medio de cultivo celular que anteriormente.

- 5 El análisis de los datos experimentales del ensayo de citotoxicidad se realizó con Prism 4 para Windows (versión 4.02, GraphPad Software Inc., San Diego, California, EEUU). Las curvas de respuesta a la dosis sigmoidales tienen típicamente valores de $R^2 > 0,90$ como se determina por el software. Los valores de CE_{50} como medida de potencia se calcularon por el programa de análisis.

41.2 Virus de la hepatitis C (VHC)

- 10 Se usan los siguientes oligonucleótidos degenerados, que se superponen mutuamente en una cadena terminal de aproximadamente 15-20 nucleótidos, y en donde cada segundo cebador es un cebador antisentido, para proporcionar un contexto de secuencia de VH humana para CDRH1 (SEQ ID 1652), CDRH2 (SEQ ID 1653) y CDRH3 (SEQ ID 1654):

5'HC1-VH-A-XhoI

CAGCTACTCGAGTSGGGCGSAGGACTGKTGMAGCCTKSGGRGTCCCTGAGWC

- 15 TCTCCTGCGCTG

3'HC1-VH-B

CCACTCCAGCCCCTTCCCAGGGGMCTGGCGGAYCCAGGTCCAGAAGTAACCAC

TWAAGGTAMMACCAKAGRCAGCGCAGGAGAGWCTCAGGGAC

5'HC1-VH-C

CTGGGAAGGGGCTGGAGTGGRTRGTGAAAGCAATTATAGTGAAGTACCAGG

TACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAKTCACCATATCA

- 20 3'HC1-VH-D

ATACAGCCGTGTCCCKCGGCTSTCASAGAAAYTCAKCTKCAGGKAGARCKKGTCT

KGGAGKTGTCTMYTGATATGGTGAMTCGACTCTTG

5'HC1-VH-E

AGCCGMGGACACGGCTGTATATACTGTGCGAGAGGTTGGGCGGTGGACGGT

ATGGACGTCTGGGGCCGAGGGACCTTGGTCACCGTC

3'HC1-VH-F-BstEII

- 25 GAGACGGTGACCAAGGTCCCTCGGCCCCAGACGTCCATACC

Este conjunto de cebadores abarca la secuencia completa de VH. En este conjunto, los cebadores se mezclaron en cantidades iguales (p. ej., 1 μ l de cada cebador (preparaciones madre de cebadores 20 a 100 μ M) a una reacción de PCR de 20 μ l) y se añadieron a una mezcla de PCR que consistía en tampón de PCR, nucleótidos y Taq polimerasa. Esta mezcla se incubó a 94 °C durante 3 minutos, 65 °C durante 1 minuto, 62 °C durante 1 minuto, 59 °C durante 1 minuto, 56 °C durante 1 minuto, 52 °C durante 1 minuto, 50 °C durante 1 minuto y a 72°C durante 10 minutos en un ciclador de PCR. Posteriormente, el producto se corrió en una electroforesis en gel de agarosa y el producto con un tamaño de 200 a 400 se aisló del gel según métodos estándar.

- 35 El producto VH de la PCR resultante se usó entonces como un molde para una reacción estándar de PCR usando cebadores que incorporan sitios de restricción para la clonación N-terminales y C-terminales adecuados (cebador 5'HC1-VH-A-XhoI y cebador 3'HC1-VH-F-BstEII). El fragmento de ADN con el tamaño correcto (para una VH aproximadamente 350 nucleótidos) se aisló por electroforesis en gel de agarosa según métodos estándar. De esta manera, se amplificó suficiente fragmento de ADN de VH.

- 40 Se usaron los siguientes oligonucleótidos degenerados, que se superponen mutuamente en una cadena terminal de aproximadamente 15-20 nucleótidos, y en donde cada segundo cebador fue un cebador antisentido, para proporcionar un contexto de secuencia de VL humana para CDRL1 (SEQ ID 1657), CDRL2 (SEQ ID 1658) y CDRL3 (SEQ ID 1659), que estaban asociados con CDRH1 (SEQ ID 1652), CDRH2 (SEQ ID 1653) y CDRH3 (SEQ ID HC1 1654):

5'HC1-VI-A-SacI

ACTAGCGAGCTCGWGCTGACACAGCCACCCTCG

5'HC1-VI-B

GCTGACACAGCCACCCTCGGYGTCAGKGACCCCAGGACAGASGGYCASGATCT
CCTGCTCTGGAGATGCATTGCCAAAGCAATATGC

5 3'HC1-VI-C

CCCTGAGGGCCTCTCATTATCTTTATATATCASCAACWYAGGGGCKKGCCTGG
CWKCTGCTGATACCAGTAAGCATATTGCTTTGGCAATGC

5'HC1-VI-D

GATAATGAGAGGCCCTCAGGGRTCCCTGASCGATTCTCTGGCTCCARGTCAGG
GACATCAGYCTCGTTGRCCATCAGTGGASTCMRGKCAGAAGACGAGGCTGACT
A

3'HC1-VI-E-BsiWI/Spel

GCTACTACTAGTCGTACGTAGGACGGTCAGCTGGGTCCCTCCGCCGAACACCC
10 AGGAAGAACCACTGCTGTCTGCTGATTGACAGTAATAGTCAGCCTCGTCTTCTG

Este conjunto de cebadores abarca la secuencia completa de VL correspondiente. En este conjunto, los cebadores se mezclaron en cantidades iguales (p. ej., 1 µl de cada cebador (preparaciones madre de cebadores 20 a 100 µM) a una reacción de PCR de 20 µl) y se añadieron a una mezcla de PCR que consistía en tampón de PCR, nucleótidos y Taq polimerasa. Esta mezcla se incubó a 94 °C durante 3 minutos, 65 °C durante 1 minuto, 62 °C durante 1 minuto, 59 °C durante 1 minuto, 56 °C durante 1 minuto, 52 °C durante 1 minuto, 50 °C durante 1 minuto y a 72°C durante 10 minutos en un ciclador de PCR. Posteriormente, el producto se corrió en una electroforesis en gel de agarosa y el producto con un tamaño de 200 a 400 se aisló del gel según métodos estándar.

El producto VL de la PCR resultante se usó entonces como un molde para una reacción estándar de PCR usando cebadores que incorporan sitios de restricción para la clonación N-terminales y C-terminales adecuados (cebador 5'HC1-VI-A-SacI y cebador 3'HC1-VI-E-BsiWI/Spel). El fragmento de ADN con el tamaño correcto (para una VL aproximadamente 330 nucleótidos) se aisló por electroforesis en gel de agarosa según métodos estándar. De esta manera, se amplificó suficiente fragmento de ADN de VL.

El producto VH de la PCR final (es decir, el repertorio de VH humano/humanizado) se combinó entonces con su producto VL de la PCR final respectivo (es decir, el repertorio de VL humano/humanizado) en el vector de exposición en fago pComb3H5BHis para formar una biblioteca de fragmentos de anticuerpo scFv funcionales de la que - después de la exposición en fago filamentoso - se seleccionaron agentes de unión anti-HBS, se cribaron, se identificaron y se confirmaron como se describe a continuación:

Se ligaron 450 ng de los fragmentos de cadena ligera (digeridos con SacI-Spel) con 1.400 ng del fagémido pComb3H5BHis (digerido con SacI-Spel; fragmento grande). La biblioteca de anticuerpos combinatoria resultante se transformó entonces en 300 µl de células de Escherichia coli XL1 Blue electrocompetentes por electroporación (2,5 kV, cubeta con 0,2 cm de separación, 25 µFD, 200 Ohm, pulsador génico Biorad) dando como resultado una biblioteca con un tamaño de más 10⁷ clones independientes. Después de una hora de expresión fenotípica, los transformantes positivos se seleccionaron por resistencia a carbenicilina codificada por el vector pComb3H5BHis en 100 ml de cultivo en súper caldo (SB) líquido toda la noche. Las células se recogieron entonces por centrifugación y se llevó a cabo la preparación de plásmidos usando un kit de preparación de plásmidos disponible comercialmente (Qiagen).

Se ligaron 2.800 ng de este ADN plasmídico que contenía la biblioteca de VL (digerido con XhoI-BstEII; fragmento grande) con 900 ng de los fragmentos V de cadena pesada (digeridos con XhoI-BstEII) y se transformaron de nuevo en dos partes alícuotas de 300 µl de células de E. coli XL1 Blue electrocompetentes por electroporación (2,5 kV, cubeta con 0,2 cm de separación, 25 µFD, 200 Ohm) dando como resultado una biblioteca de scFv VH-VL (fragmento variable de cadena única) con un tamaño total de más de 10⁷ clones independientes.

Después de la expresión fenotípica y la adaptación lenta a carbenicilina, las células de E. coli que contenían la biblioteca de anticuerpo se transfirieron a medio de selección SB-Carbenicilina (50 µg/mL). Las células de E. coli que contenían la biblioteca de anticuerpo se infectaron entonces con una dosis infecciosa de 10¹² partículas de fago auxiliar

VCSM13 dando como resultado la producción y secreción de fago filamentoso M13, en donde la partícula de fago contiene ADN de pComb3H5BHis monocatenario que codifica un fragmento de anticuerpo scFv y presentaba el fragmento de anticuerpo scFv correspondiente como una fusión de traducción con la proteína de cubierta del fago III. Este conjunto de fagos que presenta la biblioteca de anticuerpo se usó para la selección de entidades de unión a antígeno.

Para este propósito, la biblioteca de fagos que porta el repertorio de fragmentos de anticuerpo scFv clonado se recogió del sobrenadante del cultivo respectivo por precipitación con PEG8000/NaCl y centrifugación. Aproximadamente 10^{11} a 10^{12} partículas de fago que presentaban el fragmento de anticuerpo scFv se resuspenden en 0,4 ml de PBS/0,1 % de BSA y se incubaron con 10^5 a 10^7 células CHO transfectadas con el antígeno E2 de VHC de los genotipos de VHC 1a y/o 1b como se describe en el Ejemplo 40.1 durante 1 hora en hielo con agitación lenta. Estas células CHO transfectadas con antígeno de VHC se recogieron previamente por centrifugación, se lavaron en PBS y se resuspendieron en PBS/1 % de FCS (que contenía Azida Na). Las partículas de fago que presentaban fragmentos de anticuerpo scFv, que no se unen específicamente a las células CHO transfectadas con antígeno de VHC, se eliminaron mediante hasta cinco etapas de lavado con PBS/1 % de FCS (que contenía Azida Na). Después de lavar, las entidades de unión se eluyeron de las células mediante la resuspensión de las células en HCl-glicina pH 2,2 (incubación de 10 min con vórtex posterior) y después de neutralizar con 2 M Tris pH 12, el eluato se usó para la infección de un cultivo fresco no infectado de *E. coli* XL1 Blue (DO600 > 0,5). El cultivo de *E. coli* que contenía células de *E. coli* que se habían transducido con éxito con una copia del fagémido, que codifica un fragmento de anticuerpo scFv humano/humanizado, se seleccionaron de nuevo por resistencia a carbenicilina y se infectaron posteriormente con el fago auxiliar VCMS 13 para iniciar la segunda ronda de presentación de anticuerpo y selección in vitro. Normalmente, se llevó a cabo un total de 4 a 5 rondas de selecciones.

Con el fin de cribar para agentes de unión específicos de antígeno de VHC, se aisló el ADN plasmídico correspondiente a 4 y 5 rondas de reconocimiento y selección de cultivos de *E. coli* después de la selección. Para la producción de fragmento de anticuerpo scFv soluble, los fragmentos de ADN de VH-VL se escindieron de los plásmidos (Xhol-SpeI). Estos fragmentos se clonaron mediante los mismos sitios de restricción en el plásmido pComb3H5BFlag/His que se diferencia del pComb3H5BHis original en que la construcción de expresión (p. ej., fragmento de anticuerpo scFv) incluye una etiqueta Flag (DYKDDDDK) entre el fragmento de anticuerpo scFv y la etiqueta de His₆ y se delecionaron las proteínas de fago adicionales. Después de la ligación, cada conjunto (diferentes rondas de reconocimiento y selección) de ADN plasmídico se transformó en 100 µl de *E. coli* TG1 o XLI blue competentes por choque térmico y se sembró en placas en agar LB con carbenicilina. Se tomaron colonias únicas en 100 µl de LB carb (50 µg/ml).

Las *E. coli* transformadas con pComb3H5BHis que contienen un segmento de VL y VH producen fragmento de anticuerpo scFv soluble en cantidades suficientes después de la escisión del fragmento del gen III e inducción con IPTG 1 mM. Debido a una secuencia señal adecuada, el fragmento de anticuerpo scFv se exportó al periplasma donde se pliega en una conformación funcional.

Se tomaron colonias bacterianas de *E. coli* TG1 únicas de las placas de transformación para preparaciones periplásmicas a pequeña escala y se crecieron en medio SB (p. ej., 10 ml) suplementado con MgCl₂ 20 mM y 50 µg/ml de carbenicilina (y se redisolviéron en PBS (p. ej., 1 ml) después de la recogida. Mediante cuatro rondas de congelación a -70°C y descongelación a 37°C, la membrana exterior de las bacterias se destruyó por choque de temperatura y las proteínas periplásmicas solubles incluyendo los fragmentos de anticuerpo scFv se liberaron al sobrenadante. Después de la eliminación de las células intactas y restos celulares por centrifugación, se recogió el sobrenadante que contenía los fragmentos de anticuerpo scFv anti-VHC y se usó para la identificación de agentes de unión específicos del antígeno de VHC como sigue

La unión de fragmentos de anticuerpo scFv a VHC se ensaya por citometría de flujo en células CHO transfectadas con antígeno de VHC (véase el Ejemplo 40.1); las células CHO no transfectadas se usaron como control negativo.

Para la citometría de flujo, se incubaron $2,5 \times 10^5$ células con 50 µl de preparación periplásmica de fragmento de anticuerpo scFv o con 5 µg/ml de fragmentos de anticuerpo scFv purificados en 50 µl de PBS con 2 % de FCS. La unión del fragmento de anticuerpo scFv se detectó con un anticuerpo anti-His (Anticuerpo frente a Penta-His, sin BSA, Qiagen GmbH, Hilden, FRG) a 2 µg/ml en 50 µl de PBS con 2 % de FCS. Como un reactivo de la segunda etapa, se usó un fragmento F(ab')₂ purificado por afinidad conjugado con R-Ficoeritrina, anti-IgG de ratón de cabra (específico de fragmento Fc-gamma), diluido 1:100 en 50 µl de PBS con 2 % de FCS (Dianova, Hamburgo, FRG). Las muestras se midieron en un FACSscan (BD biosciences, Heidelberg, FRG). Los clones únicos se analizaron entonces para determinar propiedades favorables y la secuencia de aminoácidos. Los fragmentos de anticuerpo scFv específicos de VHC se convirtieron en fragmentos de anticuerpo de cadena única en tándem biespecíficos recombinantes uniéndolos mediante un conector Gly₄Ser₁ con el fragmento de anticuerpo scFv específico de CD3 I2C (SEQ ID 185) o cualquier otro fragmento de anticuerpo scFv específico de CD3 de la invención para dar como resultado construcciones con la organización de dominios VH_{VHC1} - (Gly₄Ser₁)₃ - VL_{VHC} - Gly₄Ser₁ - VH_{CD3} - (Gly₄Ser₁)₃ - VL_{CD3} u organizaciones de dominios alternativas. Para la expresión en células CHO, las secuencias codificadoras de (i) un líder de cadena pesada de inmunoglobulina N-terminal que comprende un codón de inicio incluido en una secuencia consenso Kozak y (ii) una etiqueta His₆ C-terminal seguido por un codón de parada se unieron ambos en marco con la secuencia de nucleótidos que codifica los fragmentos de anticuerpo de cadena única en tándem biespecíficos antes de la inserción del fragmento de ADN resultante como se obtiene por síntesis génica en el sitio de clonación múltiple del vector de

expresión pEF-DHFR (Raum et al. Cancer Immunol Immunother 50 (2001) 141-150). La transfección estable de células CHO deficientes para DHFR, la selección de transfectantes positivos para DHFR que secretan los fragmento de anticuerpo de cadena única en tándem biespecíficos en el sobrenadante del cultivo y la amplificación génica con metotrexato para incrementar los niveles de expresión se llevaron a cabo como se describe (Mack et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995) 7021-7025). Todos los demás procedimientos del estado de la técnica se llevaron a cabo según protocolos estándar (Sambrook, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 3ª edición, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, Nueva York (2001)).

La identificación de los fragmentos de anticuerpo de cadena única en tándem biespecíficos funcionales se llevó a cabo por análisis de citometría de flujo del sobrenadante del cultivo de células CHO transfectadas. Para este propósito, la unión a CD3 se ensayó en la línea celular de leucemia de células T positiva para CD3 humano HPB-ALL (DSMZ, Braunschweig, ACC483) y en la línea de células T de macaco 4119LnPx. La unión a VHC se ensayó en células CHO transfectadas con antígeno de VHC (véase el Ejemplo 40.1). Se incubaron 200.000 células de la línea celular respectiva durante 30 min. en hielo con 50 µl de sobrenadante de cultivo celular. Las células se lavaron dos veces en PBS con 2 % de FCS y el fragmento de anticuerpo de cadena única en tándem biespecífico unido se detectó con un anticuerpo anti-His murino (anticuerpo frente a Penta His; Qiagen; diluido 1:20 en 50 µl de PBS con 2 % de FCS). Después de lavar, los anticuerpos anti-His unidos se detectaron con un anticuerpo específico de Fc gamma (Dianova) conjugado con ficoeritrina, diluido 1:100 en PBS con 2 % de FCS. El sobrenadante de las células CHO no transfectadas se usó como control negativo.

Se realizó citometría de flujo en un aparato FACS-Calibur; se usó el software CellQuest para adquirir y analizar los datos (Becton Dickinson biosciences, Heidelberg). La tinción para FACS y la medición de la intensidad de la fluorescencia se realizaron como se describe en Current Protocols in Immunology (Coligan, Kruisbeek, Margulies, Shevach y Strober, Wiley-Interscience, 2002).

Sólo se seleccionaron para uso adicional aquellas construcciones que mostraron unión biespecífica a CD3 humano y de macaco, así como al antígeno de VHC.

Para la purificación de proteínas, se crecieron células CHO que expresaban fragmento de anticuerpo de cadena única en tándem biespecífico completamente funcional y adaptadas a medio líquido de soja HyQ PF CHO sin nucleósidos (con L-Glutamina 4,0 mM con 0,1 % de Pluronic F - 68; HyClone) en botellas de cultivo rotatorias con medio líquido de soja HyQ PF CHO sin nucleósidos (con L-Glutamina 4,0 mM con 0,1 % de Pluronic F - 68; HyClone) durante 7 días. El sobrenadante del cultivo se aclaró de células por centrifugación y se almacenó a -20°C hasta la purificación. Como equipo de cromatografía para la purificación del fragmento de anticuerpo de cadena única en tándem biespecífico del sobrenadante del cultivo, se usaron el Sistema Äkta® Explorer (GE Health Systems) y Software Unicorn®. Se realizó cromatografía de afinidad con metal inmovilizado ("IMAC") usando un Fractogel EMD chelate® (Merck) que se cargó con ZnCl₂ según el protocolo proporcionado por el fabricante. La columna se equilibró con tampón A (tampón fosfato de sodio 20 mM pH 7,2, NaCl 0,1 M) y el sobrenadante del cultivo celular (500 ml) se aplicó a la columna (10 ml) a una velocidad de flujo de 3 ml/min. La columna se lavó con tampón A para eliminar la muestra no unida.

La proteína unida se eluyó usando un gradiente de dos etapas de tampón B (tampón fosfato de sodio 20 mM pH 7,2, NaCl 0,1 M, imidazol 0,5 M) según lo siguiente:

Etapas 1: 20 % de tampón B en 6 volúmenes de columna

Etapas 2: 100 % de tampón B en 6 volúmenes de columna

Las fracciones de proteína eluída de la etapa 2 se combinaron para purificación adicional. Todos los productos químicos son de grado de investigación y se adquirieron en Sigma (Deisenhofen) o Merck (Darmstadt).

La cromatografía de filtración en gel se realizó en una columna de grado preparativo HiLoad 16/60 Superdex 200 (GE/Amersham) equilibrada con tampón Equi (Citrato 25 mM, Lisina 200 mM, 5 % de Glicerol, pH 7,2). Las muestras de proteínas eluídas (velocidad de flujo 1 ml/min) se sometieron a SDS-PAGE estándar y Transferencia Western para su detección. Antes de la purificación, la columna se calibró para la determinación del peso molecular (kit de marcadores de peso molecular, Sigma MW GF-200). Las concentraciones de proteína se determinaron usando DO280 nm.

El fragmento de anticuerpo de cadena única en tándem biespecífico purificado se analizó en SDS PAGE en condiciones reductoras realizada con geles preparados comercialmente de Bis Tris al 4-12 % (Invitrogen). La preparación y aplicación de las muestras se realizaron según el protocolo proporcionado por el fabricante. El peso molecular se determinó con el estándar de proteínas MultiMark (Invitrogen). El gel se tiñó con Coomassie coloidal (protocolo de Invitrogen). La pureza de la proteína aislada es >95 % como se determina por SDS-PAGE.

El fragmento de anticuerpo de cadena única en tándem biespecífico tiene un peso molecular de aproximadamente 52 kDa en condiciones nativas como se determina con filtración en gel en PBS. Todas las construcciones se purificaron según este método.

Se realizó Transferencia Western usando una membrana Optitran® BA-S83 y el Módulo de Transferencia de Invitrogen según el protocolo proporcionado por el fabricante. Para detección de los fragmentos de anticuerpo de cadena única en tándem biespecíficos, se usó un anticuerpo anti-Etiqueta His (Penta His, Qiagen). Se usó un anticuerpo anti-Ig de ratón de cabra marcado con fosfatasa alcalina (AP) (Sigma) como anticuerpo secundario y BCIP/NBT (Sigma) como sustrato. Se detectó una única banda a 52 kD correspondiente al fragmento de anticuerpo de cadena única en tándem biespecífico purificado.

La potencia en el sistema humano y de primate distinto del chimpancé de los fragmentos de anticuerpo de cadena única en tándem biespecíficos que interaccionan con CD3 humano y de macaco y con el antígeno de VHC se determinó por un ensayo de citotoxicidad basado en la liberación de cromo 51 (⁵¹Cr) usando células CHO transfectadas con el antígeno de VHC como células diana (véase el Ejemplo 40.1) y PBMC humanas deplecionadas de CD4/CD56 estimuladas o la línea de células T de macaco 4119LnPx como células efectoras.

La generación de PBMC humanas estimuladas se realizó como sigue:

Se recubrió una placa Petri (85 mm de diámetro, Nunc) con un anticuerpo específico anti-CD3 disponible comercialmente (p. ej., OKT3, Othoclone) en una concentración final de 1 µg/ml durante 1 hora a 37 °C. La proteína no unida se eliminó por una etapa de lavado con PBS. Las PBMC frescas se aislaron de sangre periférica (30 - 50 ml de sangre humana) por centrifugación en gradiente de Ficoll según protocolos estándar. Se añadieron 3 - 5 x 10⁷ PBMC a la placa petri precubierta en 50 ml de RPMI 1640 con glutamina estabilizada / 10 % de FCS / 20 U/ml de IL-2 (Proleukin, Chiron) y se estimularon durante 2 días. Al tercer día, las células se recogieron y se lavaron una vez con RPMI 1640. Se añadió IL-2 a una concentración final de 20 U/ml y las células se cultivaron de nuevo durante un día en el mismo medio de cultivo celular que anteriormente.

Las células diana se lavaron dos veces con PBS y se marcaron con 11,1 MBq de ⁵¹Cr en un volumen final de 100 µl de RPMI con 50 % de FCS durante 45 minutos a 37 °C. Posteriormente, las células diana marcadas se lavaron 3 veces con 5 ml de RPMI y se usaron entonces en el ensayo de citotoxicidad. El ensayo se realizó en una placa de 96 pocillos en un volumen total de 250 µl de RPMI suplementado (como anteriormente) con una relación E:D de 10:1. Se aplicaron 1 µg/ml de los fragmentos de anticuerpo de cadena única en tándem biespecíficos específicos entre especies y 20 diluciones de tres veces de las mismas. El tiempo del ensayo fue 18 horas y la citotoxicidad se midió como valores relativos de cromo liberado en el sobrenadante relacionado con la diferencia de lisis máxima (adición de Tritón-X) y lisis espontánea (sin células efectoras). Todas las mediciones se hicieron en cuadruplicado. La medición de la actividad de cromo en los sobrenadantes se realizó con un contador gamma Wizard 3" (Perkin Elmer Life Sciences GmbH, Colonia, Alemania). El análisis de los datos experimentales se realizó con Prism 4 para Windows (versión 4.02, GraphPad Software Inc., San Diego, California, EEUU). Las curvas de respuesta a la dosis sigmoidales tienen típicamente valores de R² >0,90 como se determina por el software. Los valores de CE₅₀ como medida de la potencia se calcularon por el programa de análisis.

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido que comprende un dominio de unión, que es un anticuerpo capaz de unirse a un epítipo de la cadena CD3ε humana y de *Callithrix jacchus*, *Saguinus oedipus* o *Saimiri sciureus*, en donde el epítipo es parte de una secuencia de aminoácidos comprendida en el grupo que consiste en SEQ ID NOs:2, 4, 6, u 8 y comprende al menos la secuencia de aminoácidos Gln-Asp-Gly-Asn-Glu, en donde el primer dominio de unión comprende una región VL que comprende CDR-L1 GSSTGAVTSGNYPN (SEQ ID NO:153), CDR-L2 GTKFLAP (SEQ ID NO:154) y CDR-L3 VLWYSNRWV (SEQ ID NO:155) y una región VH que comprende CDR-H 1 KYAMN (SEQ ID NO:174), CDR-H2 RIRSKYNNYATYYADSVKD (SEQ ID NO:175) y CDR-H3 HGNFGNSYISYWAY (SEQ ID NO:176), y
- 5 en donde el polipéptido comprende además un segundo dominio de unión capaz de unirse a un antígeno de la superficie celular que es CD33.
- 10 2. El polipéptido como se define en la reivindicación 1, en donde el epítipo es parte de una secuencia de aminoácidos comprendida en el grupo que consiste en SEQ ID NOs:2, 4, 6, y 8 y comprende al menos la secuencia de aminoácidos Gln-Asp-Gly-Asn-Glu.
- 15 3. El polipéptido de la reivindicación 1 o 2, en donde el primer dominio de unión comprende una región VL seleccionada del grupo que consiste en una región VL como se representa en SEQ ID NO: 179 o 183.
4. El polipéptido de la reivindicación 1 o 2, en donde el primer dominio de unión comprende una región VH seleccionada del grupo que consiste en una región VH como se representa en SEQ ID NO: 177 o 181.
5. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el primer unión comprende una región VL como se representa en SEQ ID NO:179 o 183 y una región VH como se representa en SEQ ID NO:177 o 181.
- 20 6. El polipéptido según la reivindicación 5, en donde el primer dominio de unión comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 185 o 187.
7. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicho polipéptido es una molécula de anticuerpo de cadena única biespecífica.
- 25 8. El polipéptido de la reivindicación 7, en donde la molécula de cadena única biespecífica comprende un grupo de las siguientes secuencias como CDR H1, CDR H2, CDR H3, CDR L1, CDR L2 y CDR L3 en el segundo dominio de unión seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID Nos: SEQ ID NOs:382-384 y 387-389, SEQ ID NOs:400-402 y 405-407, SEQ ID NOs:418-420 y 423-425, SEQ ID NOs:436-438 y 441-443, SEQ ID NOs:454-456 y 459-461, SEQ ID NOs:472-474 y 477-479, SEQ ID NOs:490-492 y 495-497, SEQ ID NOs:508-510 y 513-515.
- 30 9. El polipéptido de la reivindicación 8, en donde la molécula de anticuerpo de cadena única biespecifica comprende una secuencia seleccionada de:
- (a) una secuencia de aminoácidos como se representa en cualquiera de SEQ ID NOs: 393, 395, 397, 411, 413, 415, 429, 431, 433, 447, 449, 451, 465, 467, 469, 483, 485, 487, 501, 503, 505, 519, 521, 523; y
- (b) una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácido nucleico como se representa en cualquiera de SEQ ID NOs: 394, 396, 398, 412, 414, 416, 430, 432, 434, 448, 450, 452, 466, 468, 470, 484, 486, 488, 502, 504, 506, 520, 522, 524.
- 35 10. Una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
11. Un vector, que comprende una secuencia de ácido nucleico como se define en la reivindicación 10.
12. Una composición farmacéutica que comprende un polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
- 40 13. La composición farmacéutica de la reivindicación 12 para uso en un método para la prevención, tratamiento o mejora de una enfermedad proliferativa.
14. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 13, en donde dicha composición farmacéutica es adecuada para ser administrada en combinación con un fármaco adicional.
- 45 15. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 14, en donde dicho fármaco es un compuesto no proteináceo o un compuesto proteináceo.

Figura 1

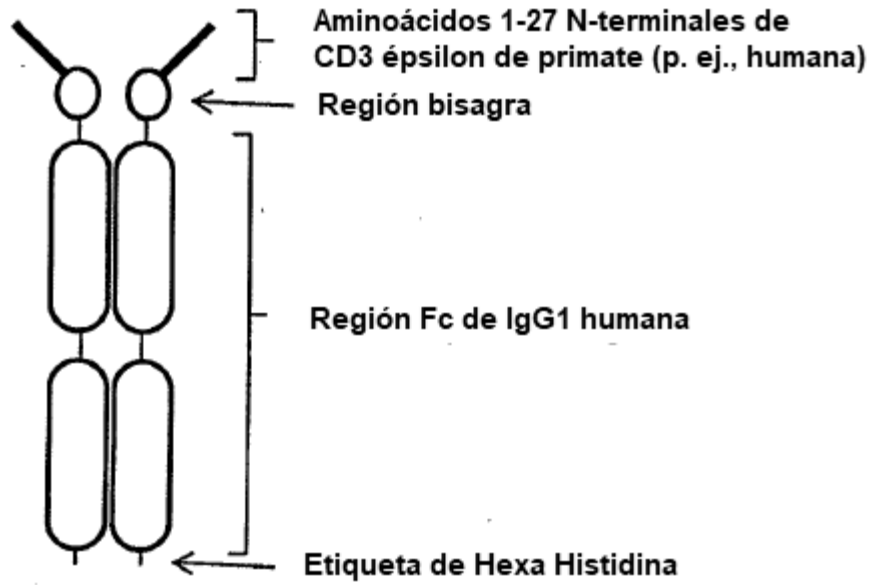


Figura 2

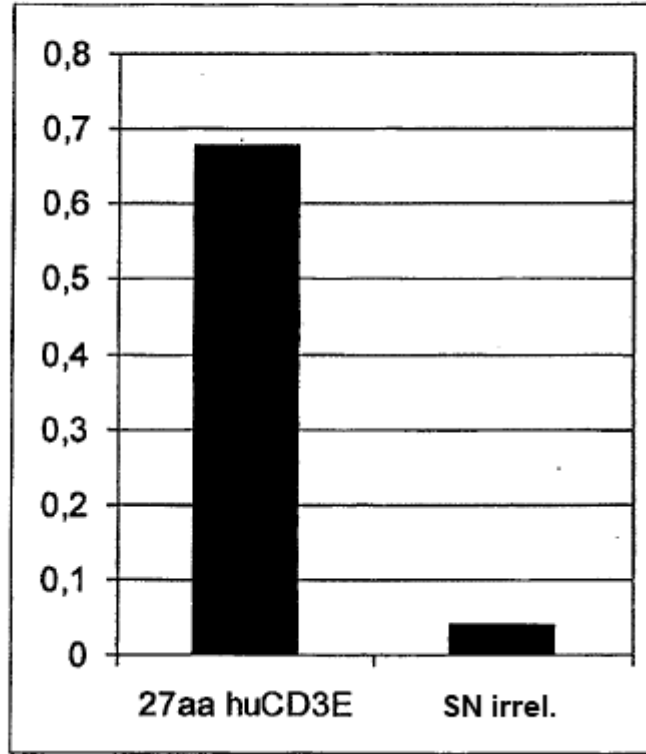


Figura 3

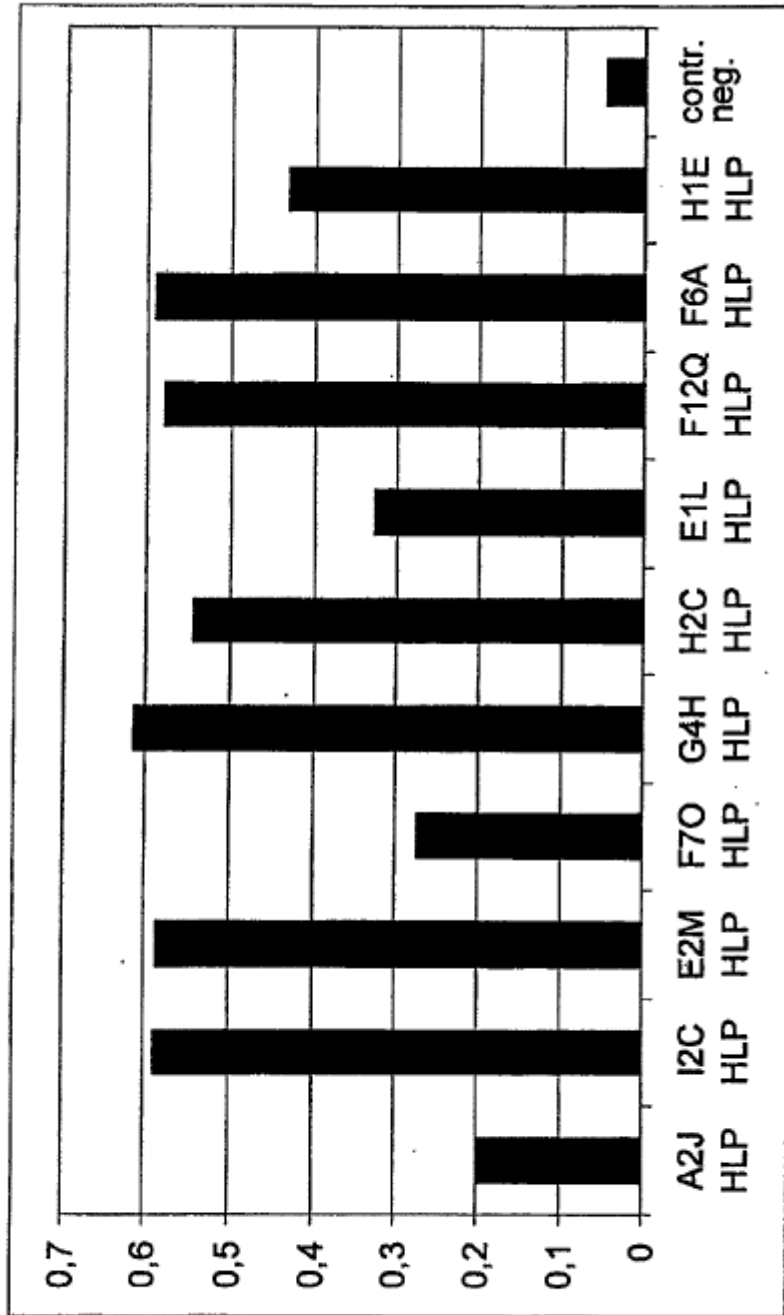


Figura 4

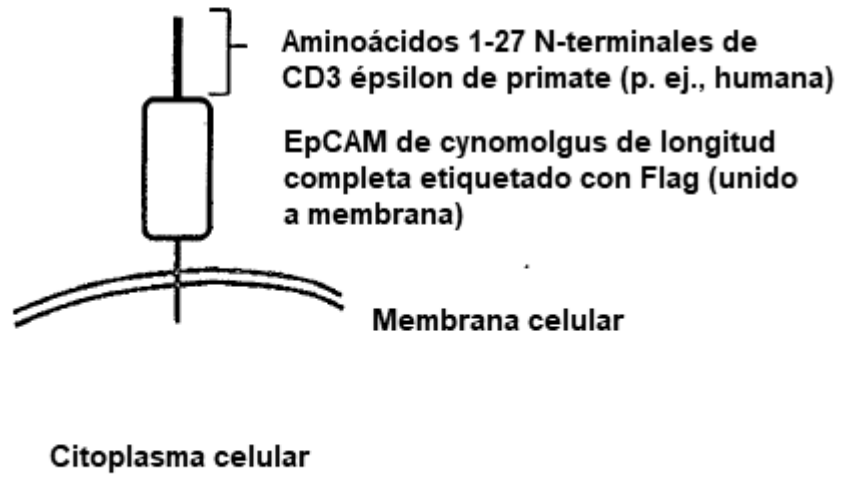


Figura 5

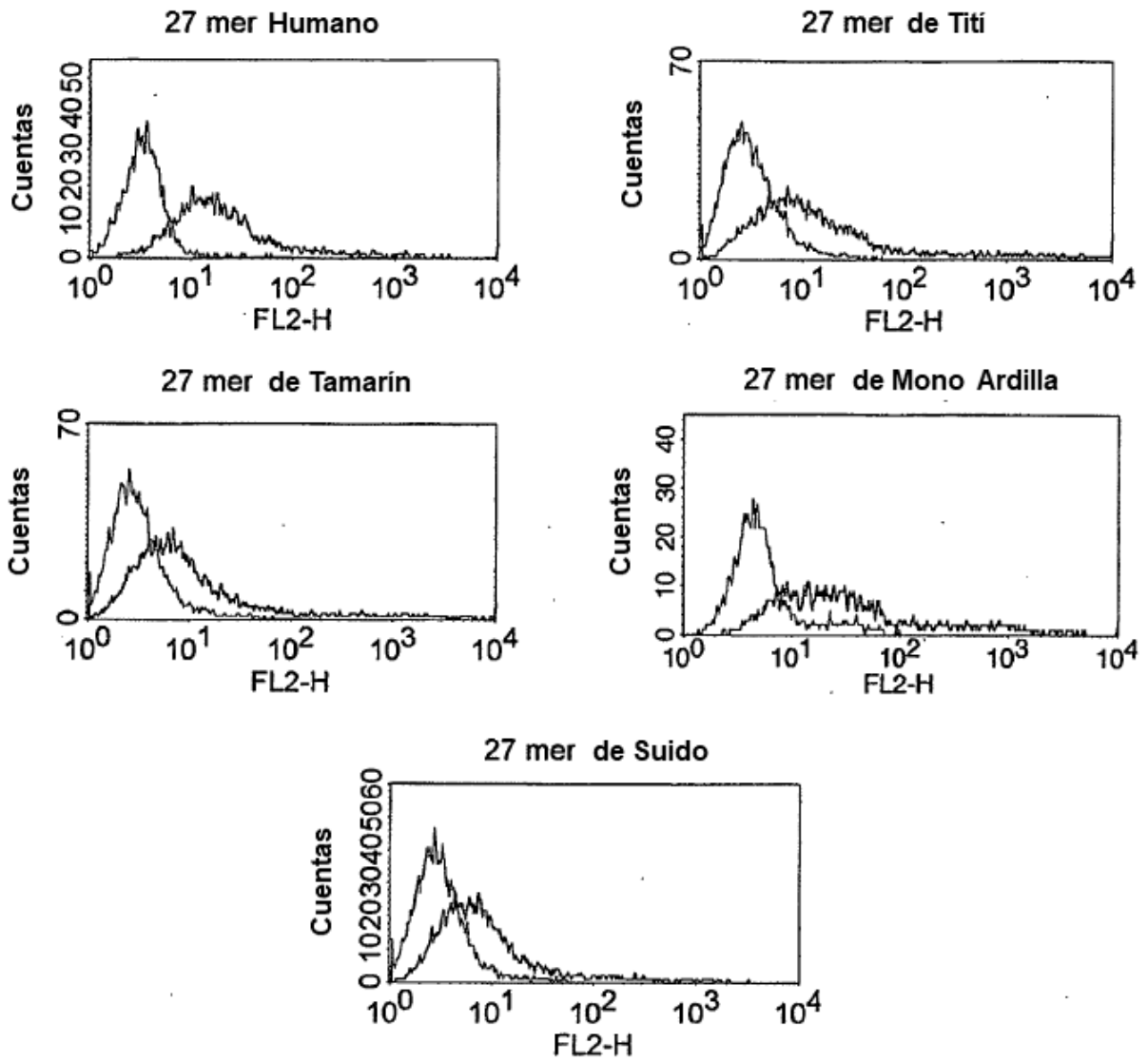


Figura 6A

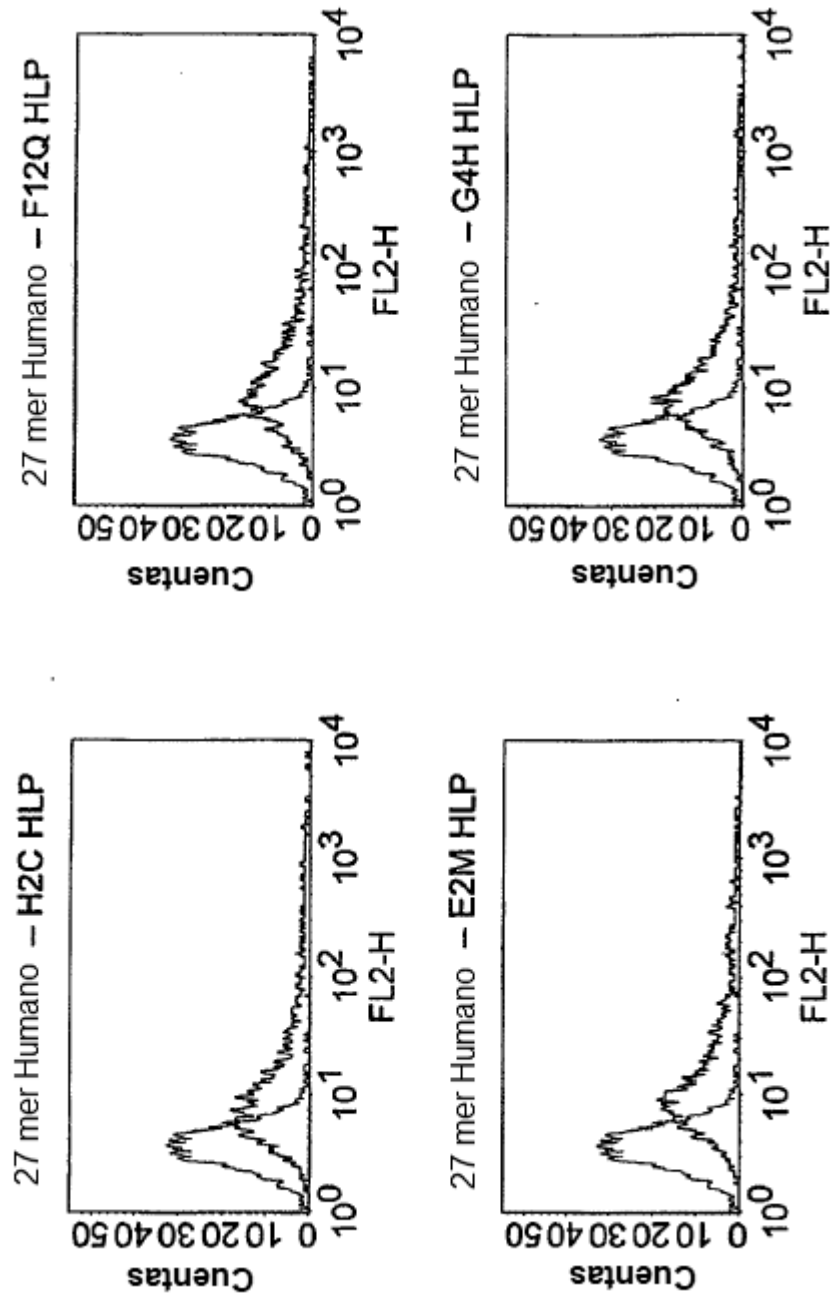


Figura 6B

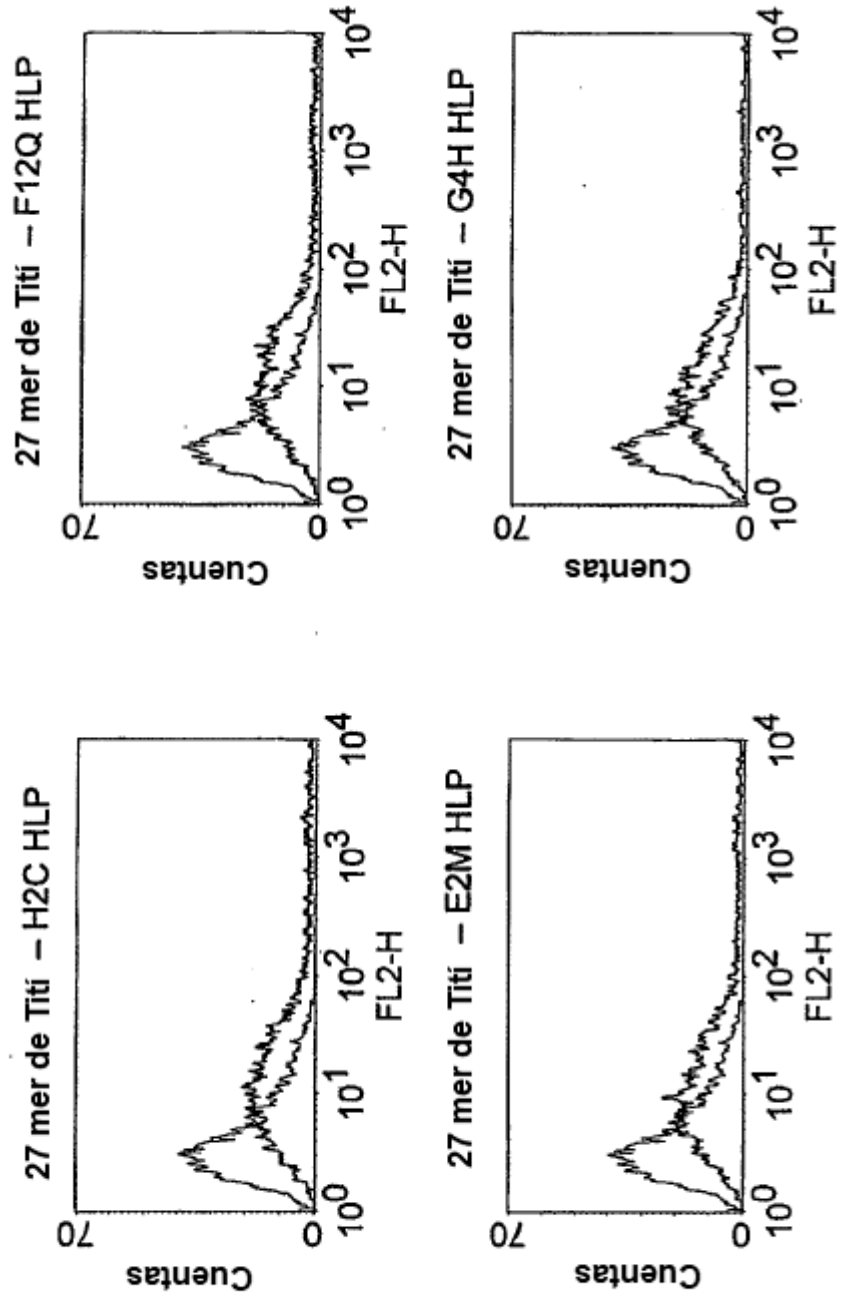


Figura 6C

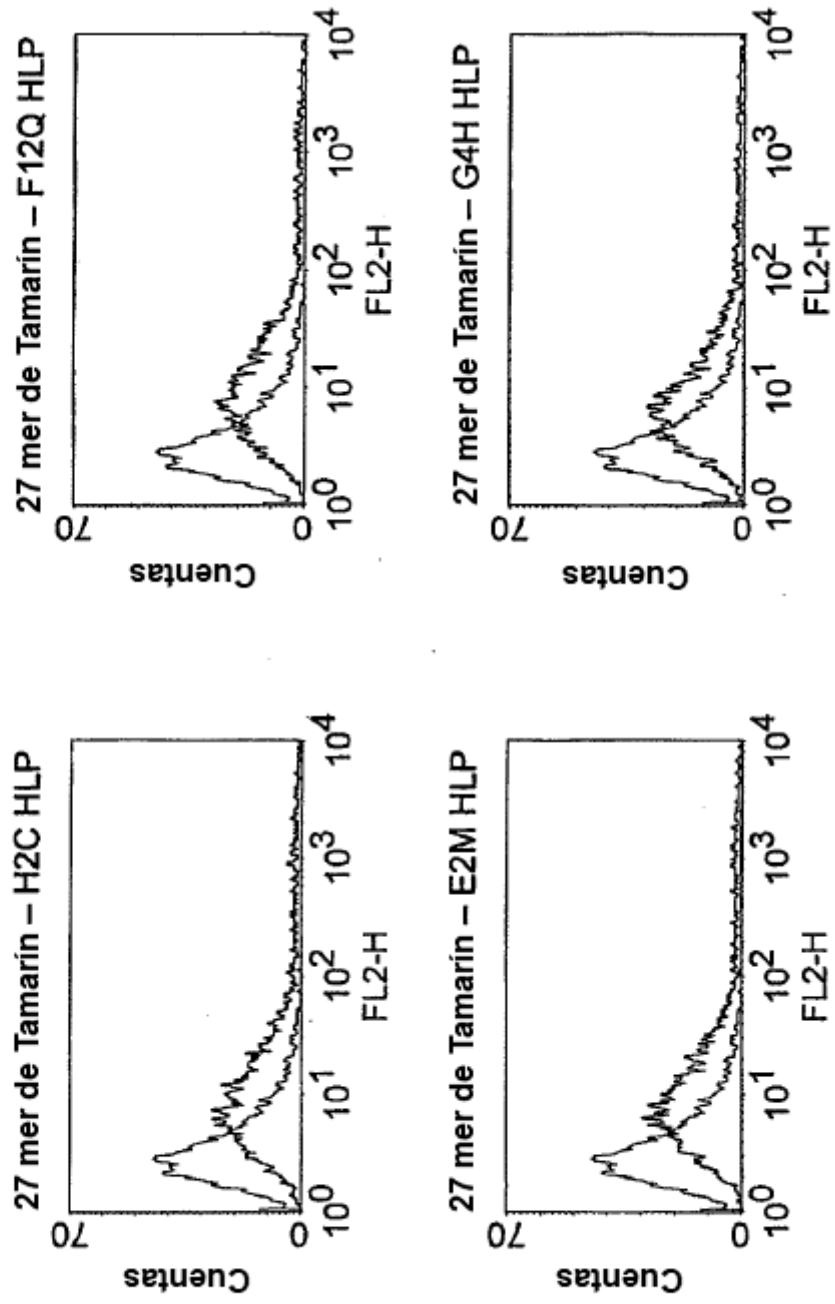


Figura 6D

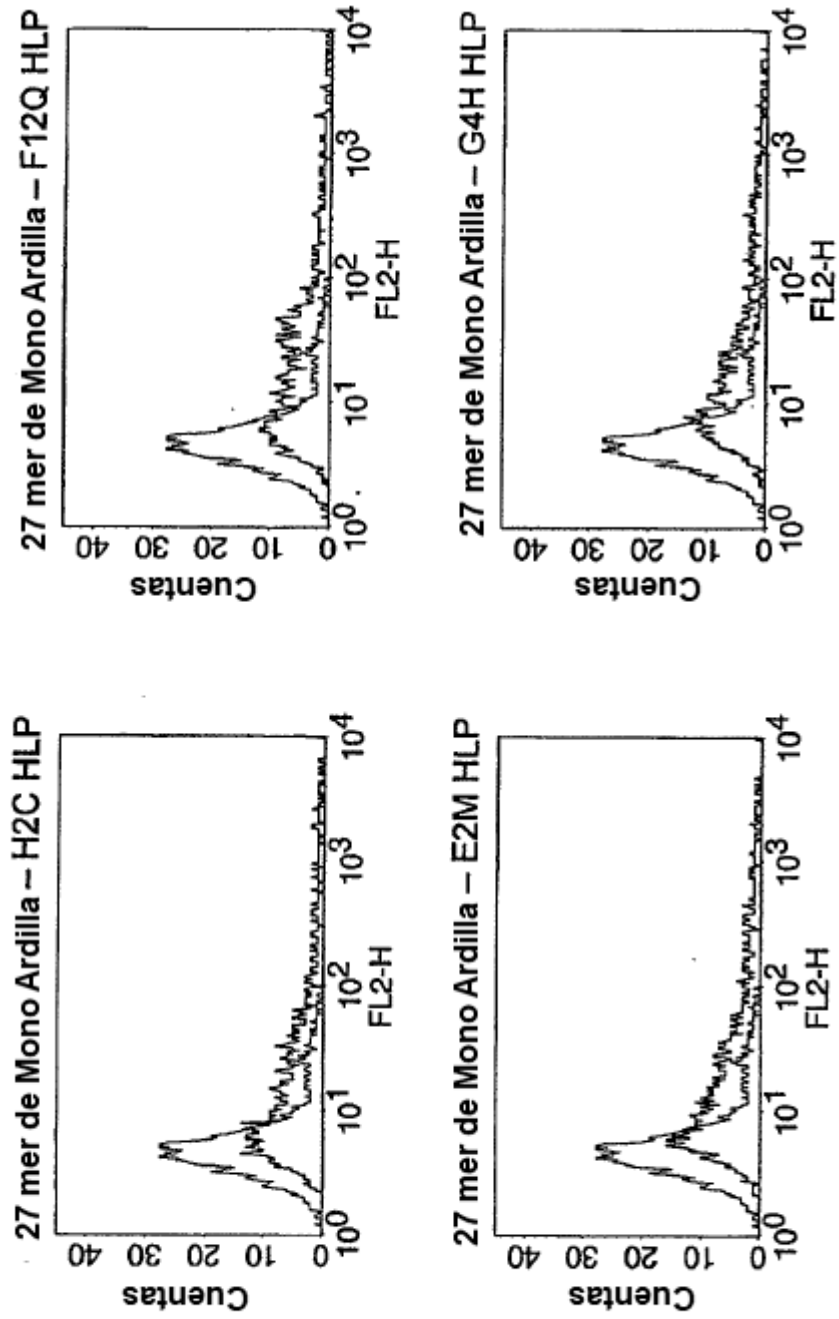


Figura 6E

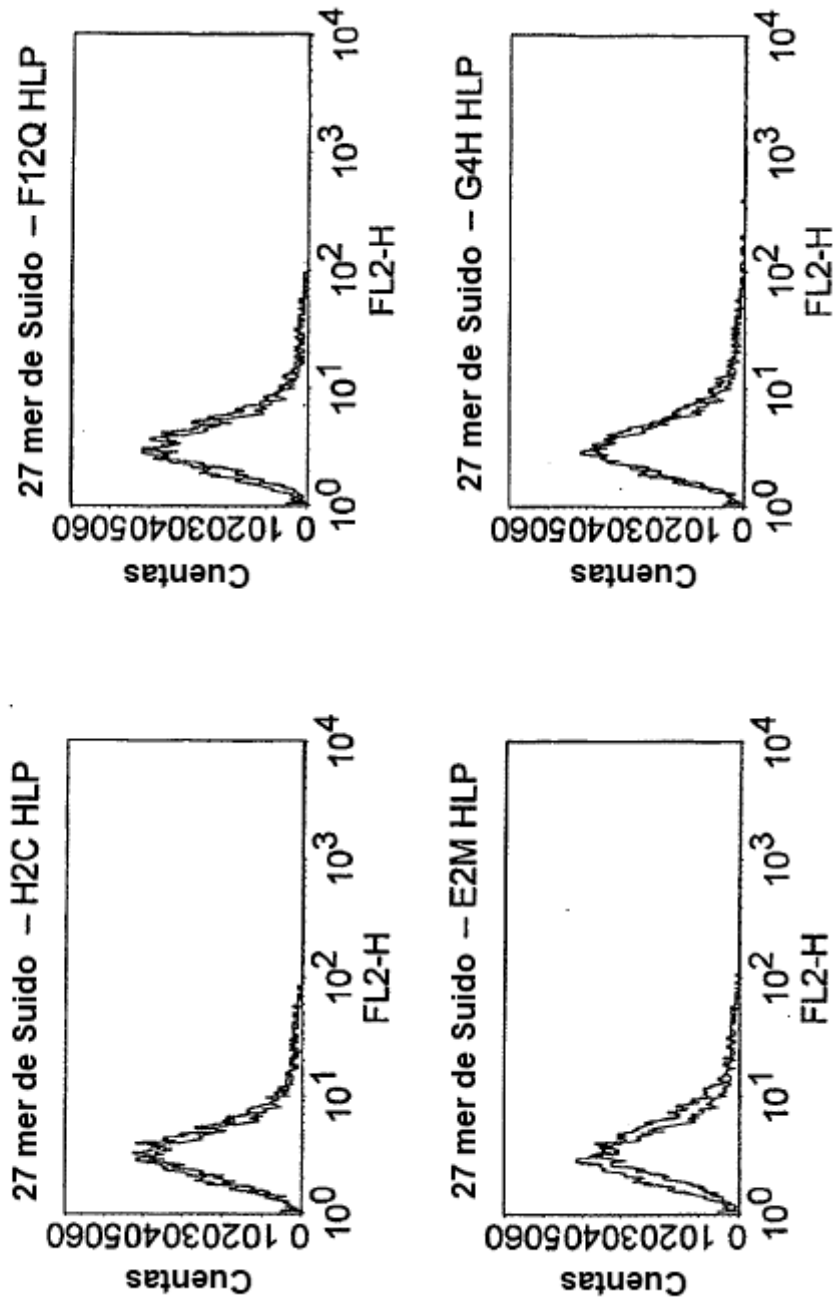
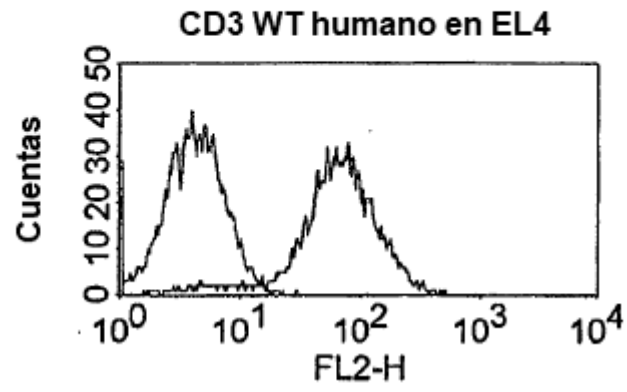
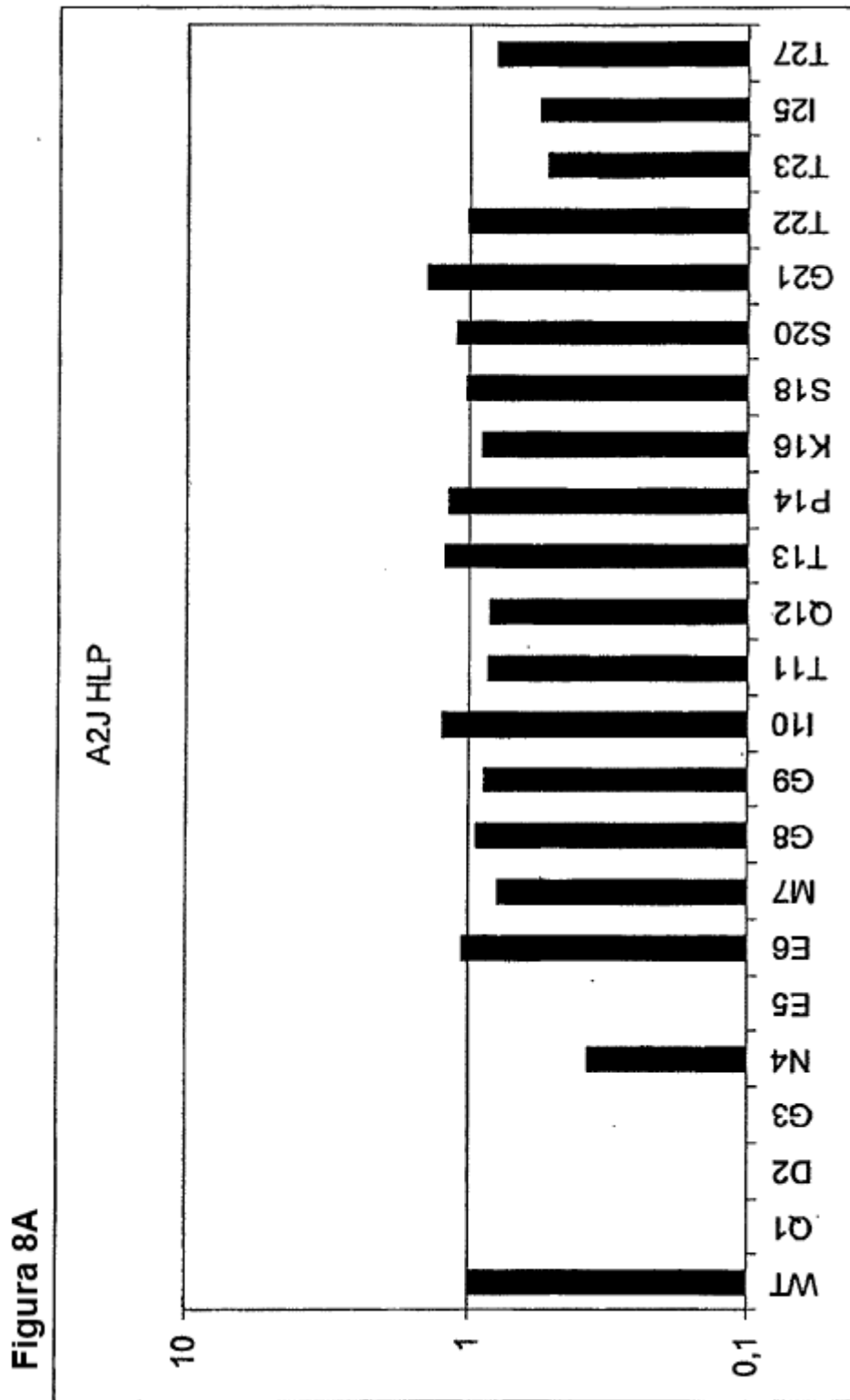
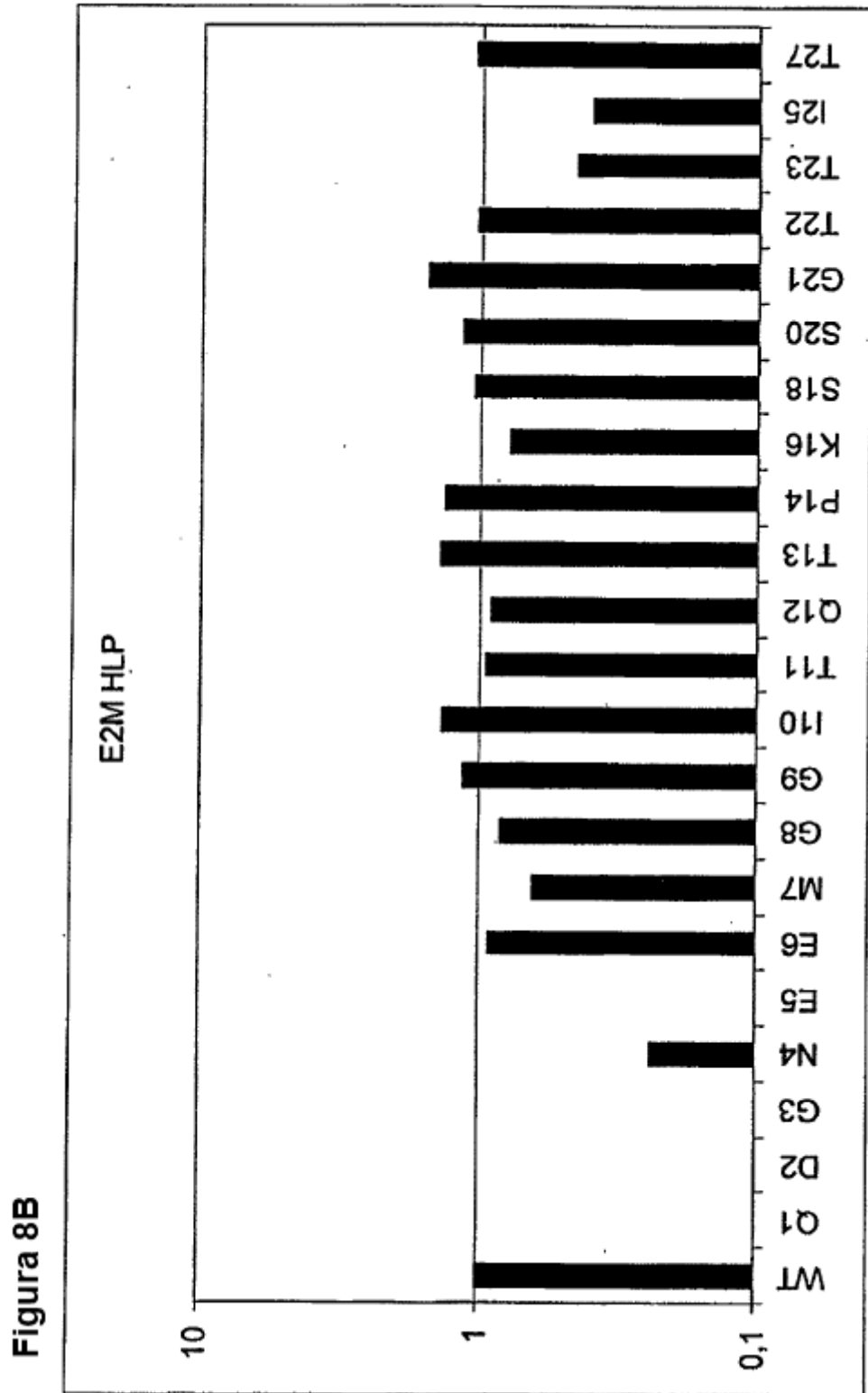
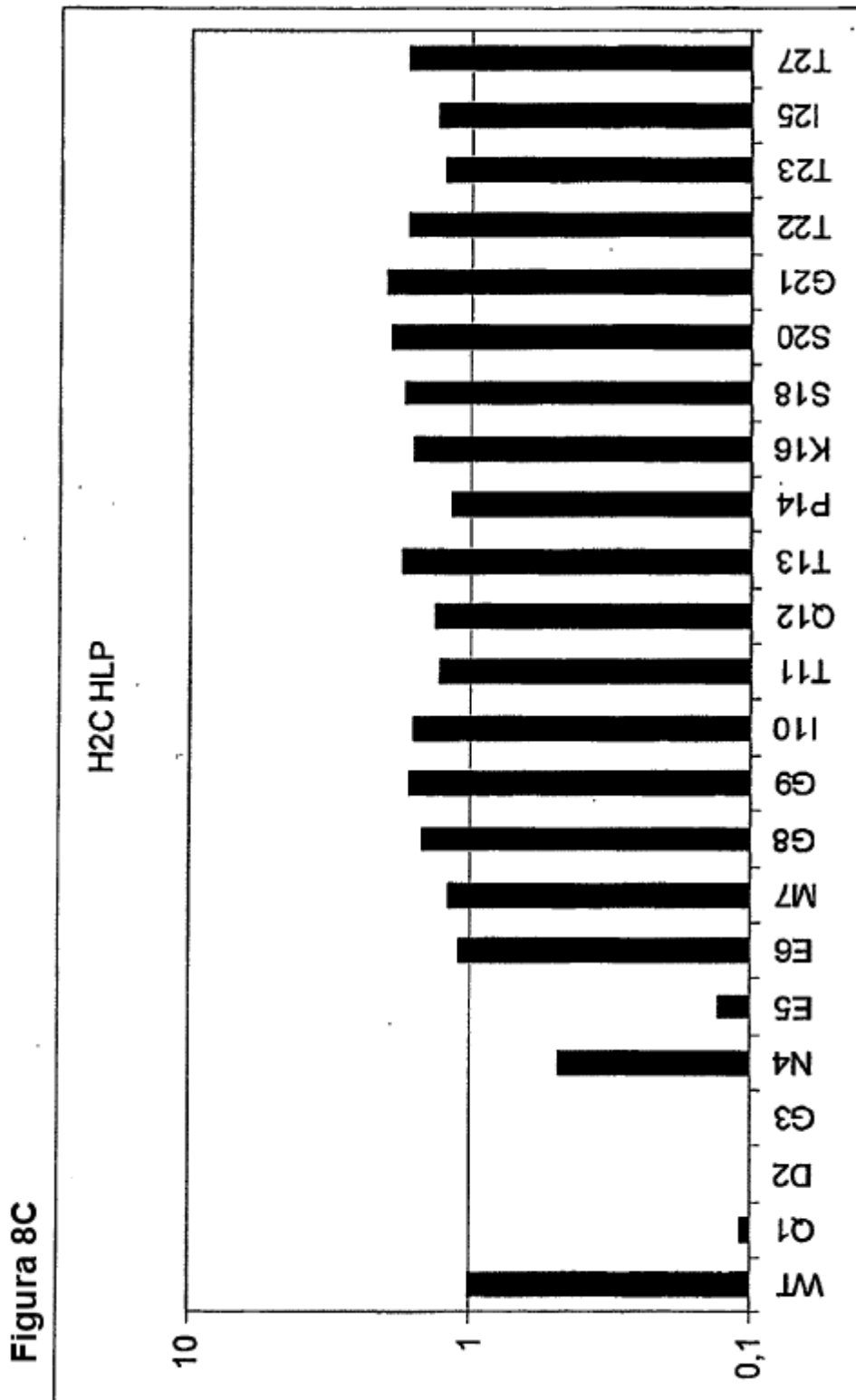


Figura 7









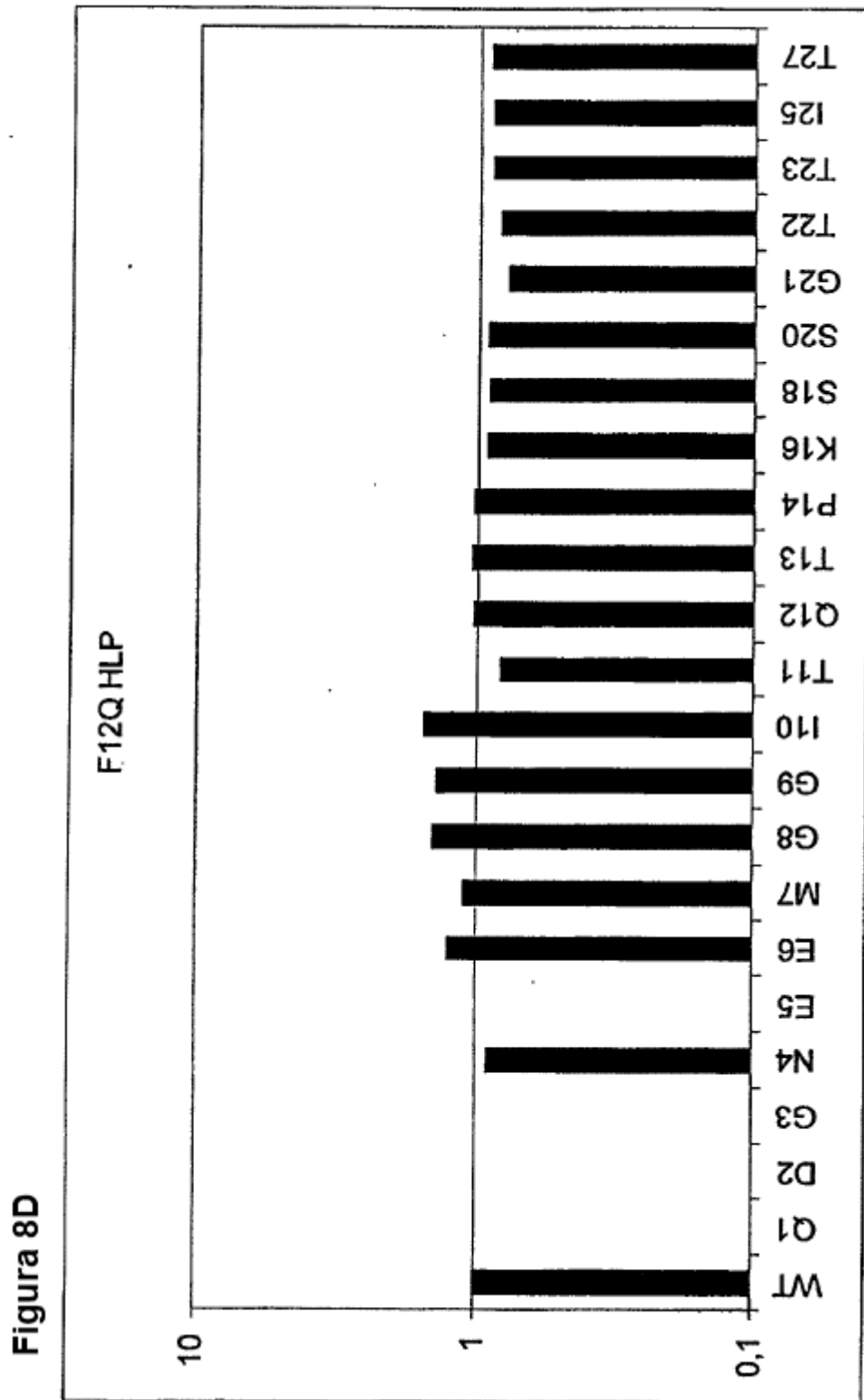


Figura 9



Figura 10

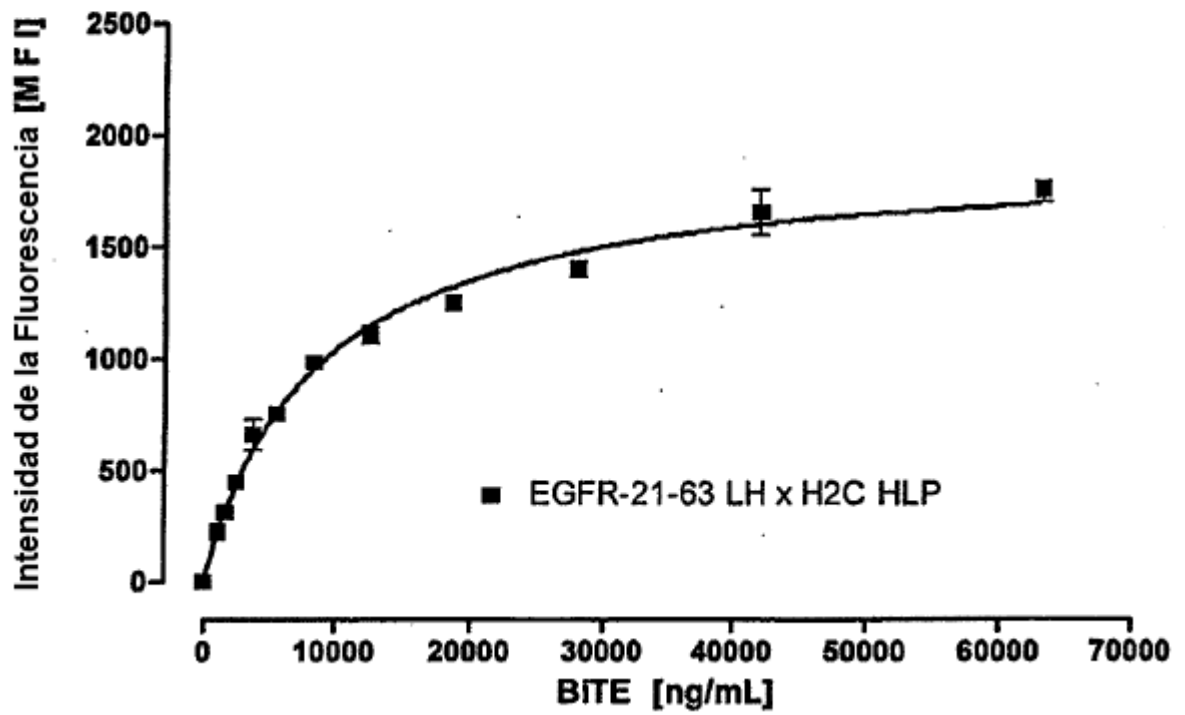


Figura 11a

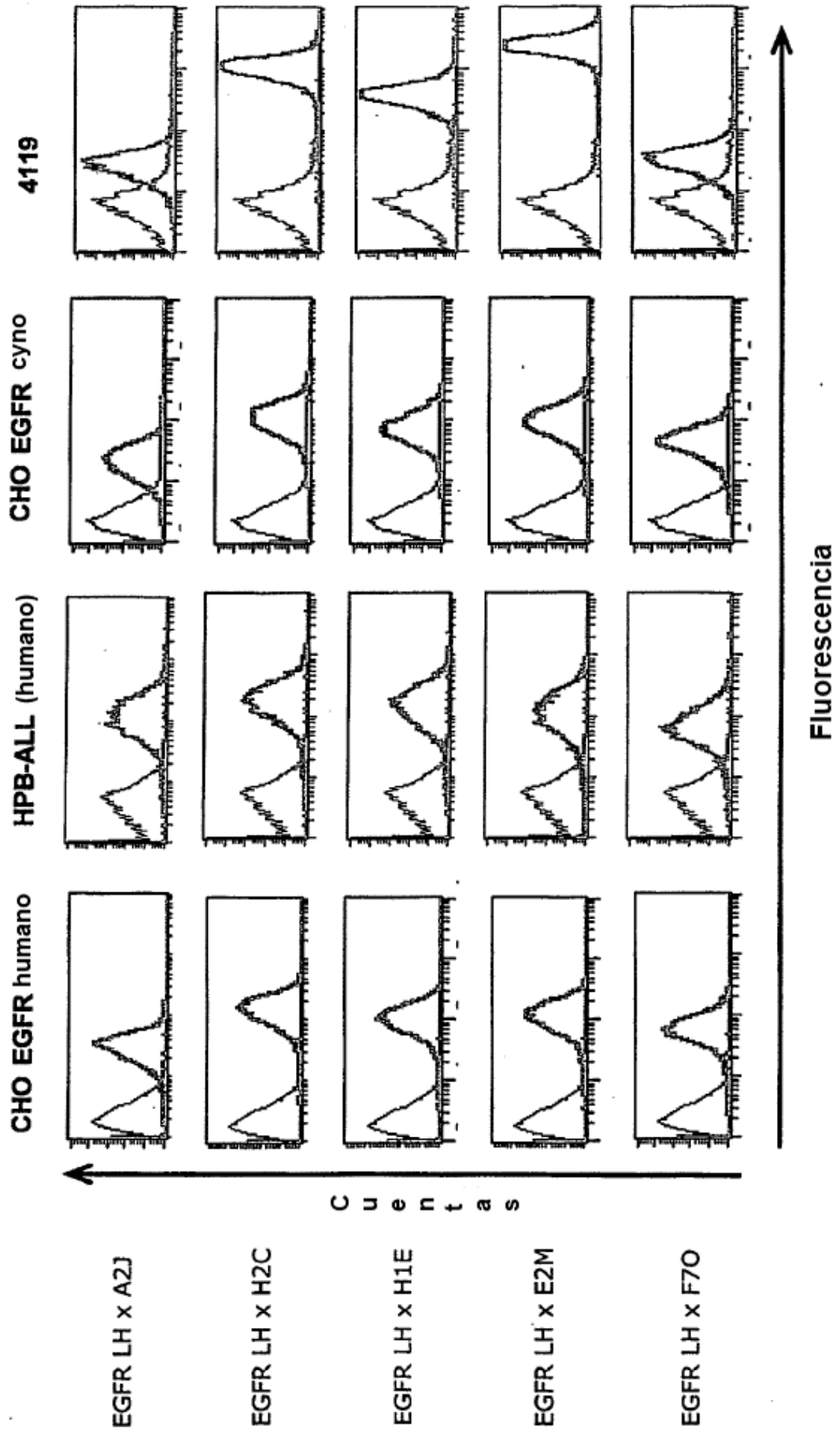


Figura: 11b

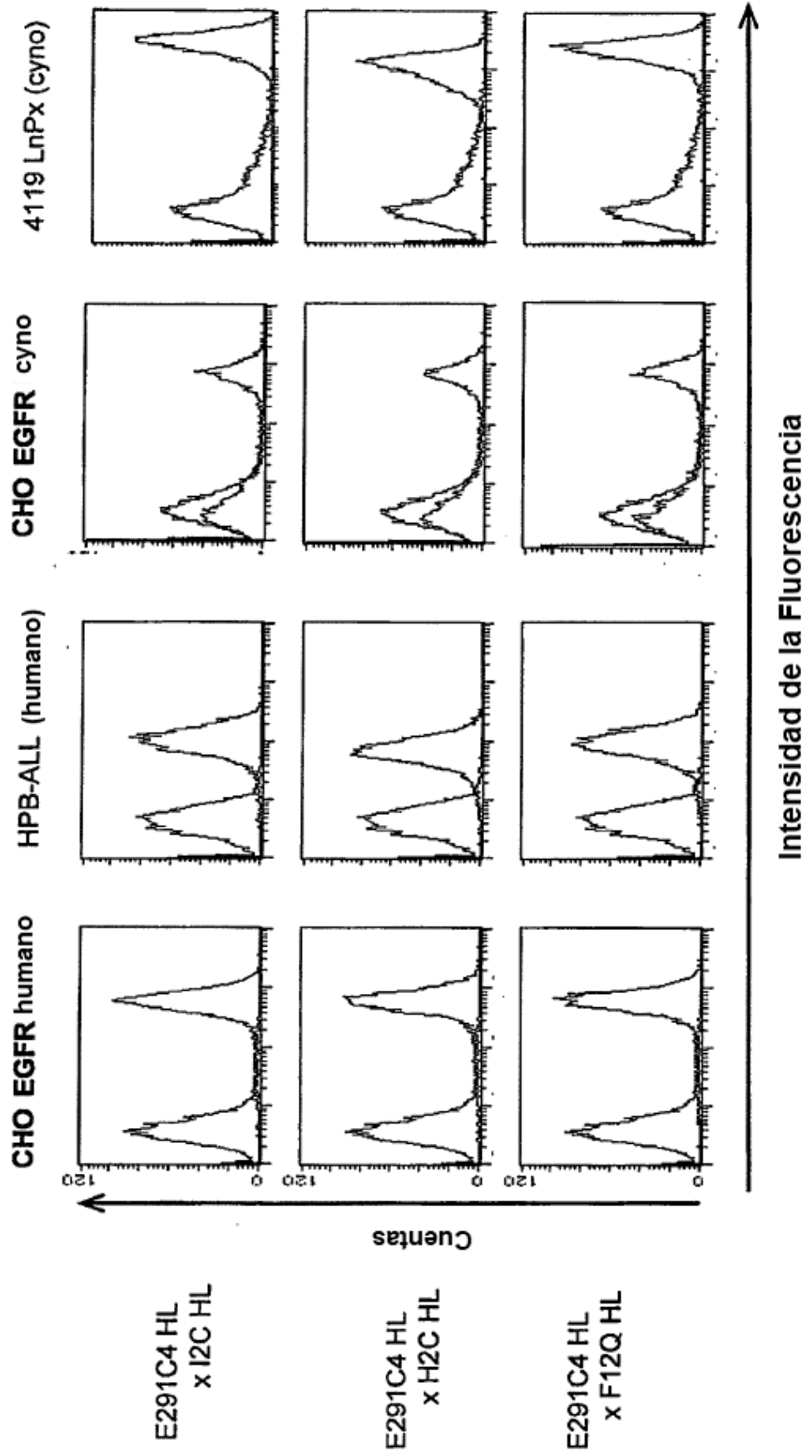


Figura: 11c

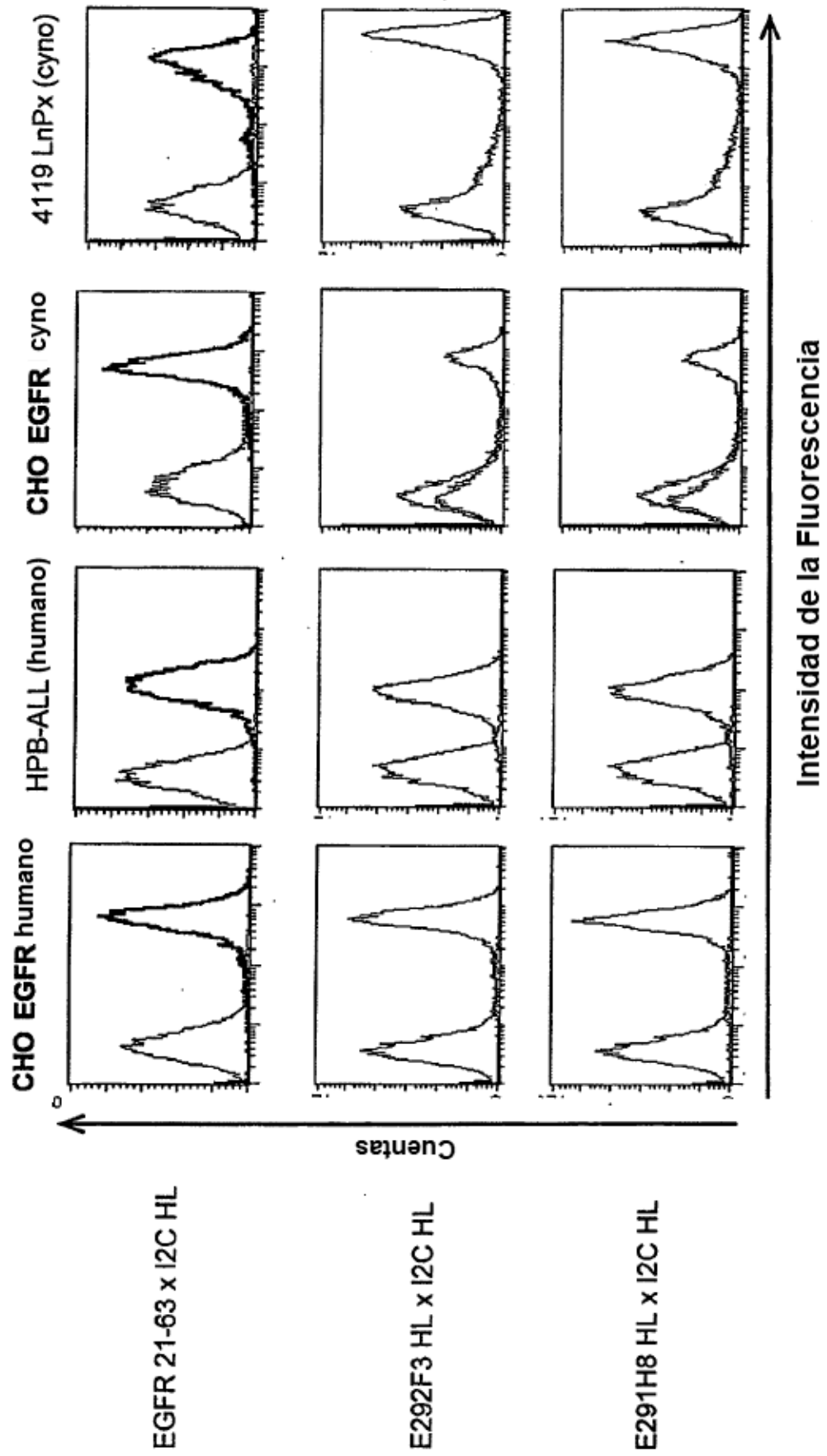


Figura: 11d

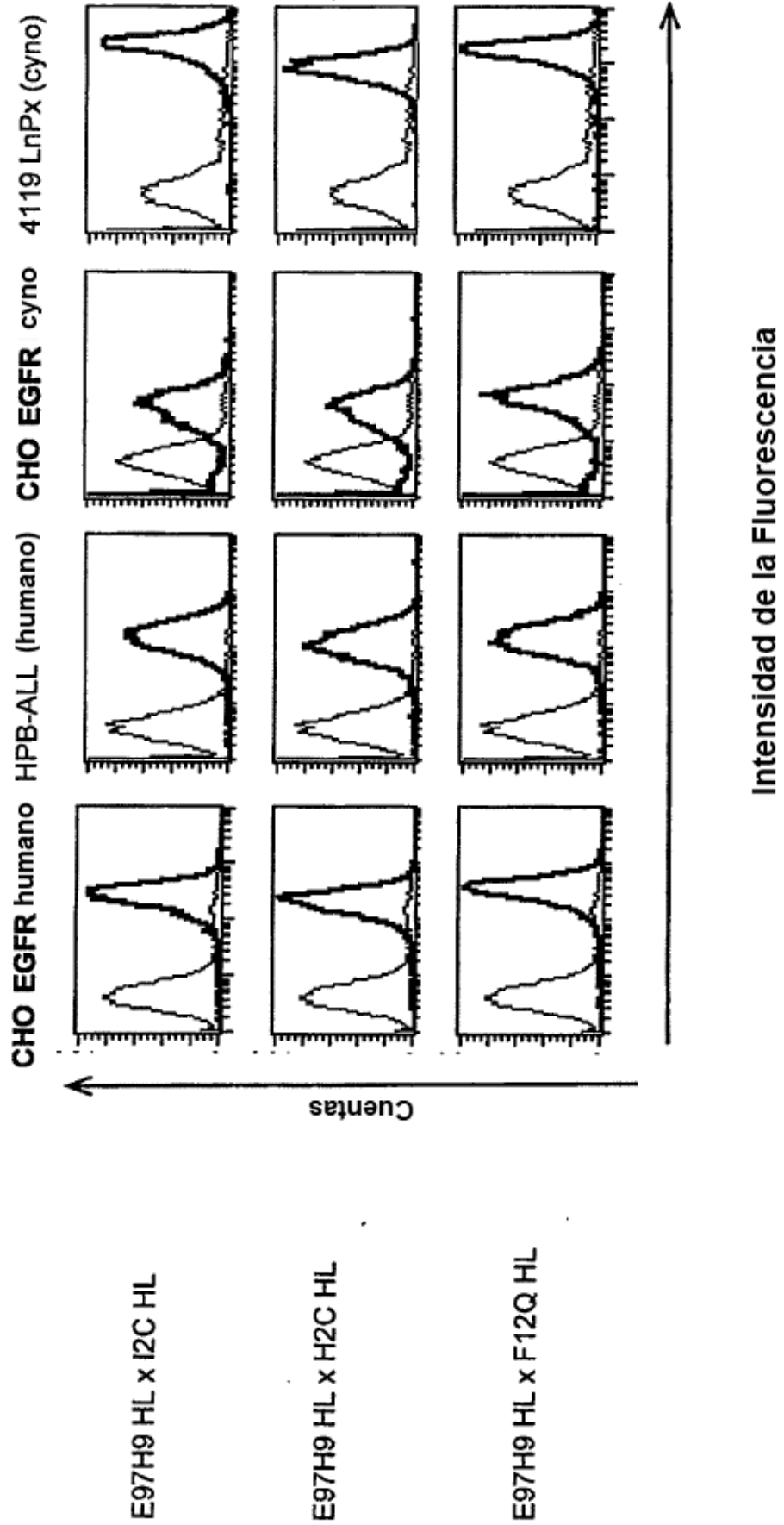


Figura: 11e

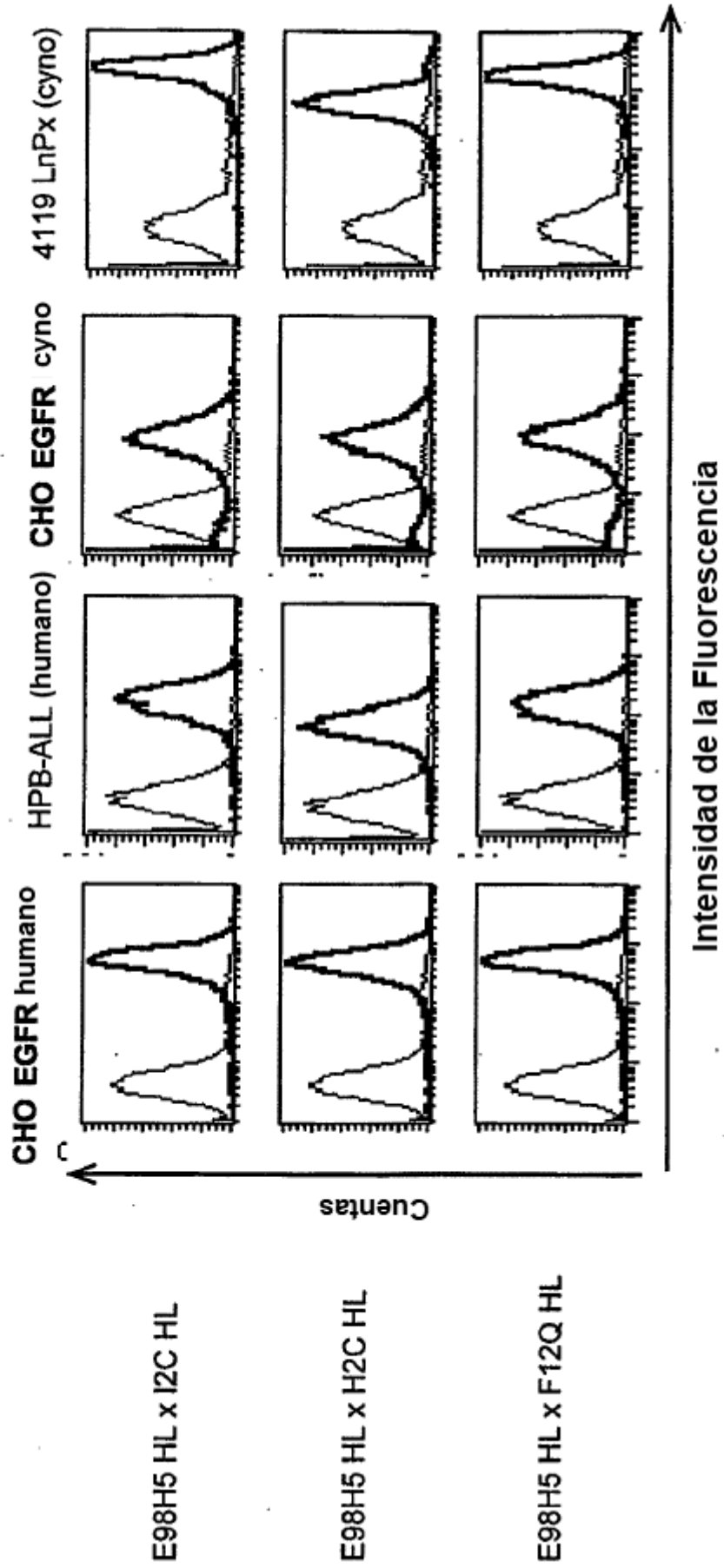


Figura: 11f

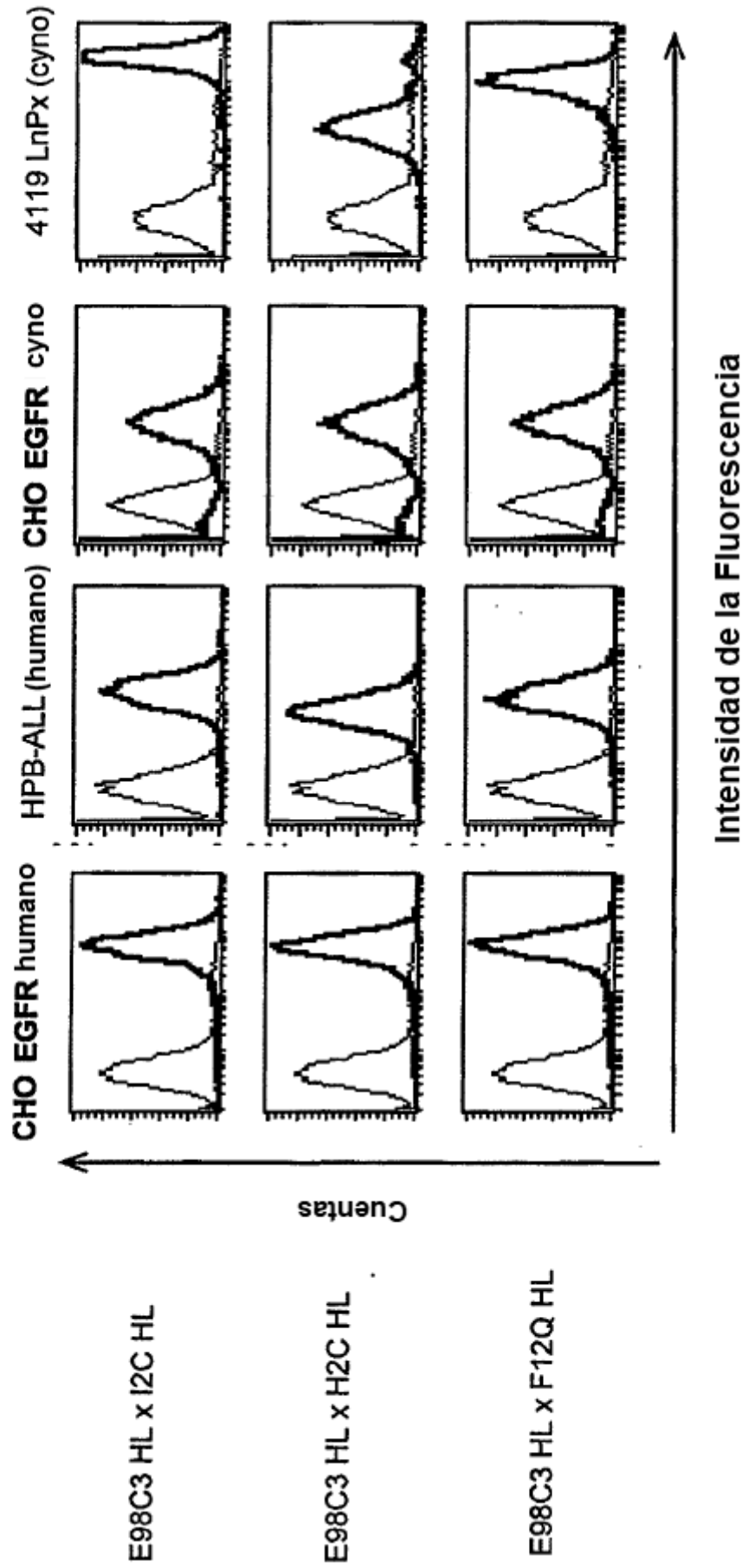


Figura: 11g

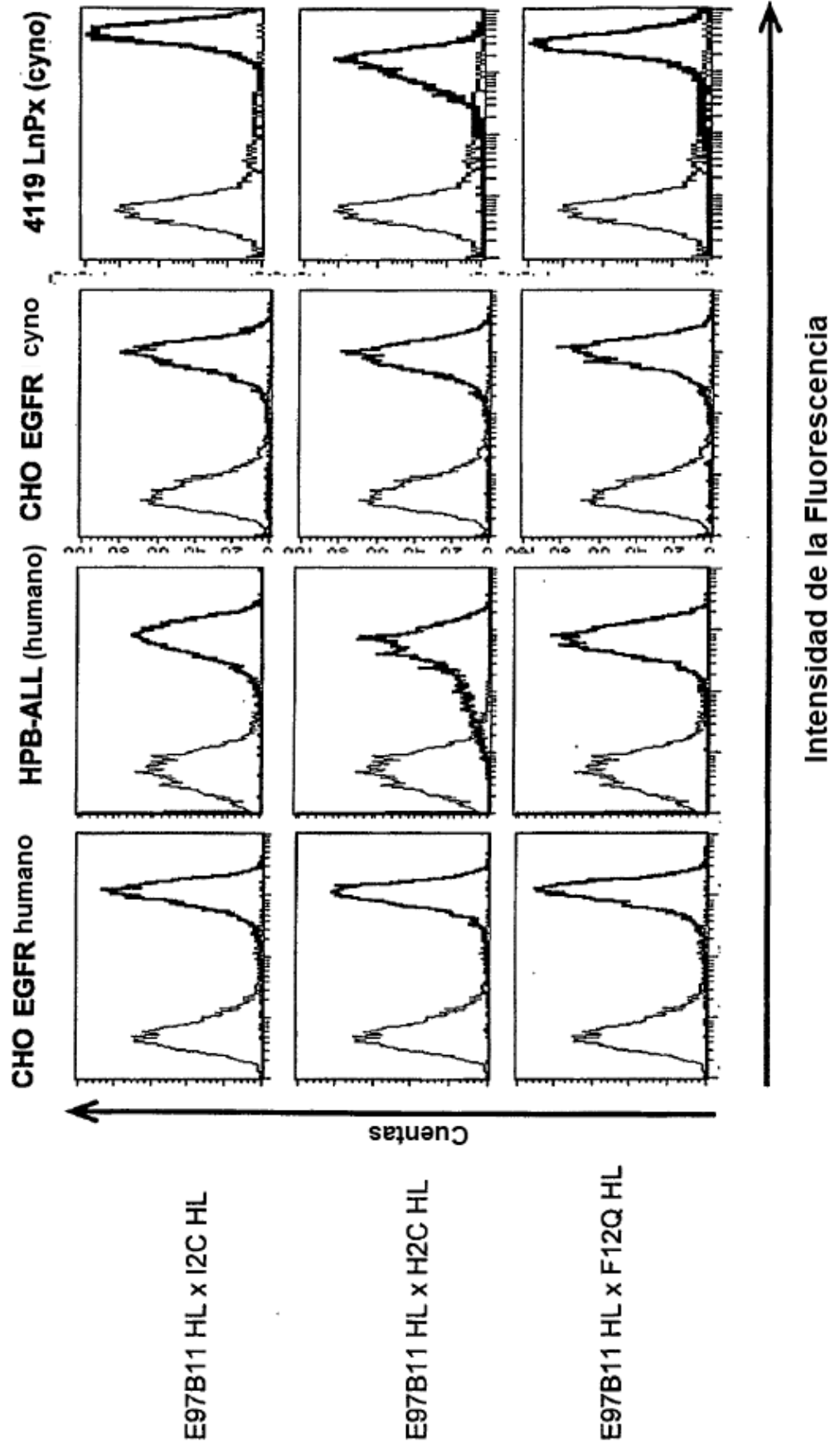


Figura: 11h

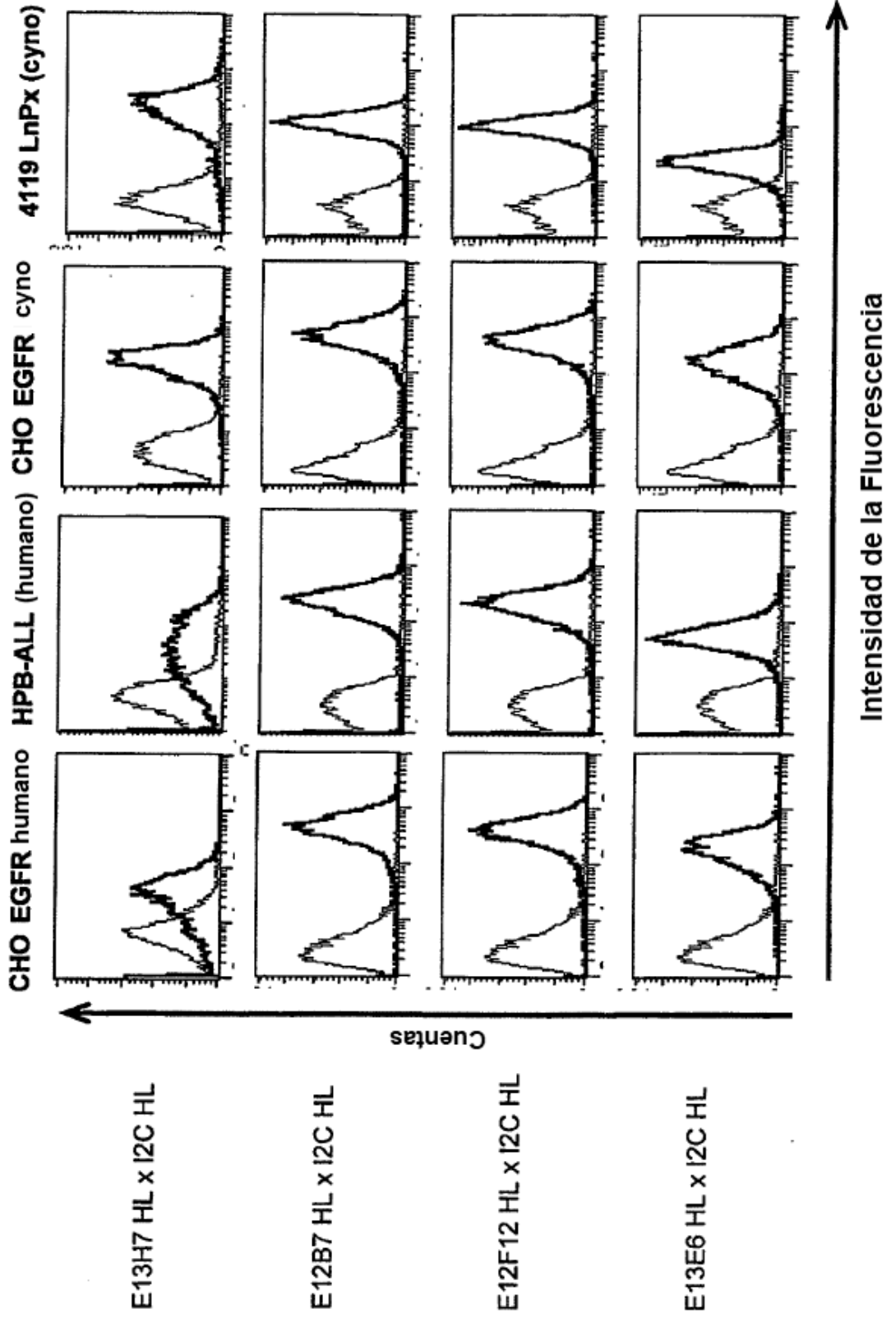


Figura: 11i

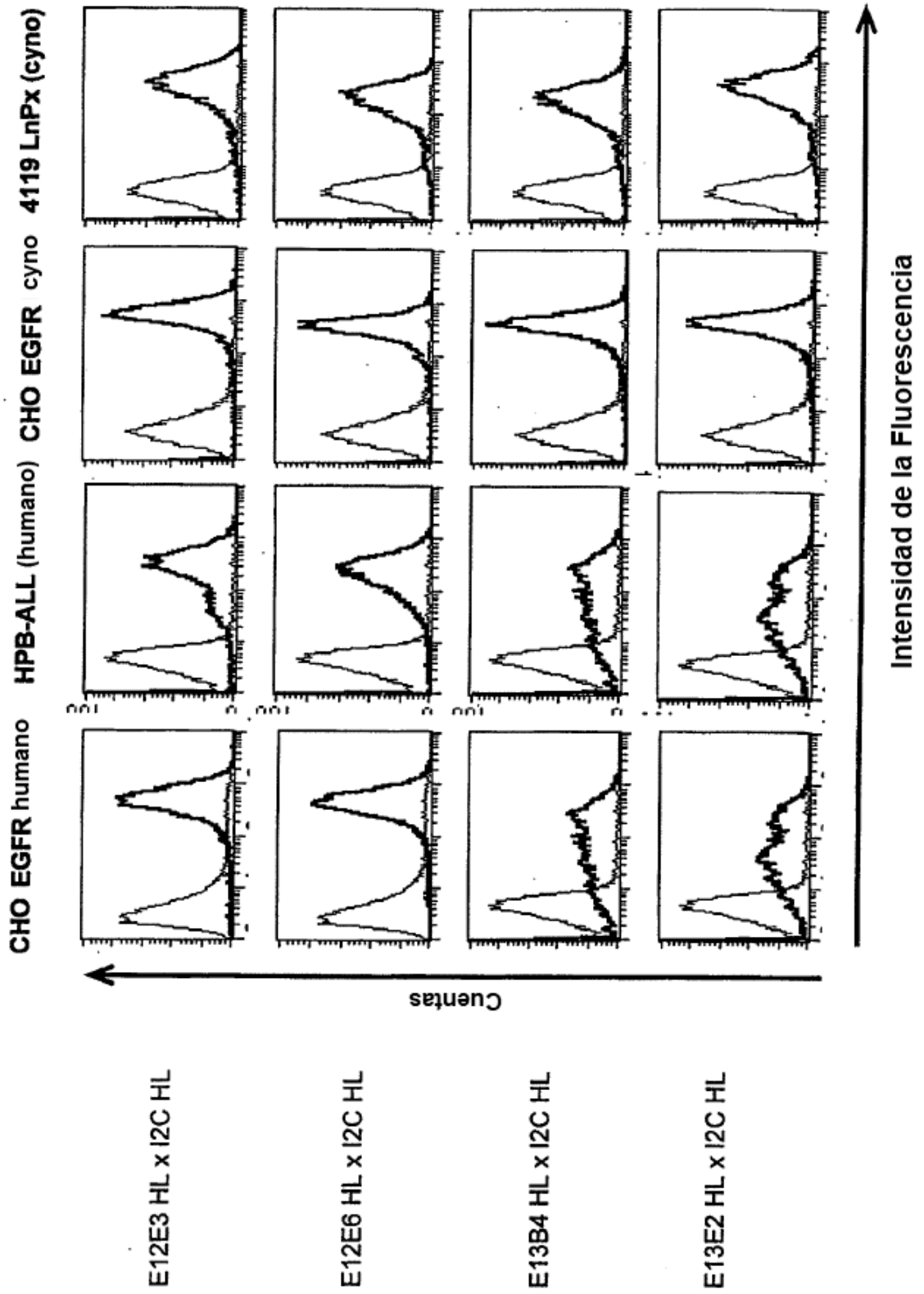
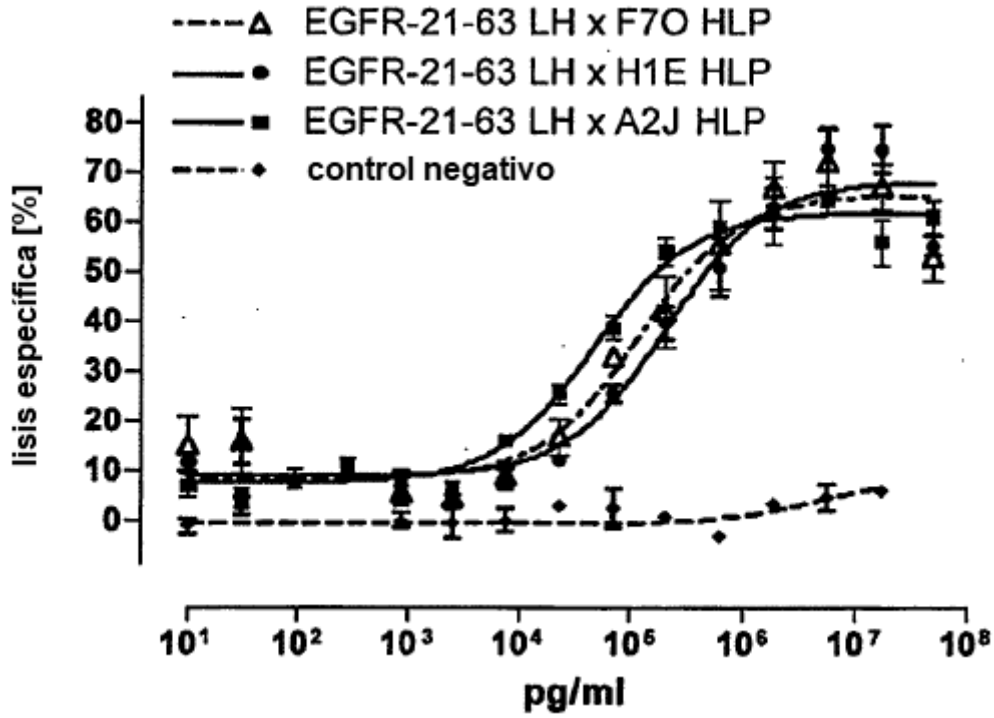


Figura 12

A)

Células efectoras: PBMC humanas deplecionadas de CD4/CD56 estimuladas

Células diana: CHO transfectadas con EGFR humano



B)

Células efectoras: PBMC humanas deplecionadas de CD4/CD56 estimuladas

Células diana: CHO transfectadas con EGFR humano

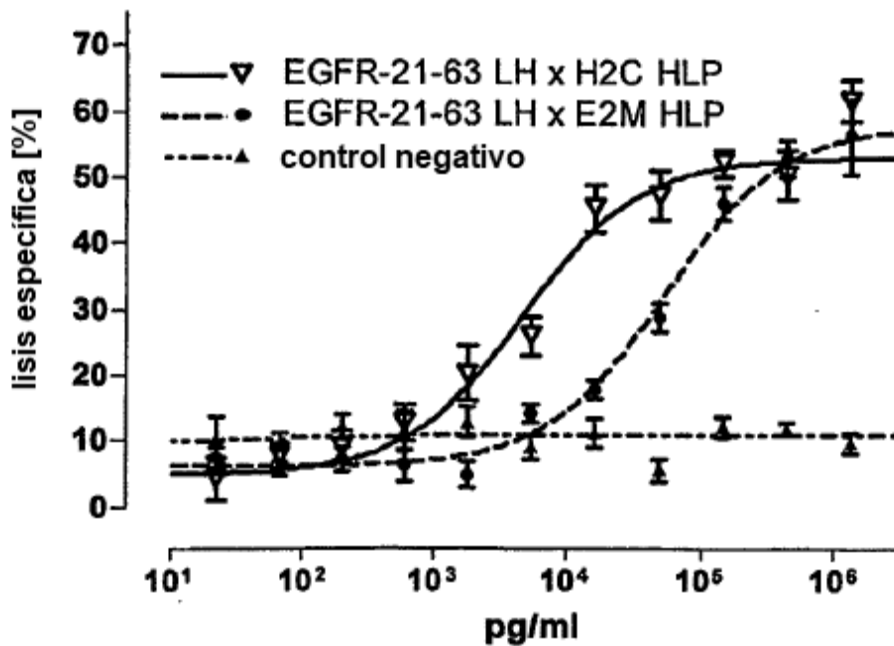
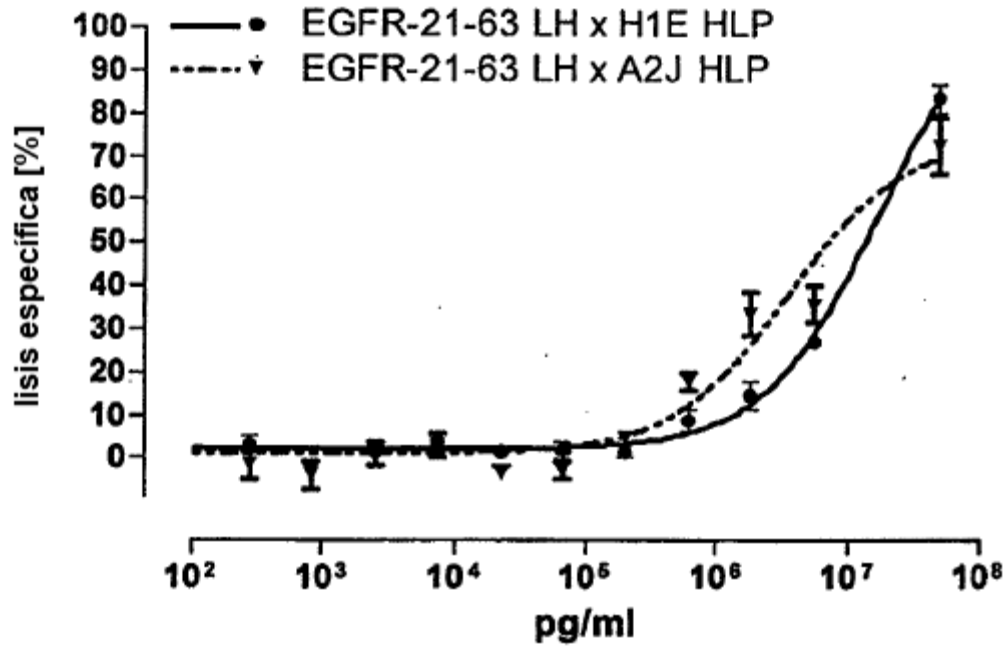


Figura 13 a

A)

Células efectoras: línea de células T de macaco 4119 LnPx

Células diana: CHO transfectadas con EGFR de cynomolgus



B)

Células efectoras: línea de células T de macaco 4119 LnPx

Células diana: CHO transfectadas con EGFR de cynomolgus

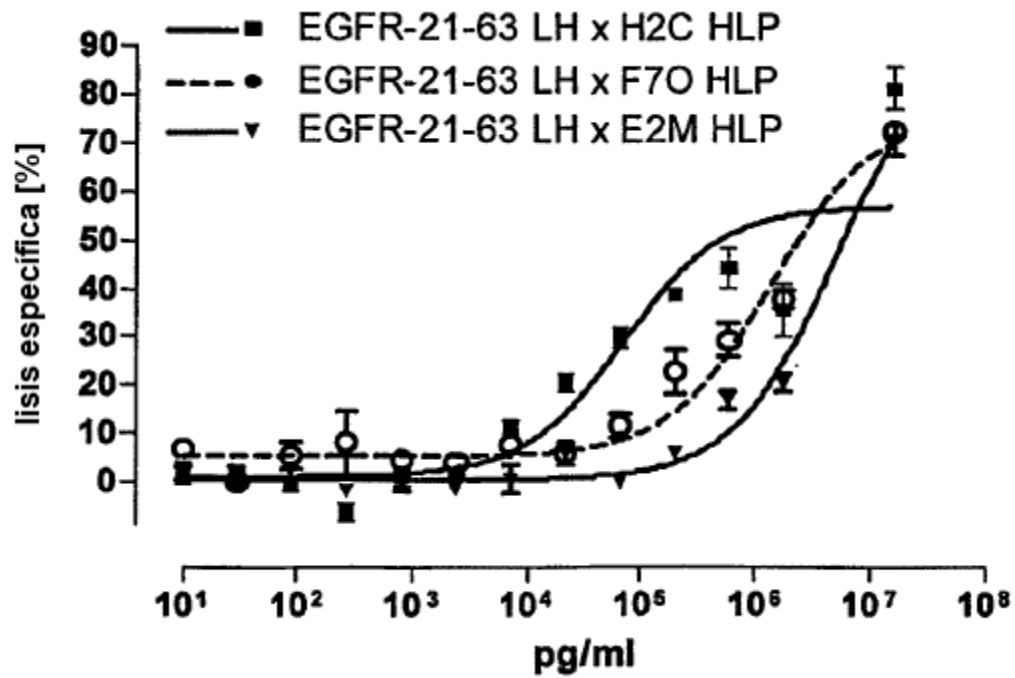
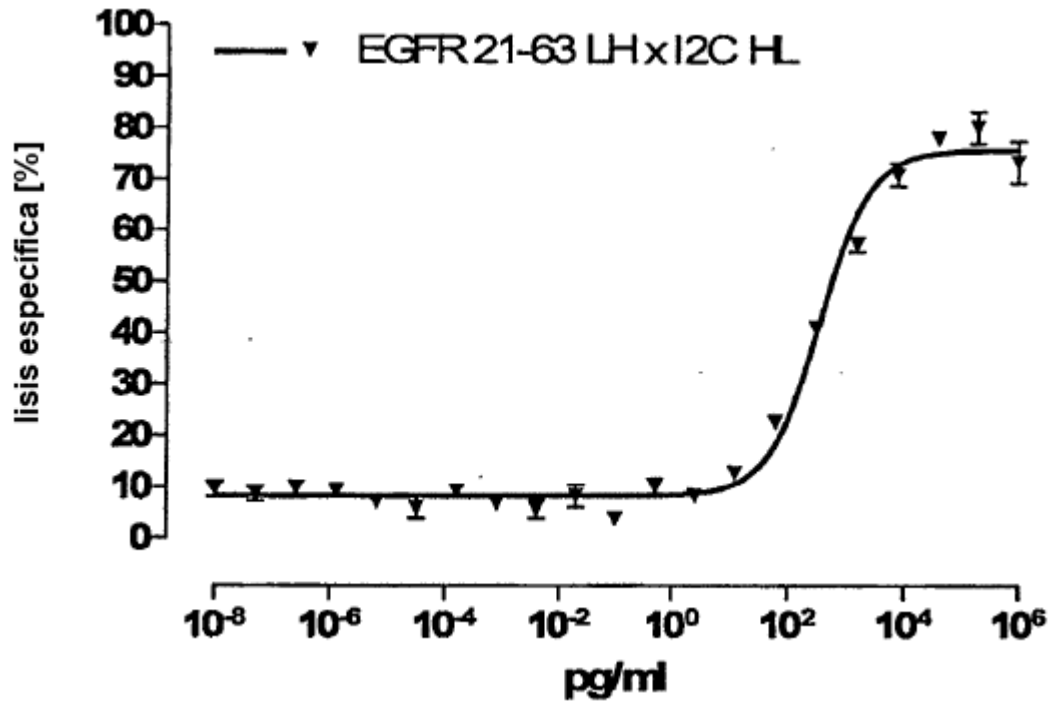


Figura 13b

A)

Células efectoras: PBMC humanas deplecionadas de CD4/CD56 estimuladas

Células diana: CHO transfectadas con EGFR humano



B)

Células efectoras: 4119 LnPx

Células diana: CHO transfectadas con EGFR de cyno

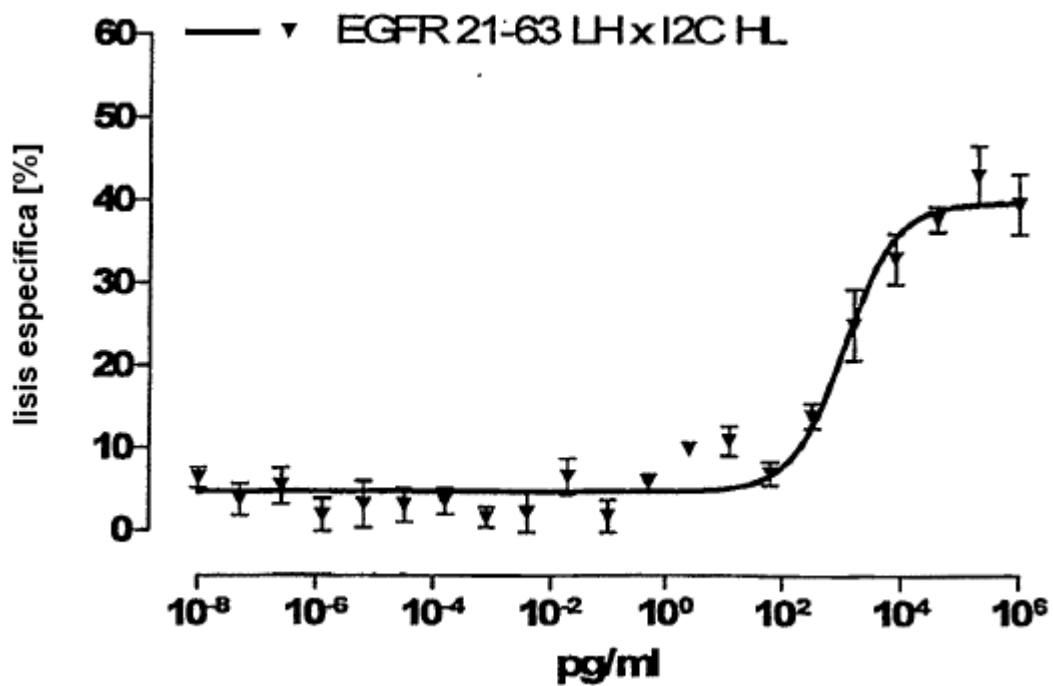
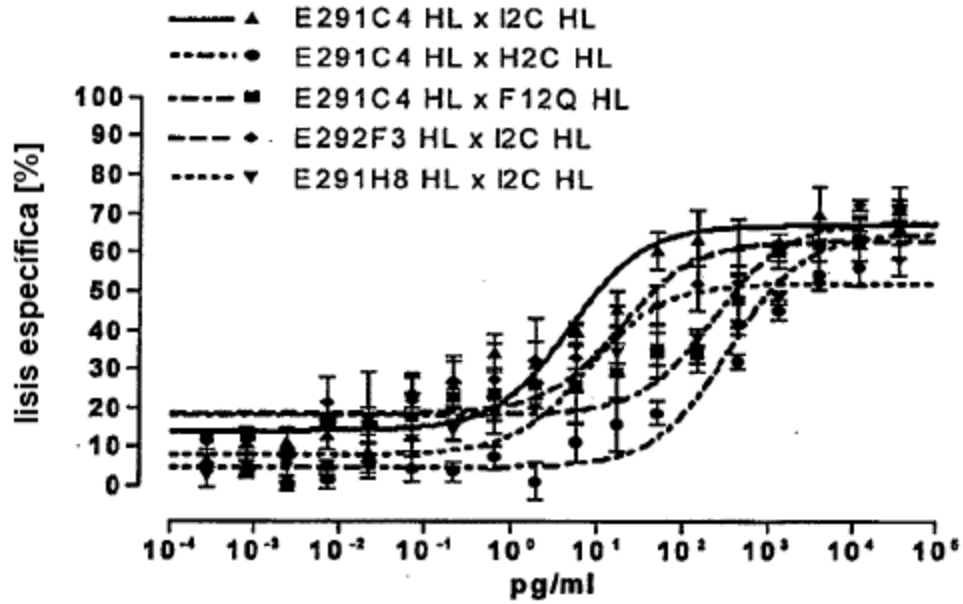


Figura 13c

A)

Células efectoras: PBMC humanas deplecionadas de CD4/CD56 estimuladas

Células diana: CHO transfectadas con EGFR humano



B)

Células efectoras: 4119 LnPx

Células diana: CHO transfectadas con EGFR de cyno

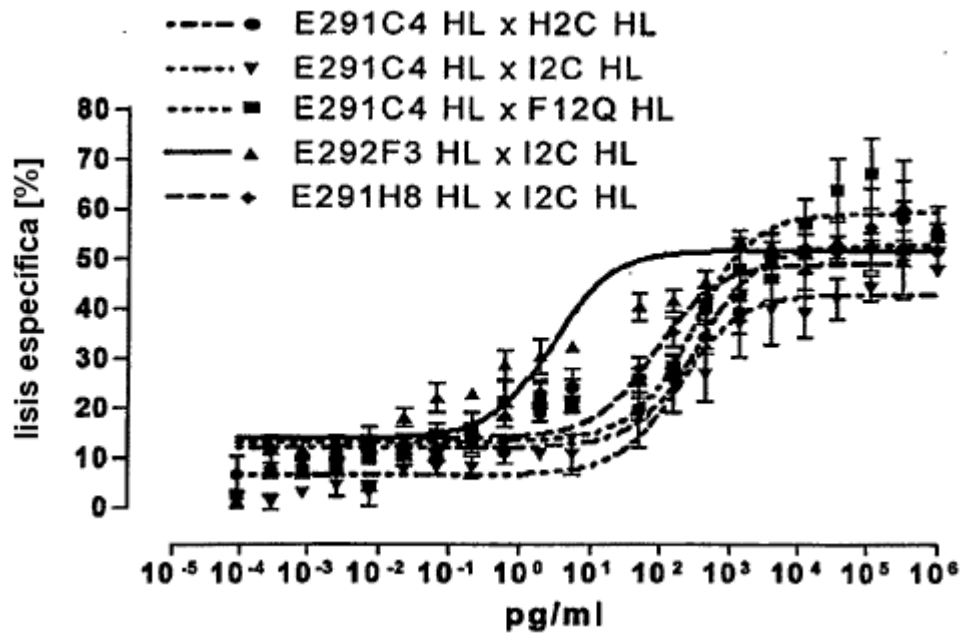
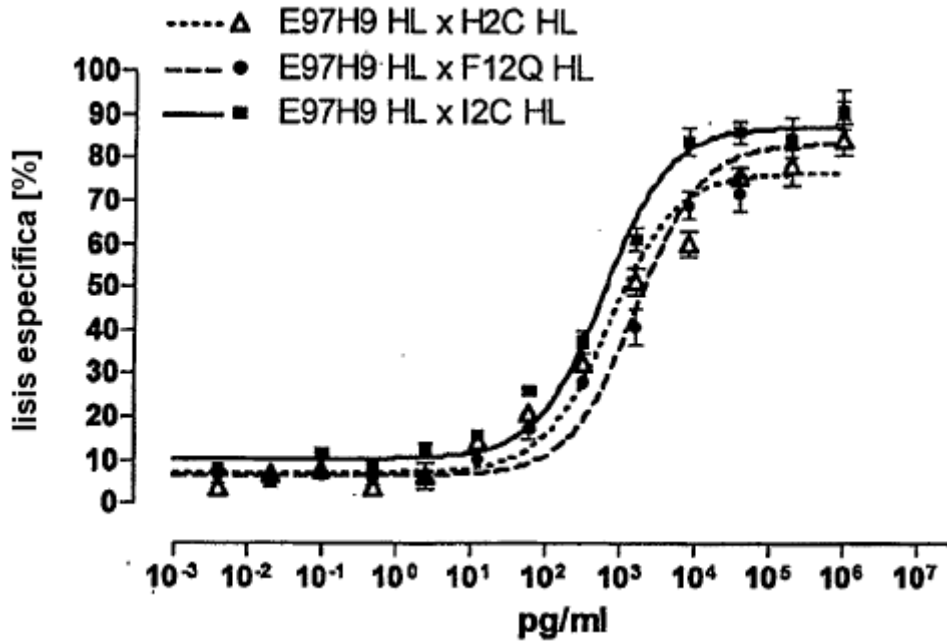


Figura 13d

A)

Células efectoras: PBMC humanas deplecionadas de CD4/CD56 estimuladas

Células diana: CHO transfectadas con EGFR humano



B)

Células efectoras: 4119 LnPx

Células diana: CHO transfectadas con EGFR de cyno

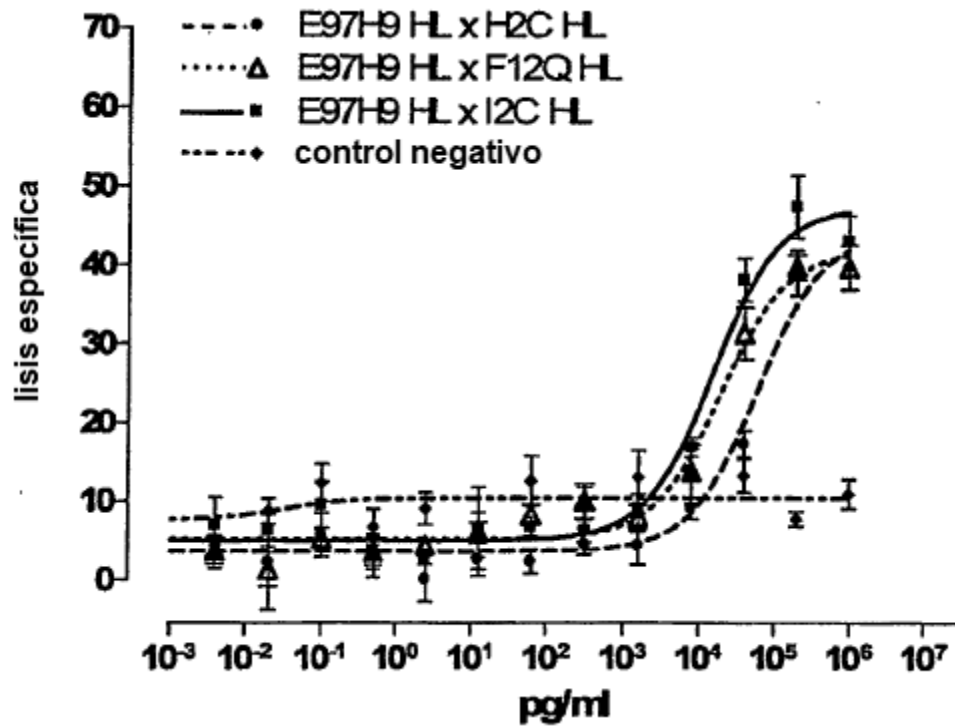
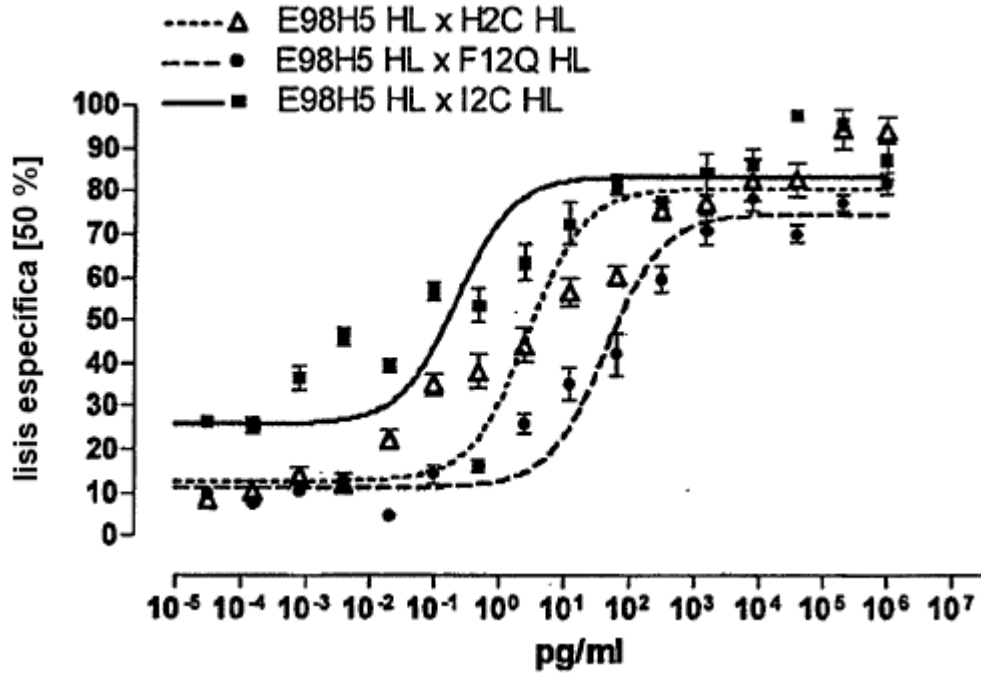


Figura 13e

A)

Células efectoras: PBMC humanas deplecionadas de CD4/CD56 estimuladas

Células diana: CHO transfectadas con EGFR humano



B)

Células efectoras: 4119 LnPx

Células diana: CHO transfectadas con EGFR de cyno

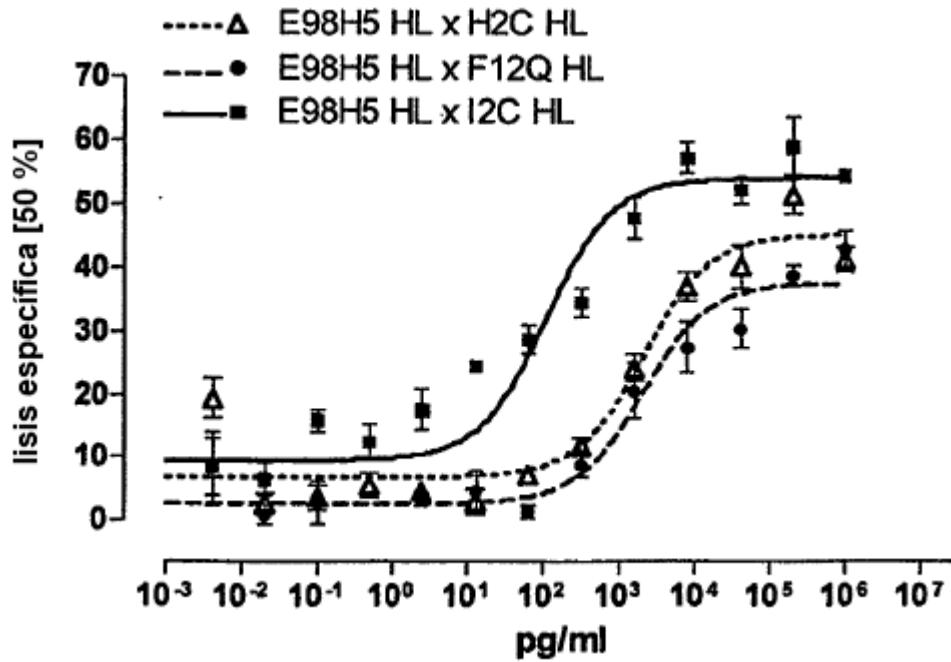
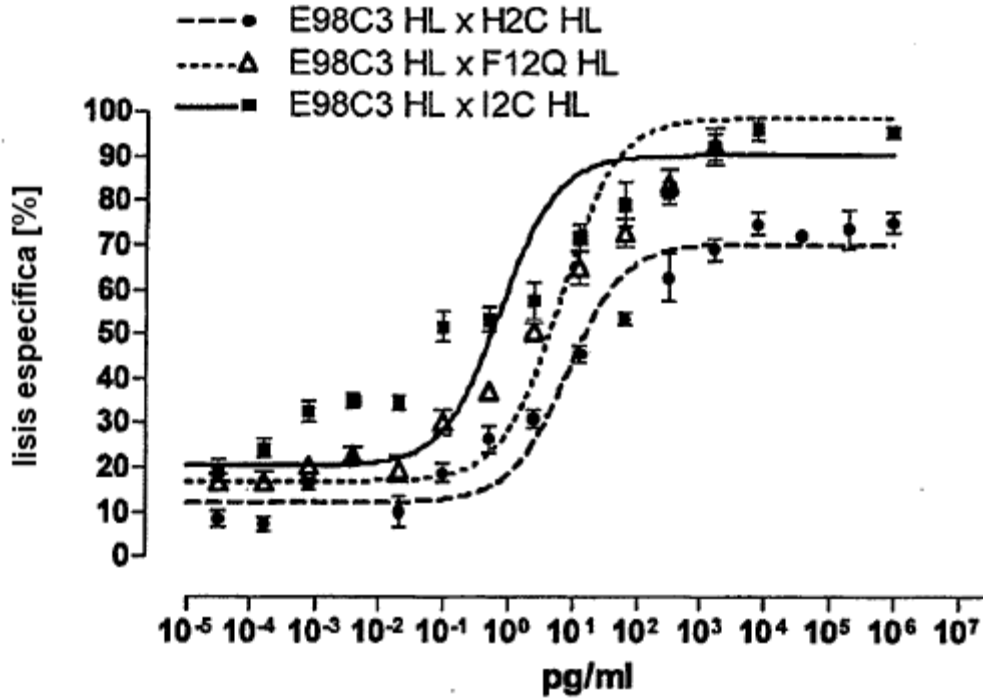


Figura 13f

A)

Células efectoras: PBMC humanas deplecionadas de CD4/CD56 estimuladas

Células diana: CHO transfectadas con EGFR humano



B)

Células efectoras: 4119 LnPx

Células diana: CHO transfectadas con EGFR de cyno

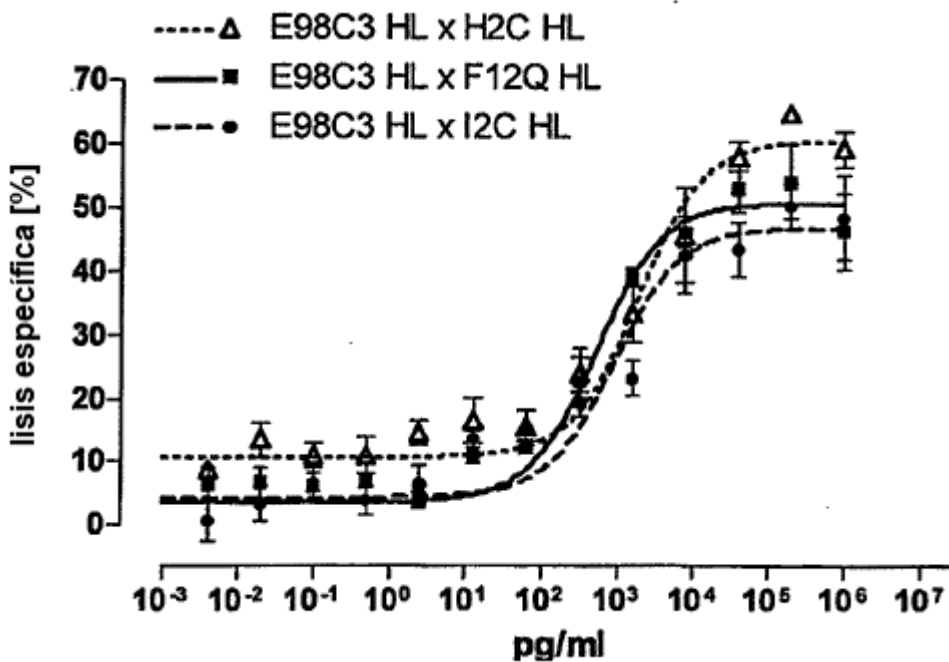
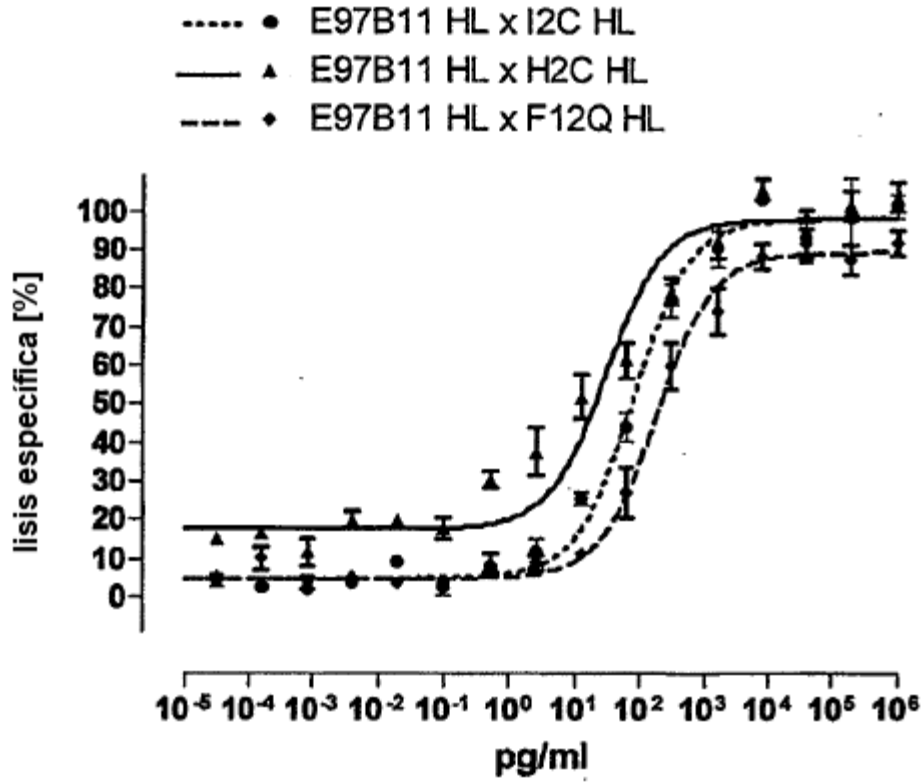


Figura 13g

A)

Células efectoras: PBMC humanas deplecionadas de CD4/CD56 estimuladas

Células diana: CHO transfectadas con EGFR humano



B)

Células efectoras: 4119 LnPx

Células diana: CHO transfectadas con EGFR de cyno

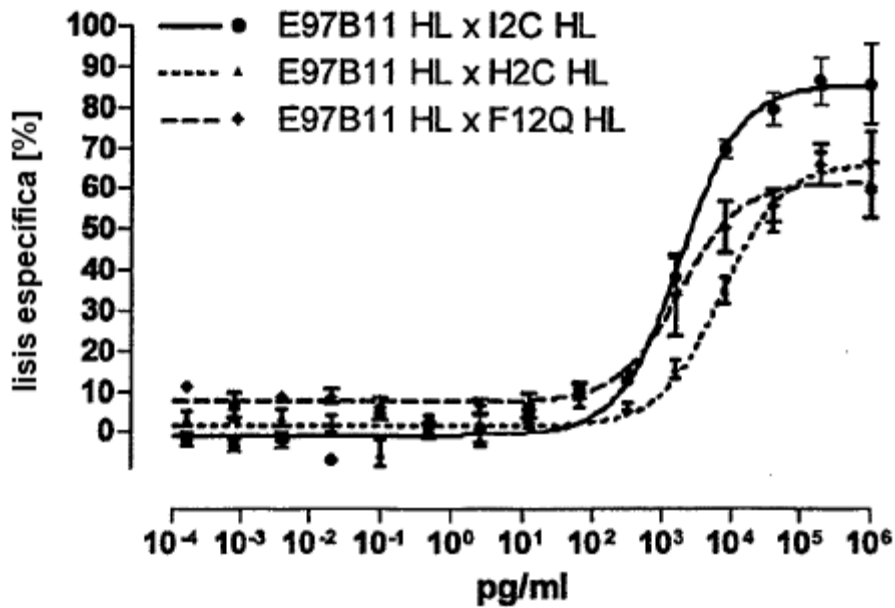
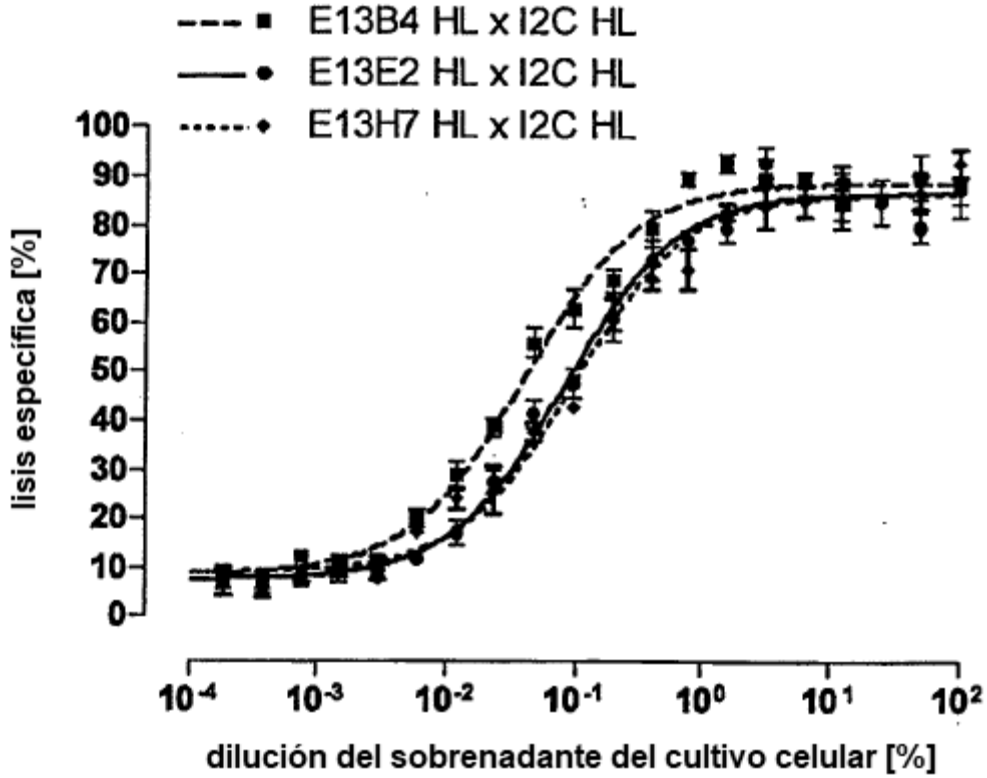


Figura 13h

A)

Células efectoras: PBMC humanas deplecionadas de CD4/CD56 estimuladas

Células diana: CHO transfectadas con EGFR humano



B)

Células efectoras: 4119 LnPx

Células diana: CHO transfectadas con EGFR de cyno

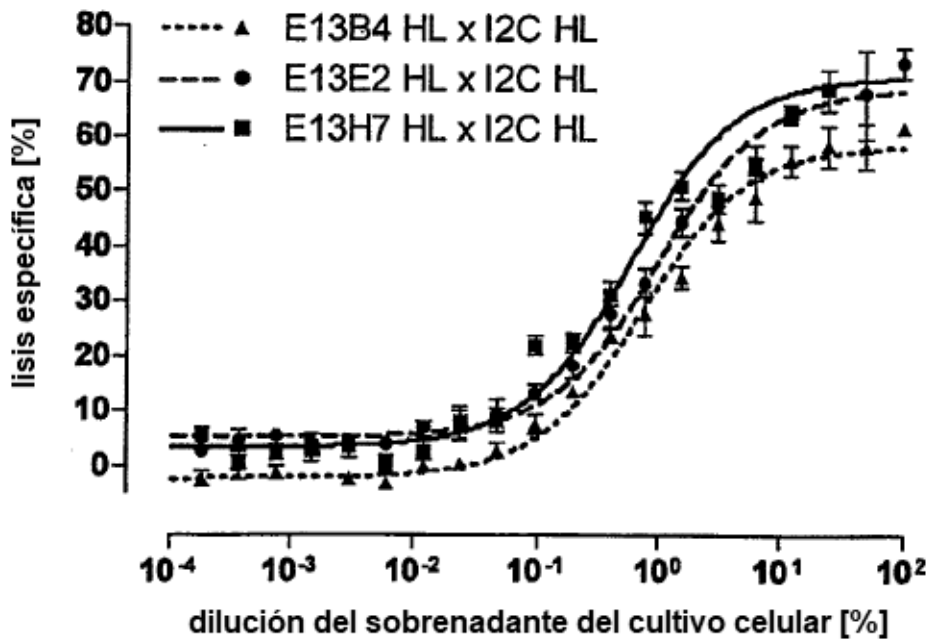
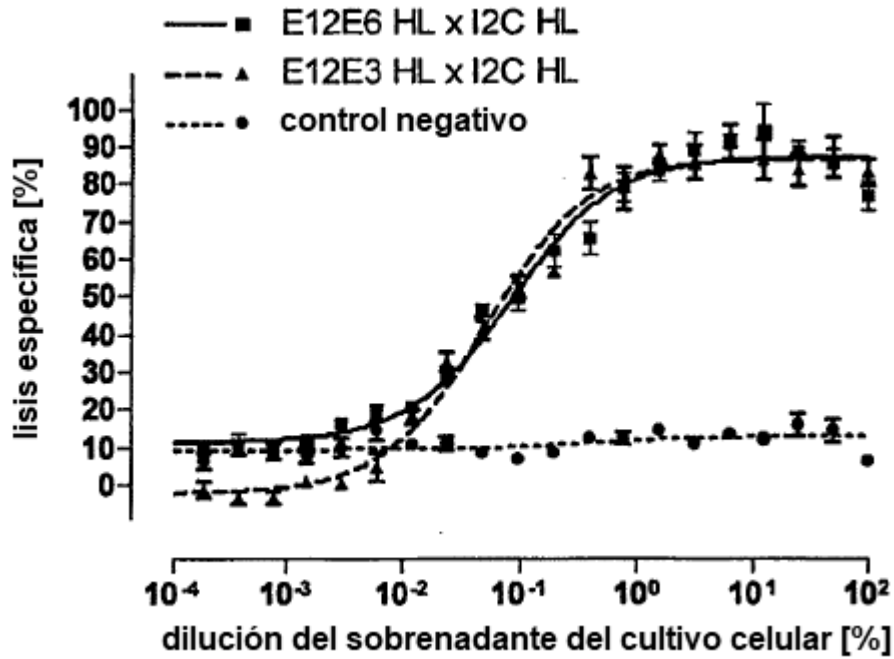


Figura 13i

A)

Células efectoras: PBMC humanas deplecionadas de CD4/CD56 estimuladas

Células diana: CHO transfectadas con EGFR humano



B)

Células efectoras: 4119 LnPx

Células diana: CHO transfectadas con EGFR de cyno

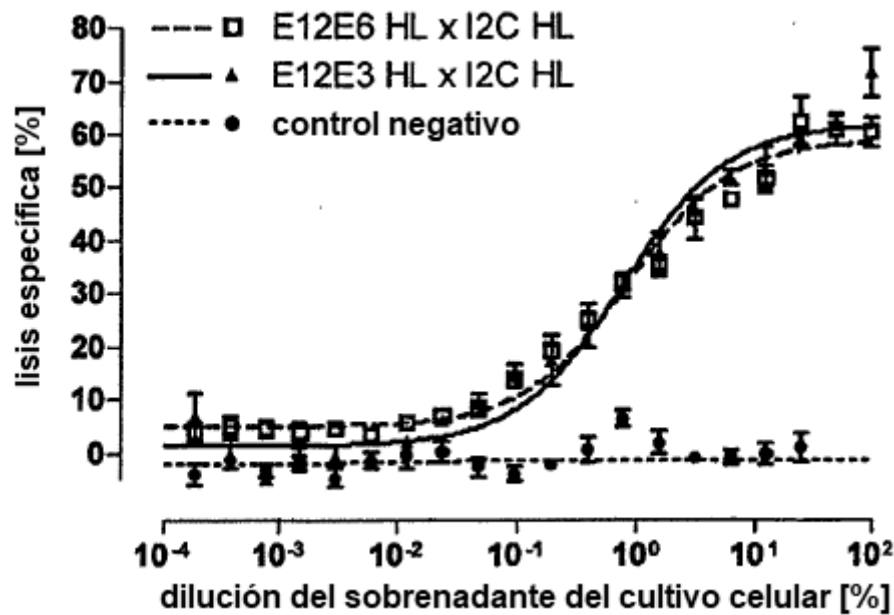
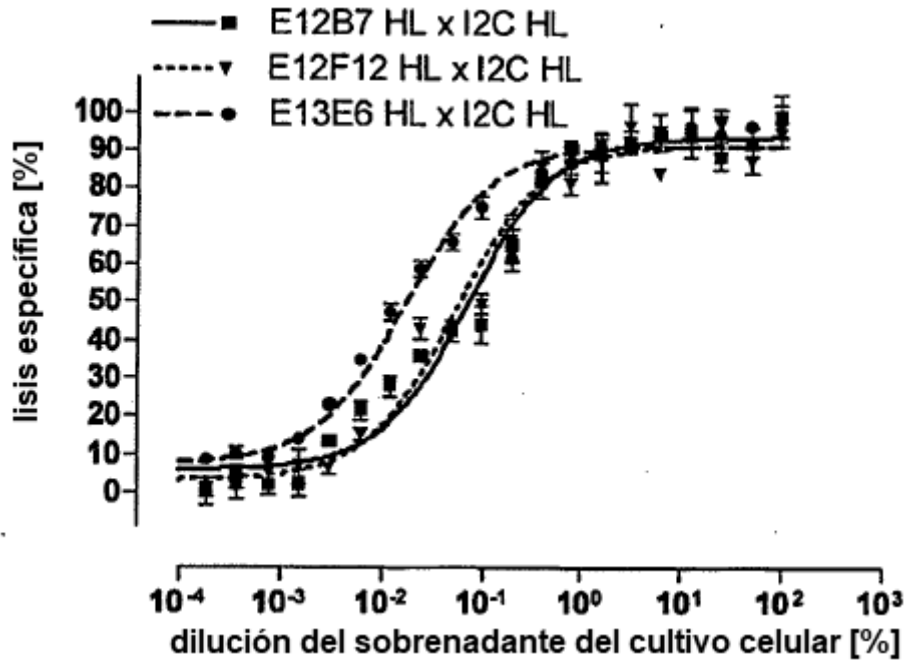


Figura 13j

A)

Células efectoras: PBMC humanas deplecionadas de CD4/CD56 estimuladas

Células diana: CHO transfectadas con EGFR humano



B)

Células efectoras: 4119 LnPx

Células diana: CHO transfectadas con EGFR de cyno

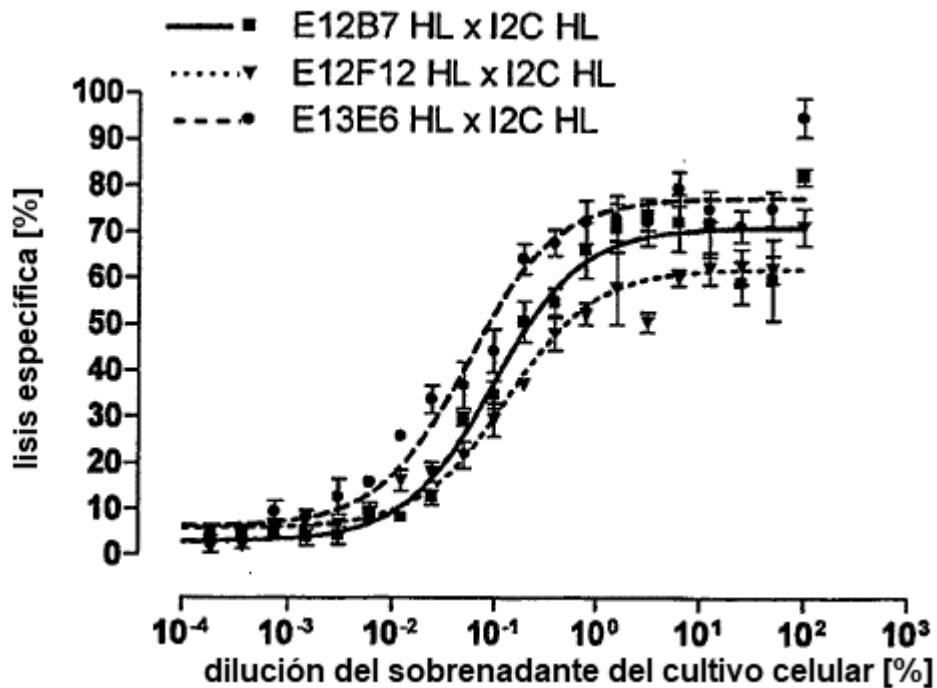


Figura 14

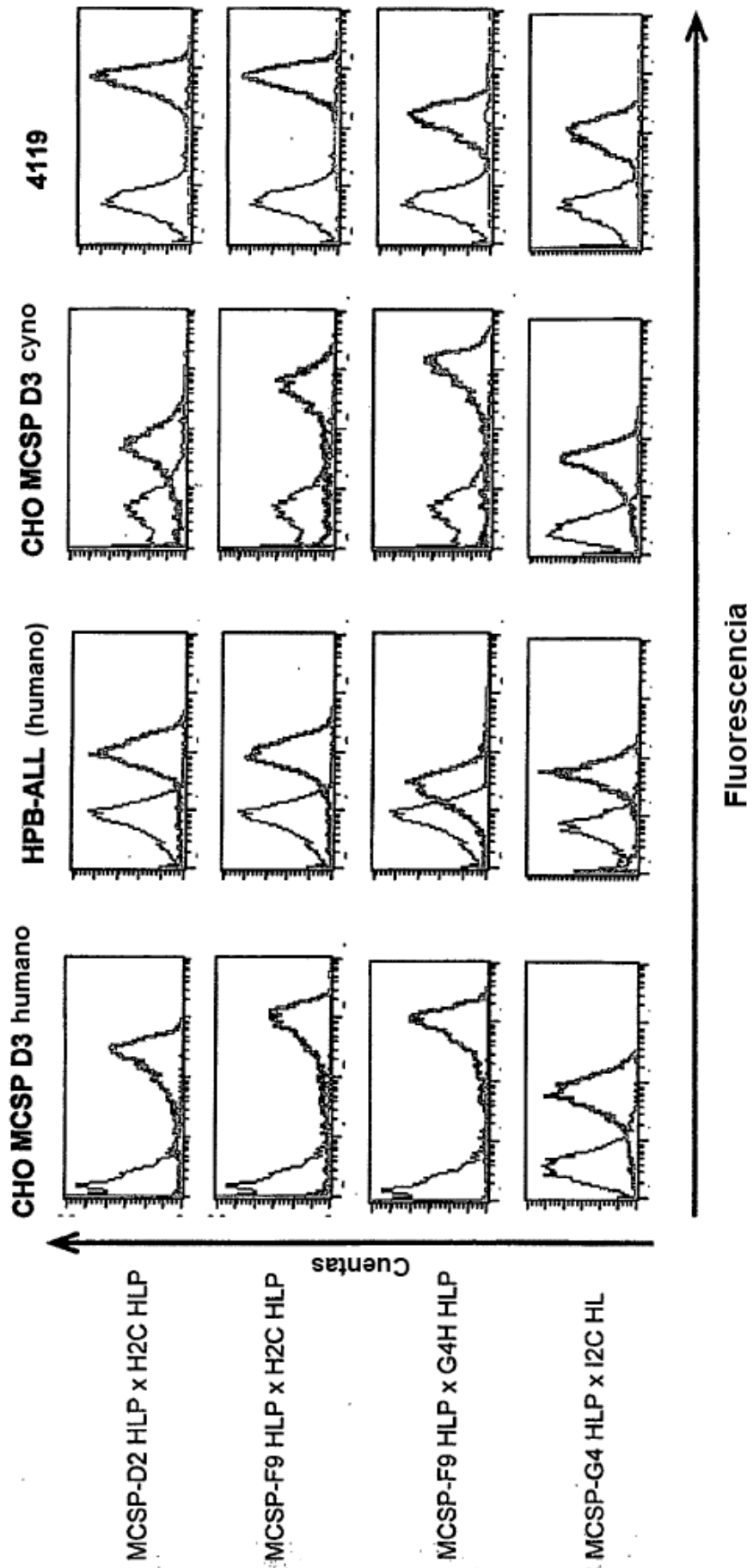


Figura 15

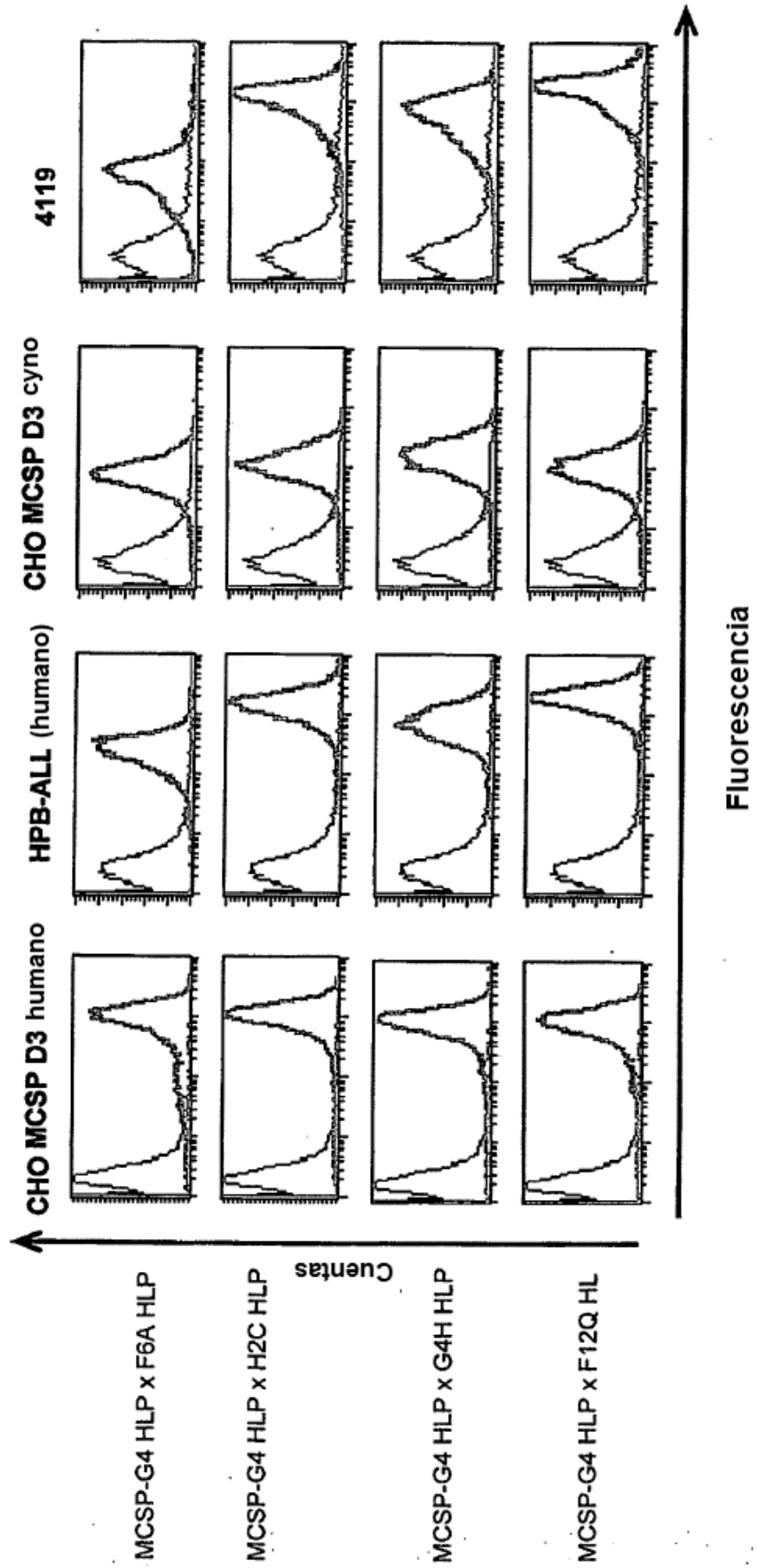


Figura 16

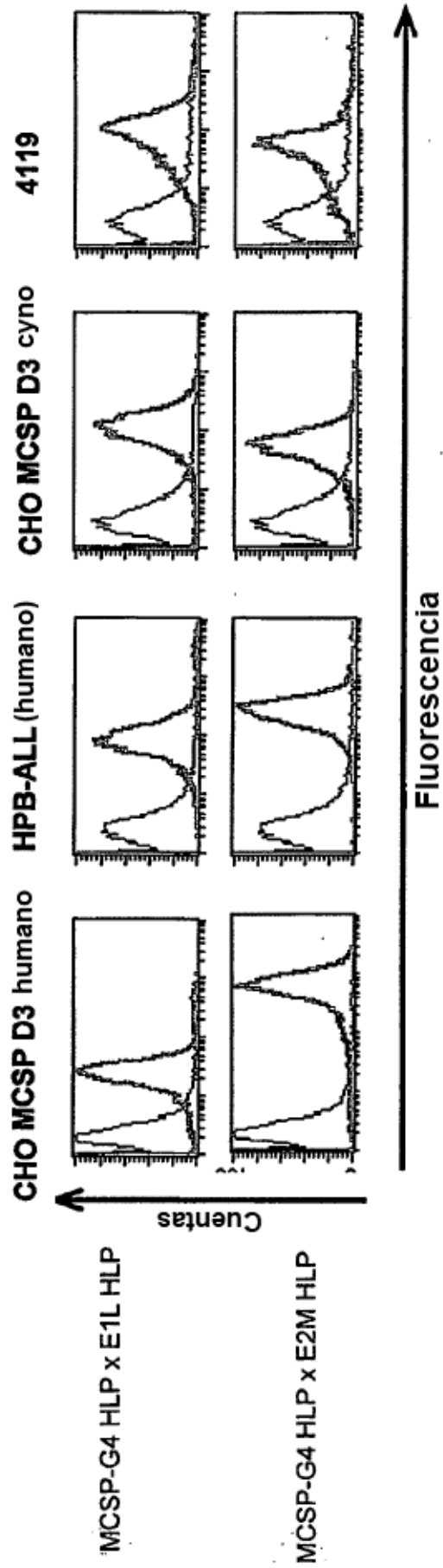
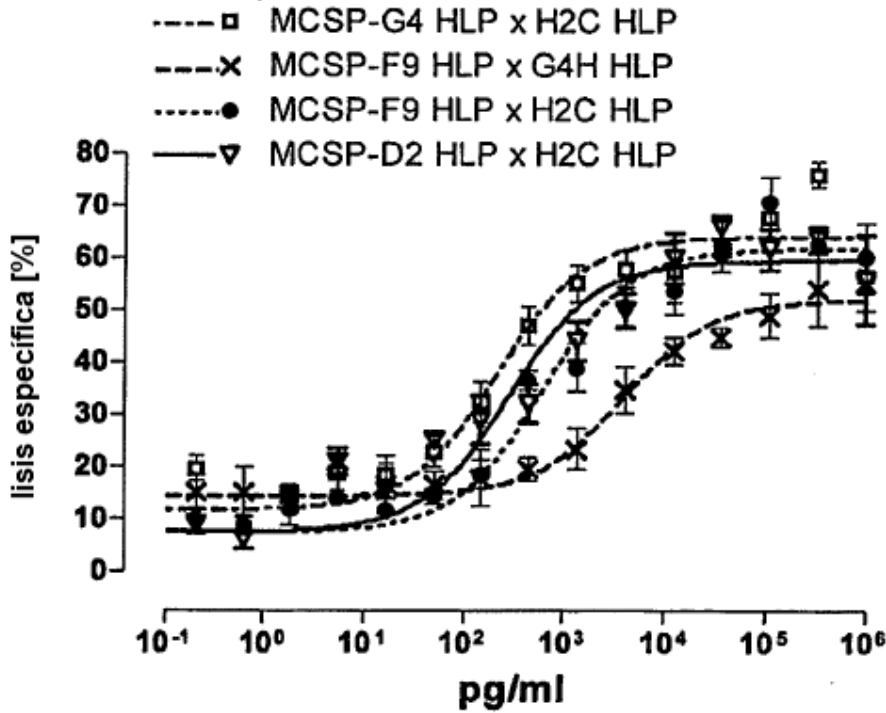


Figura 17

A)

Células efectoras: PBMC humanas deplecionadas de CD4/CD56 estimuladas

Células diana: CHO transfectadas con MCSP D3 humano



B)

Células efectoras: línea de células T de macaco 4119 LnPx

Células diana: CHO transfectadas con MCSP D3 de cynomolgus

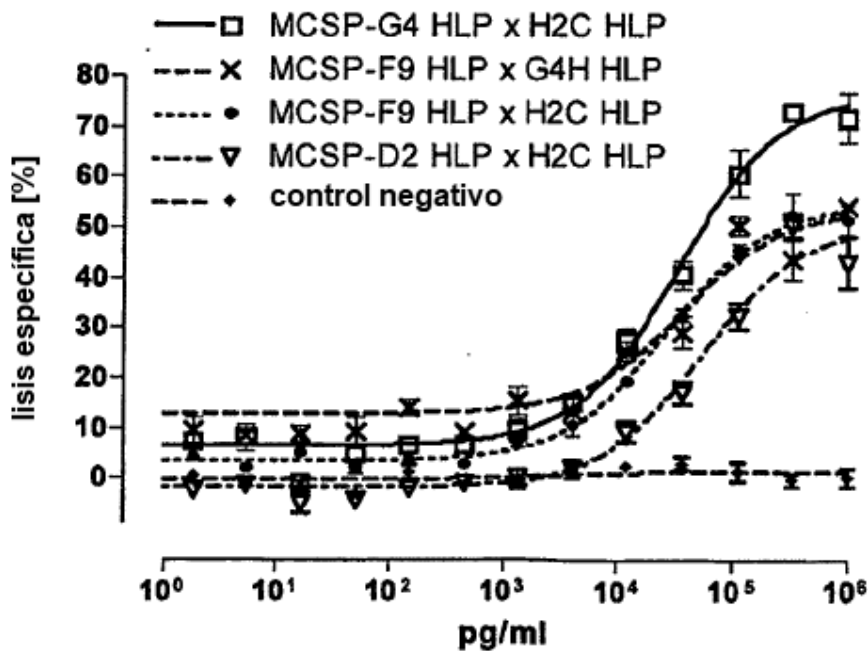
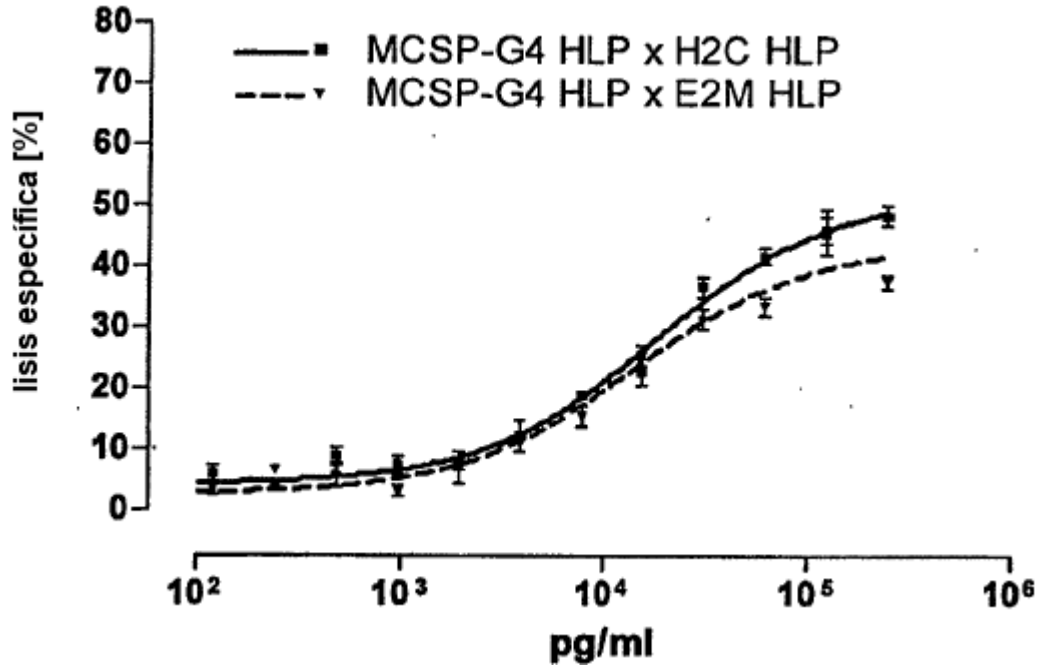


Figura 18

A)

Células efectoras: línea de células T de macaco 4119 LnPx

Células diana: CHO transfectadas con MCSP D3 de cynomolgus



B)

Células efectoras: línea de células T de macaco 4119 LnPx

Células diana: CHO transfectadas con MCSP D3 de cynomolgus

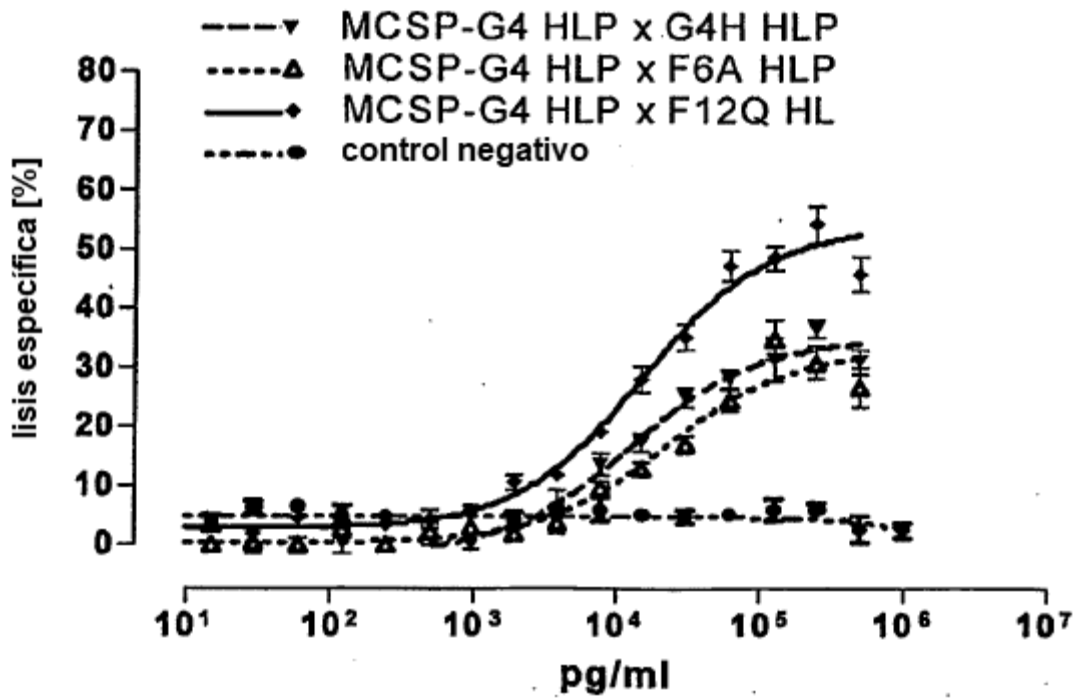
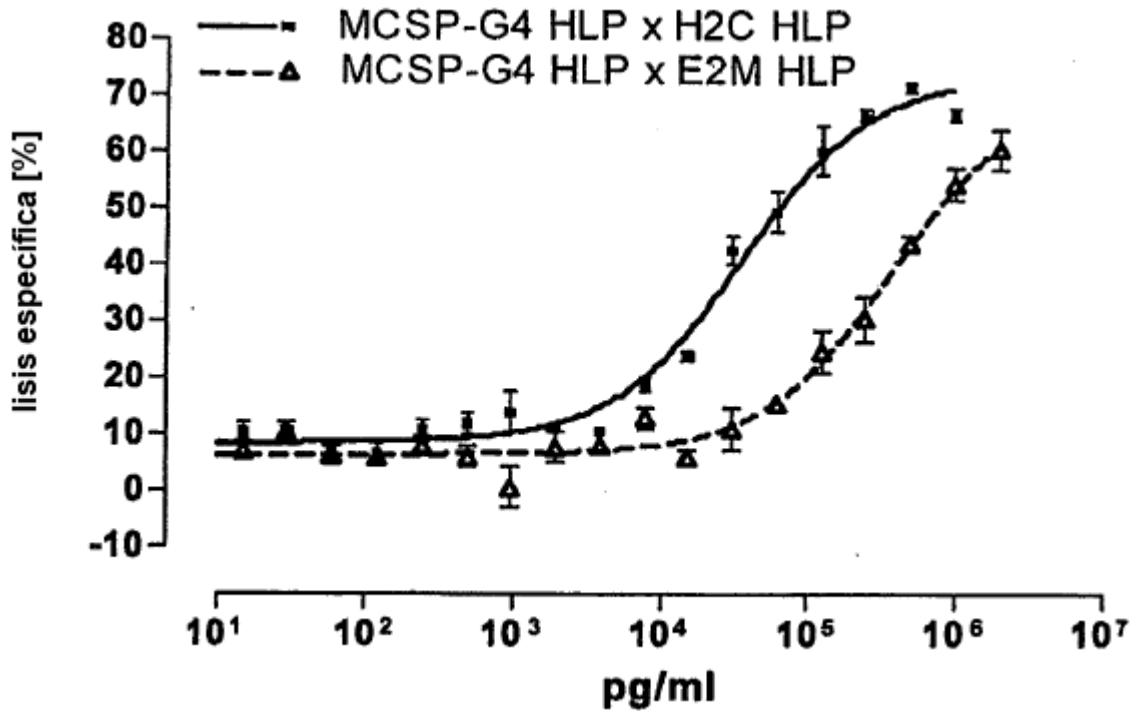


Figura 19

A)

Células efectoras: PBMC humanas deplecionadas de CD4/CD56 estimuladas

Células diana: CHO transfectadas con MCSP D3 humano



B)

Células efectoras: PBMC humanas deplecionadas de CD4/CD56 estimuladas

Células diana: CHO transfectadas con MCSP D3 humano

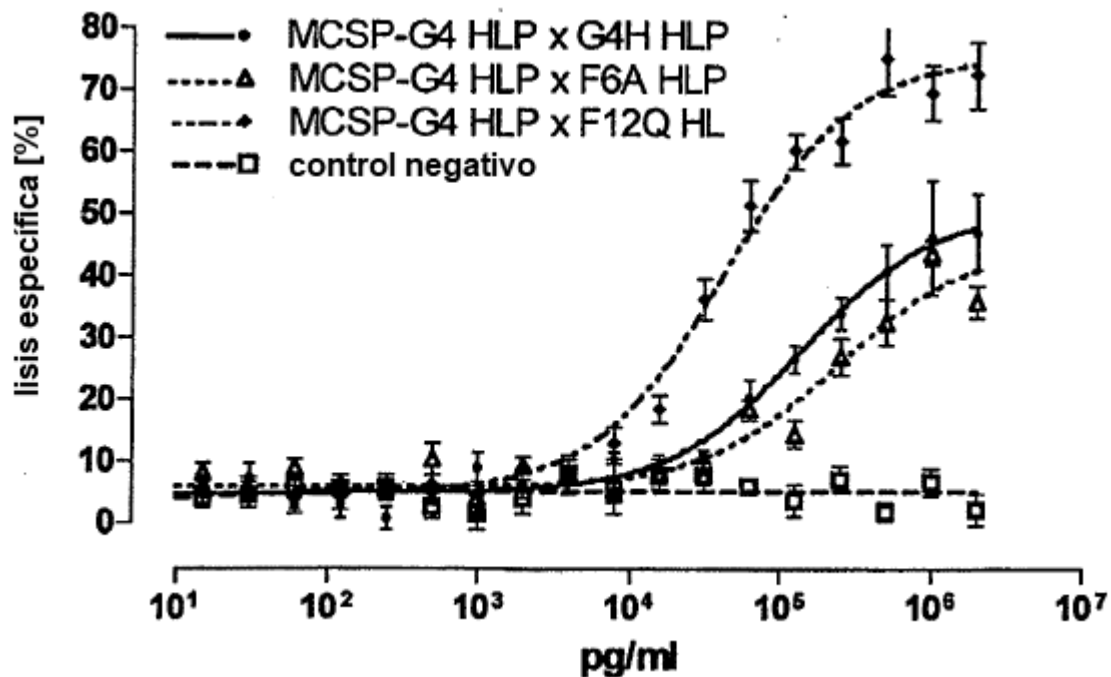
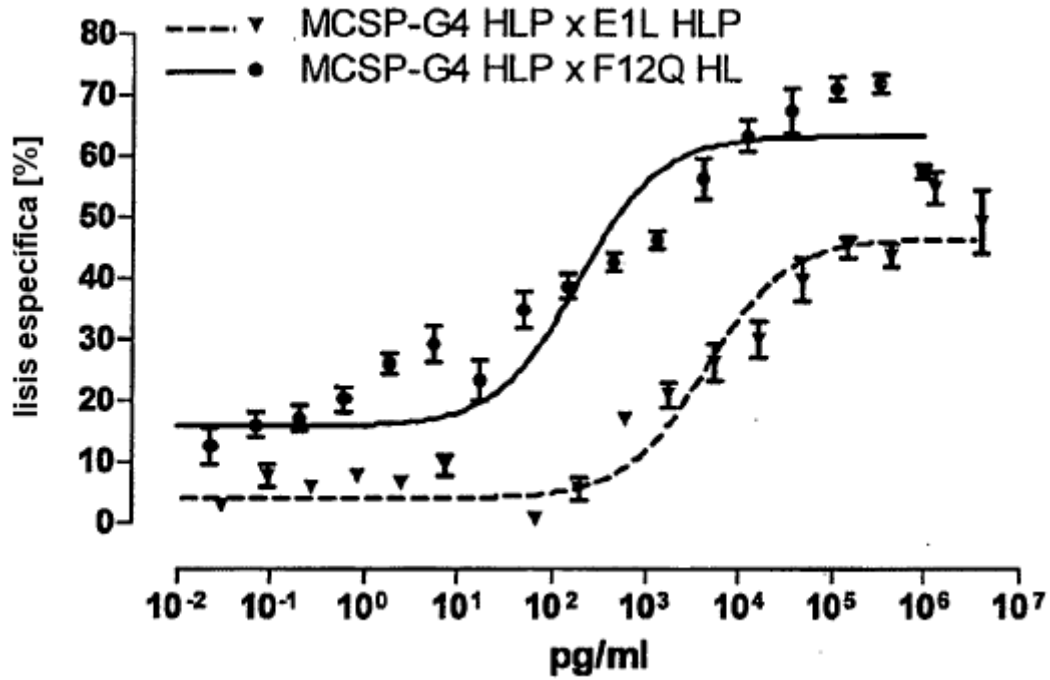


Figura 20

A)

Células efectoras: PBMC humanas deplecionadas de CD4/CD56 estimuladas

Células diana: CHO transfectadas con MCSP D3 humano



B)

Células efectoras: línea de células T de macaco 4119 LnPx

Células diana: CHO transfectadas con MCSP D de cynomolgus

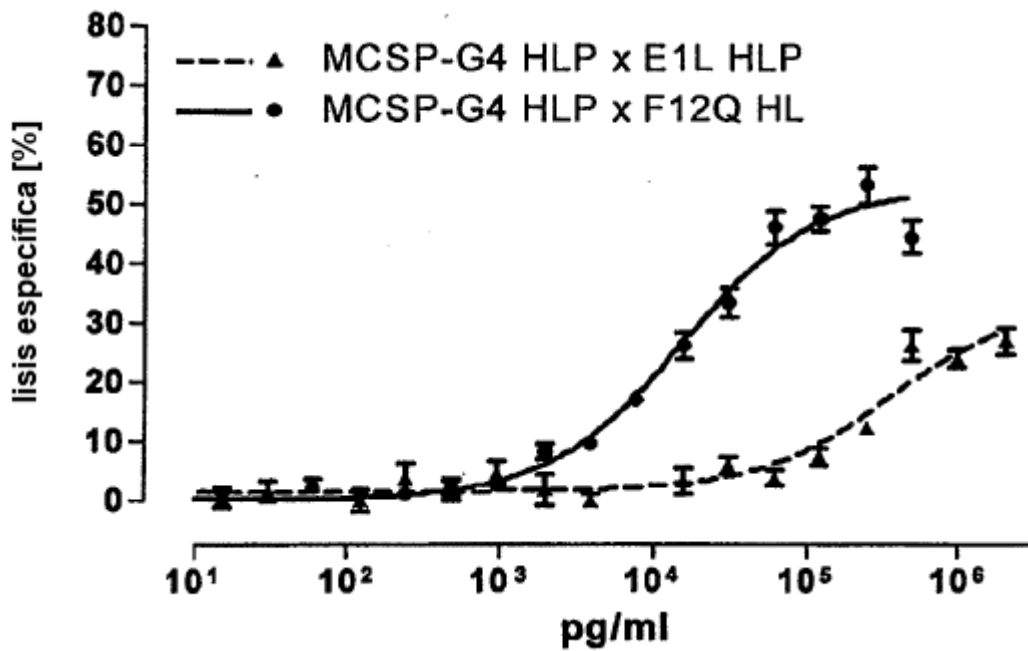
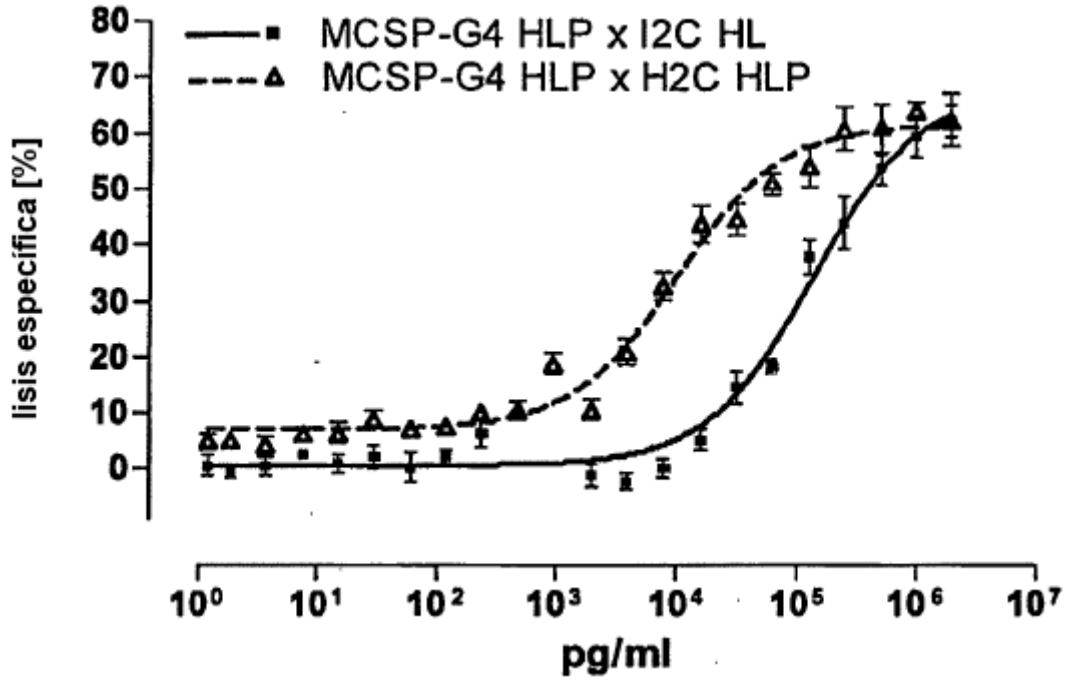


Figura 21

A)

Células efectoras: PBMC humanas deplecionadas de CD4/CD56 estimuladas

Células diana: CHO transfectadas con MCSP D3 humano



B)

Células efectoras: línea de células T de macaco 4119 LnPx

Células diana: CHO transfectadas con MCSP D3 de cynomolgus

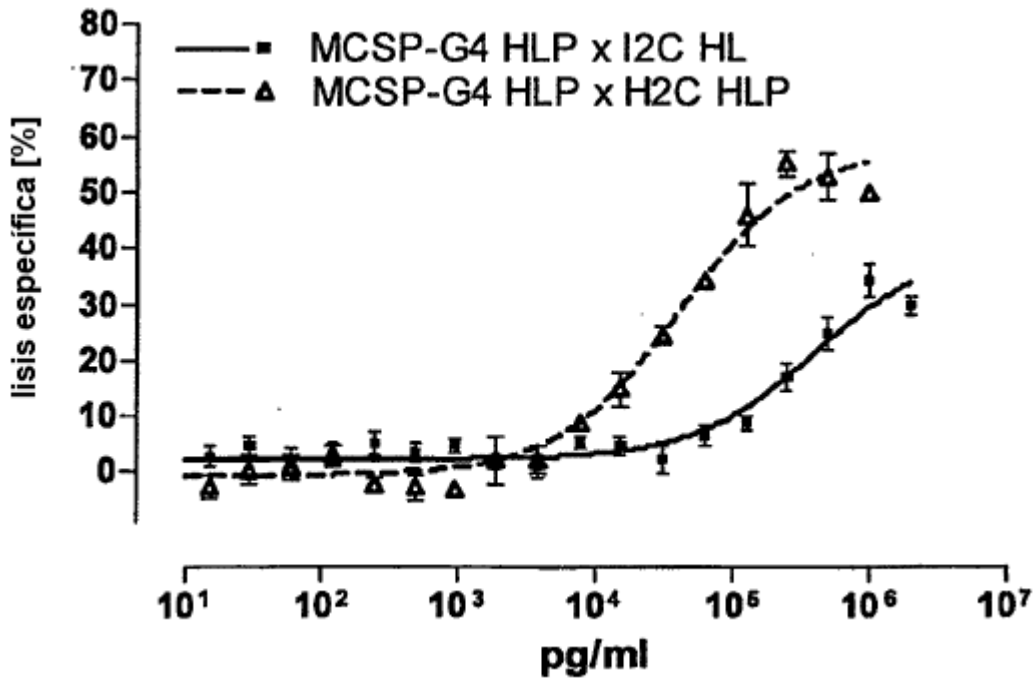


Figura 22 (1)

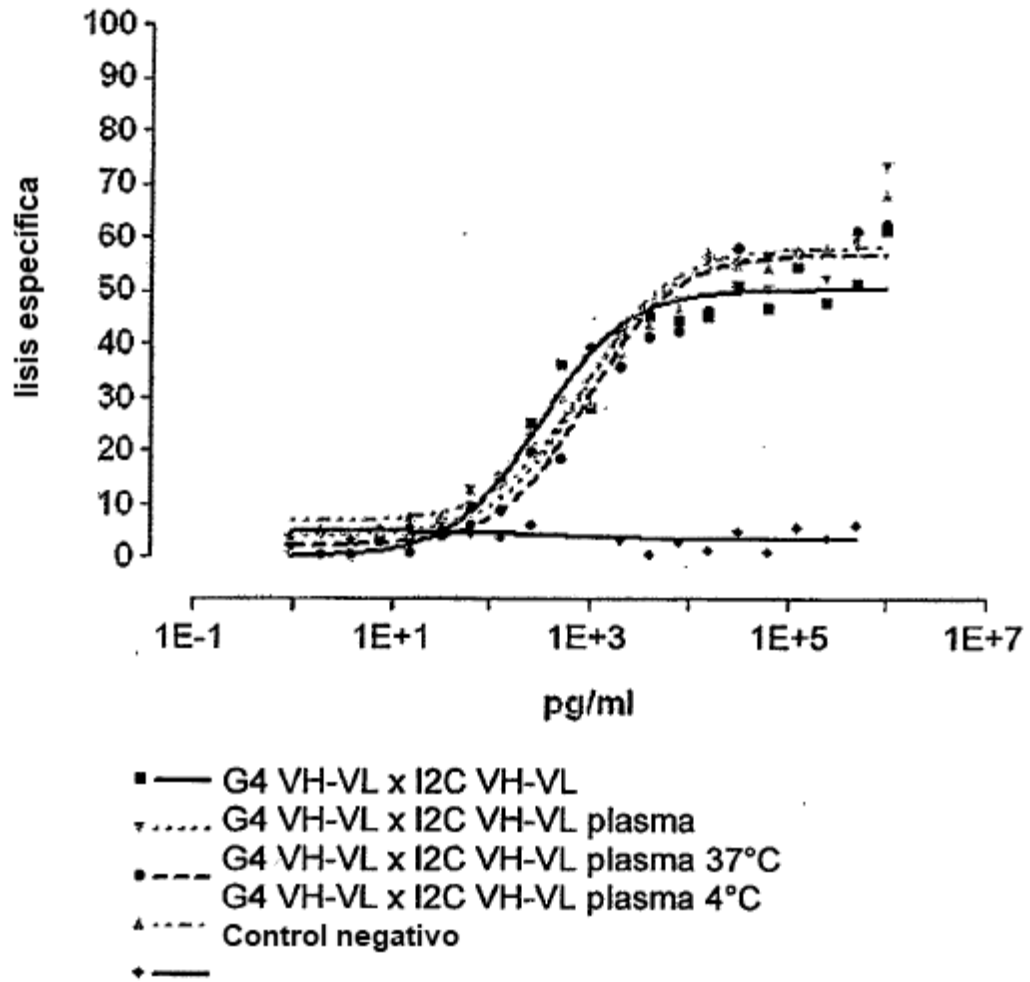


Figura 22 (2)

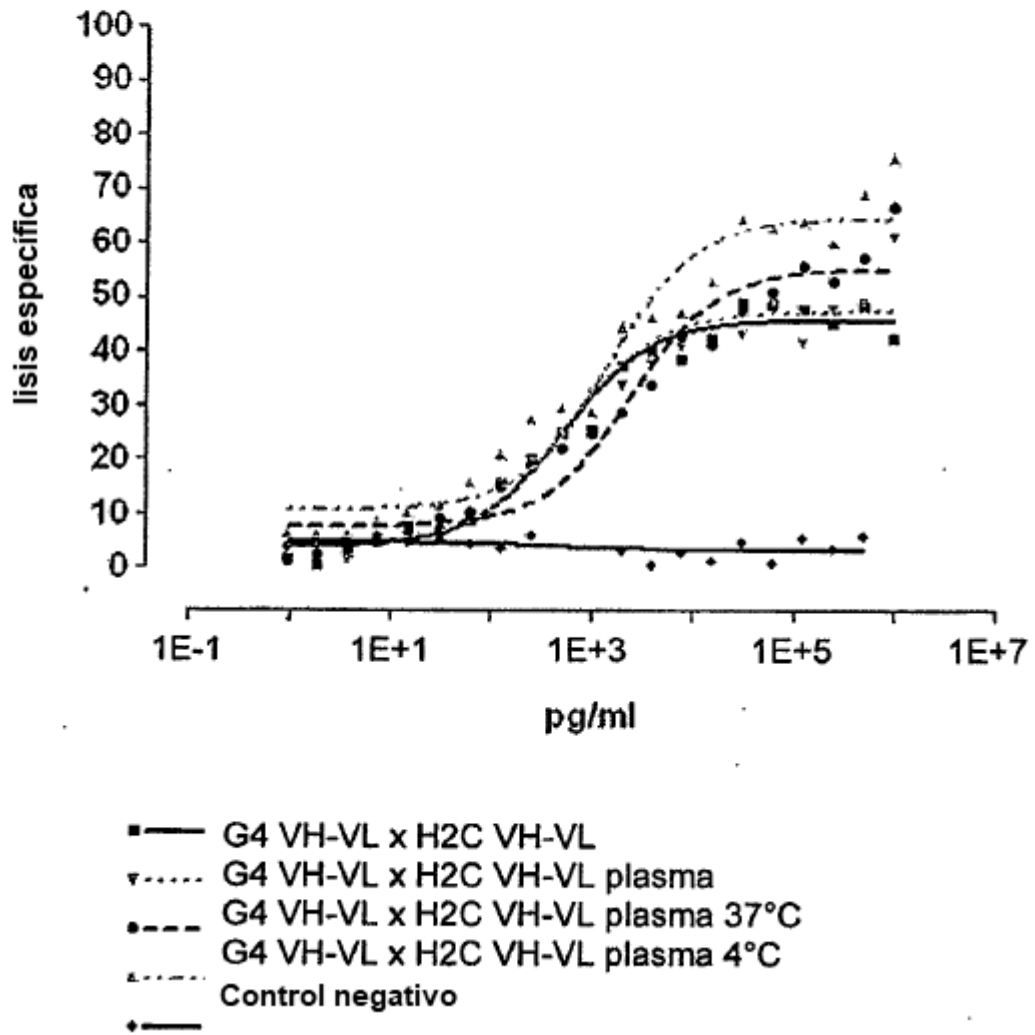
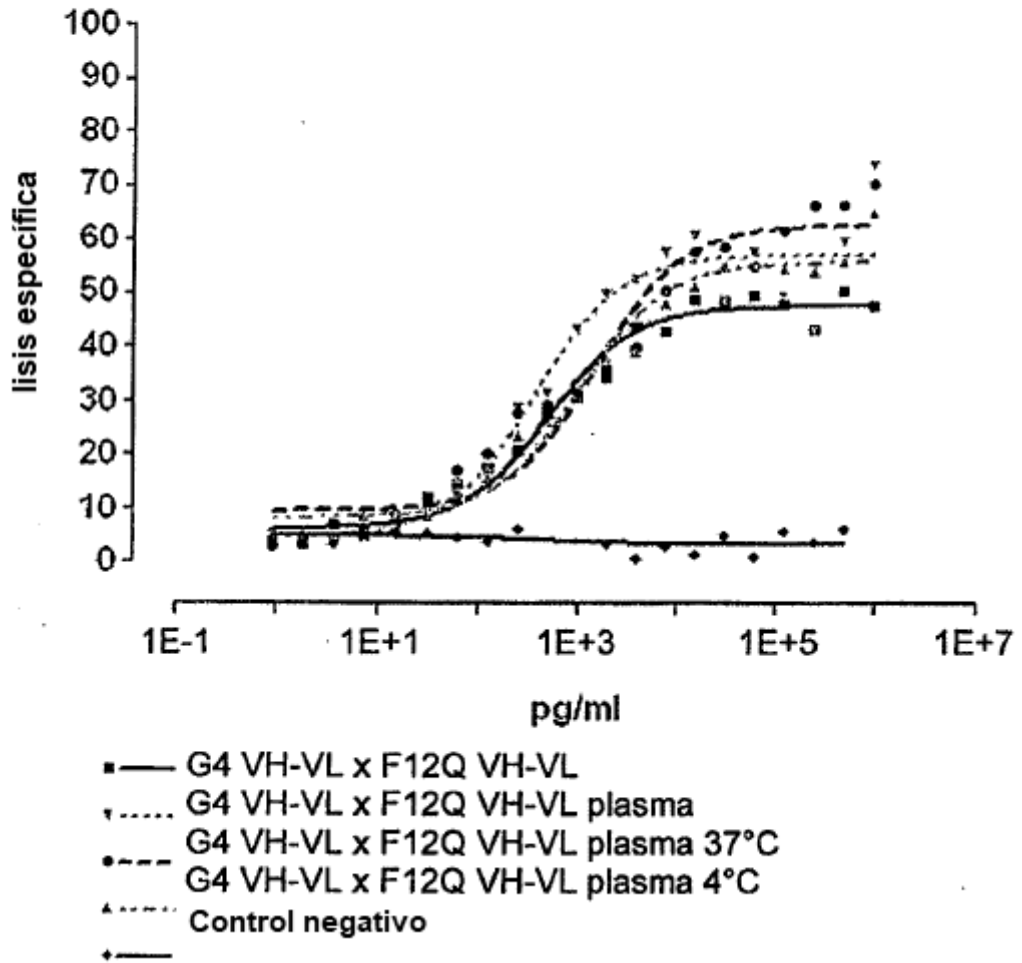
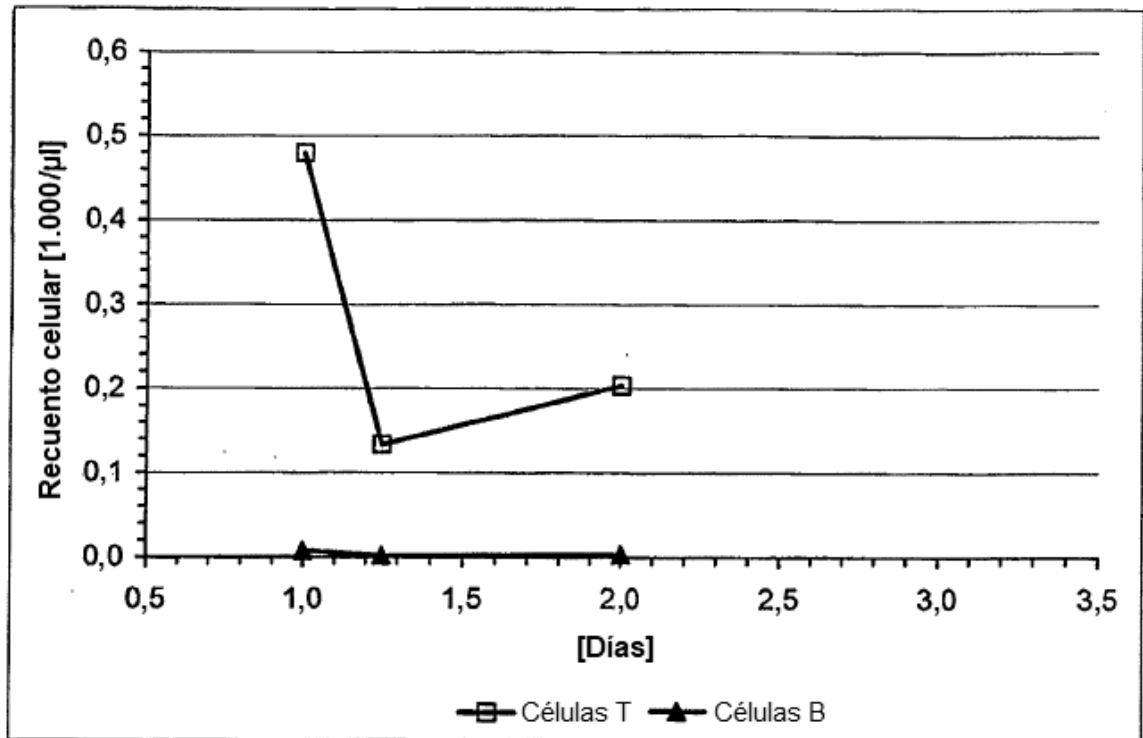


Figura 22 (3)

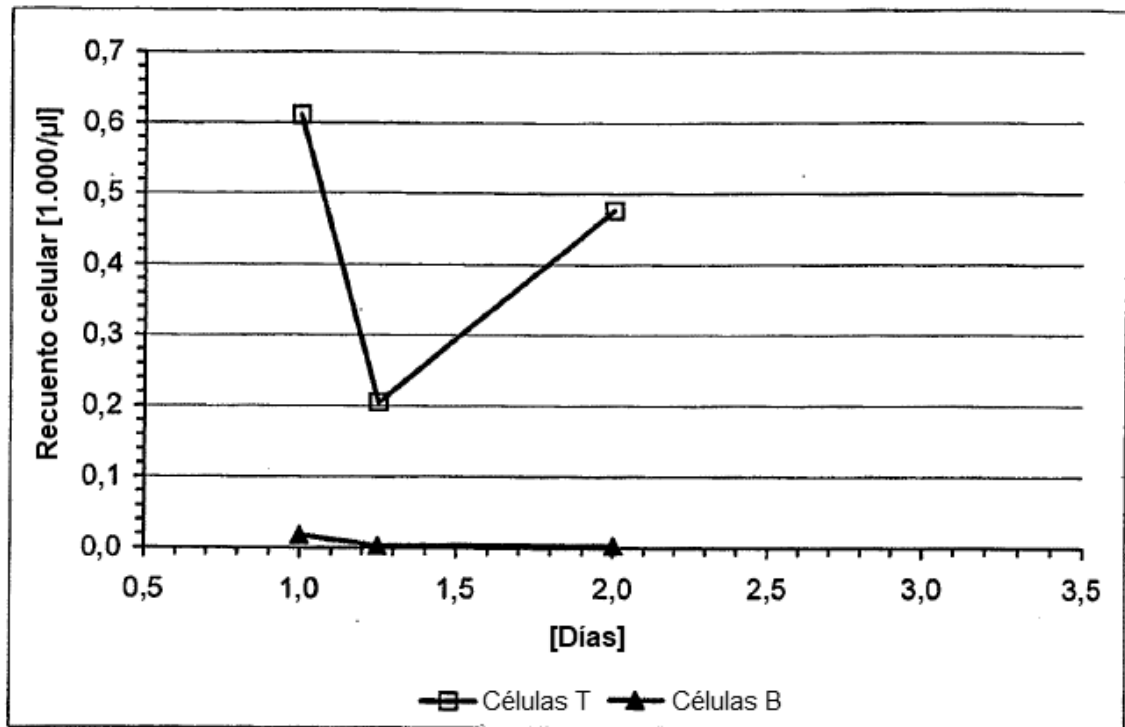


Pac. 1 (0,5 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$ CD19xCD3)



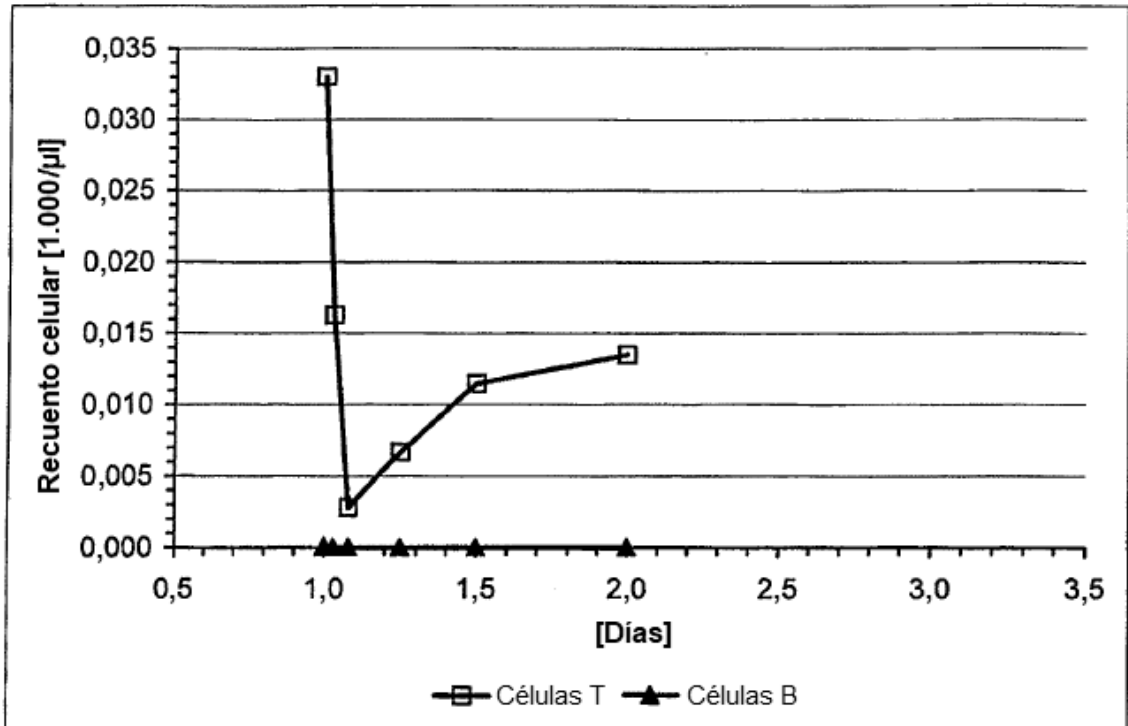
Pac. 7 (1,5 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$ CD19xCD3)

Figura 23a



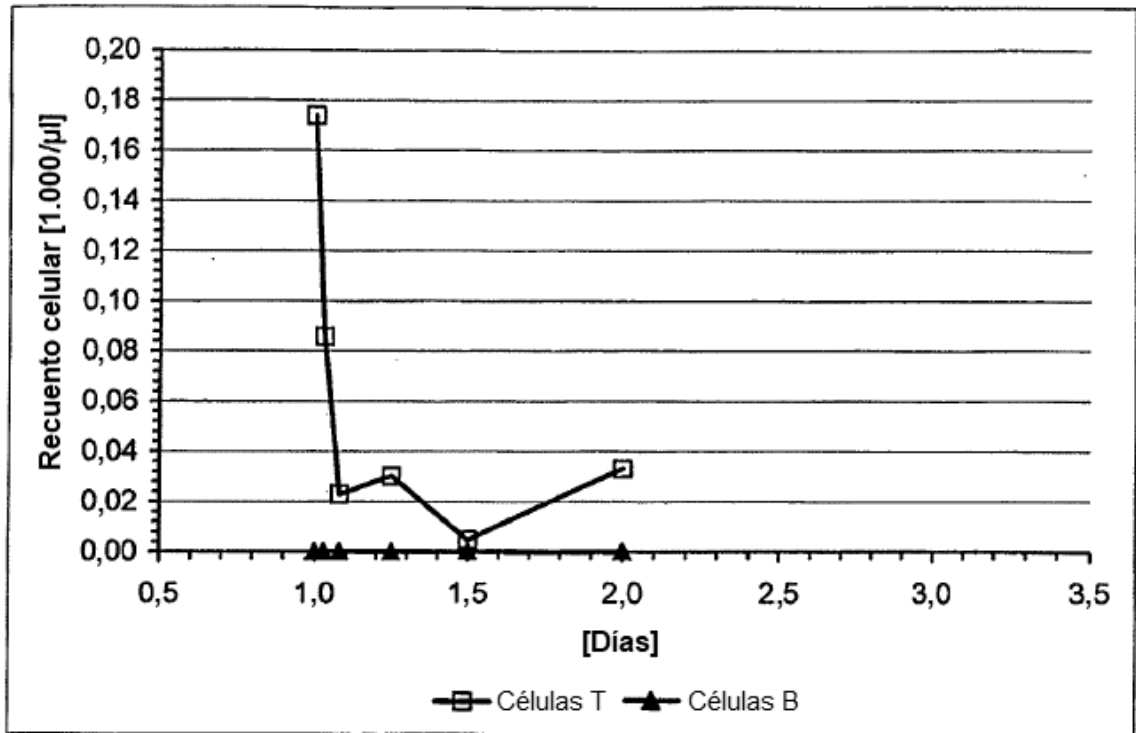
Pac. 23 (15 μ g/m²/24h CD19xCD3)

Figura 23b



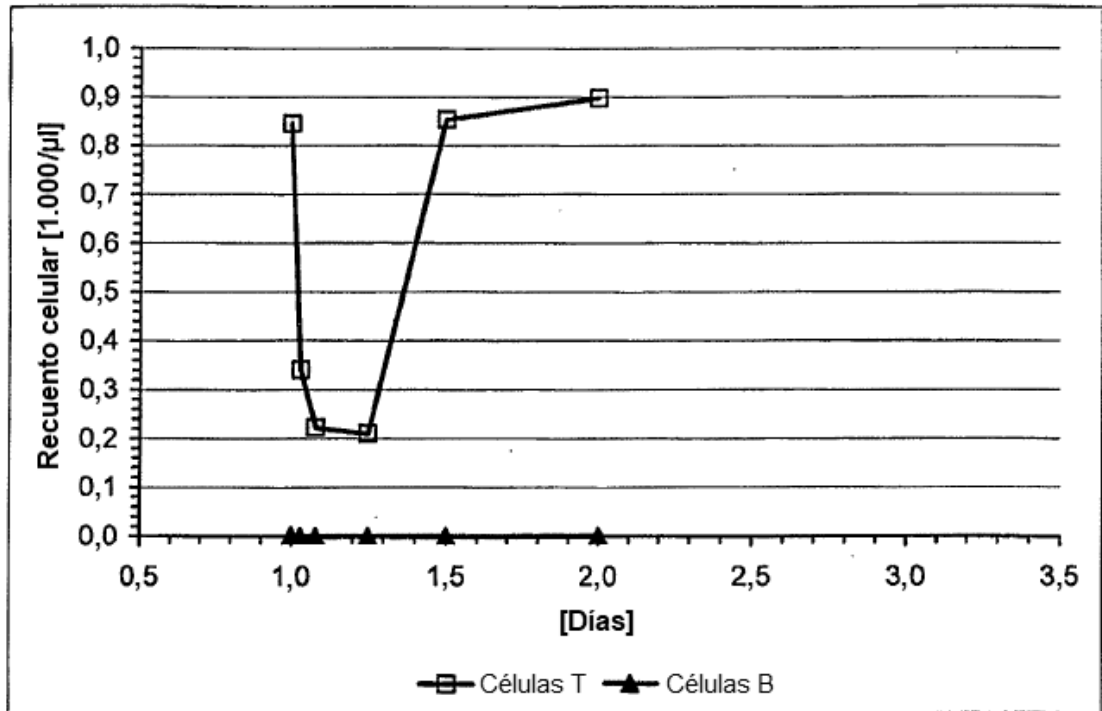
Pac. 30 (30 μg/m²/24h CD19xCD3)

Figura 23c



Pac. 31 (30 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$ CD19xCD3)

Figura 23d



Pac. 33 (60 μg/m²/24h CD19xCD3)

Figura 23e

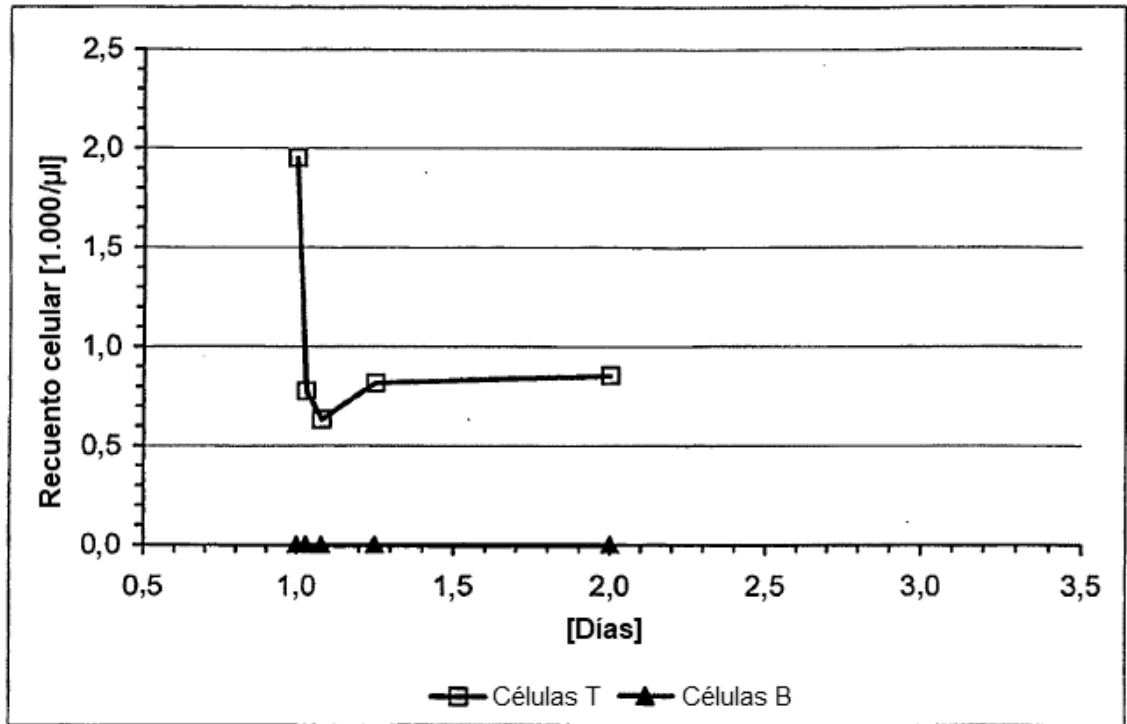
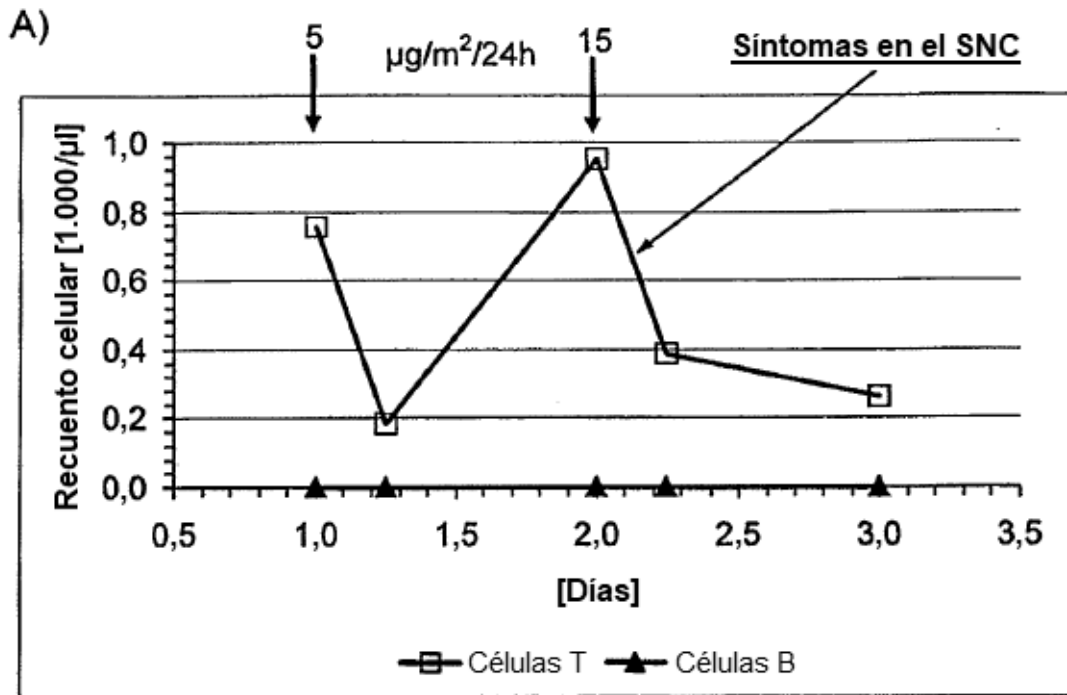
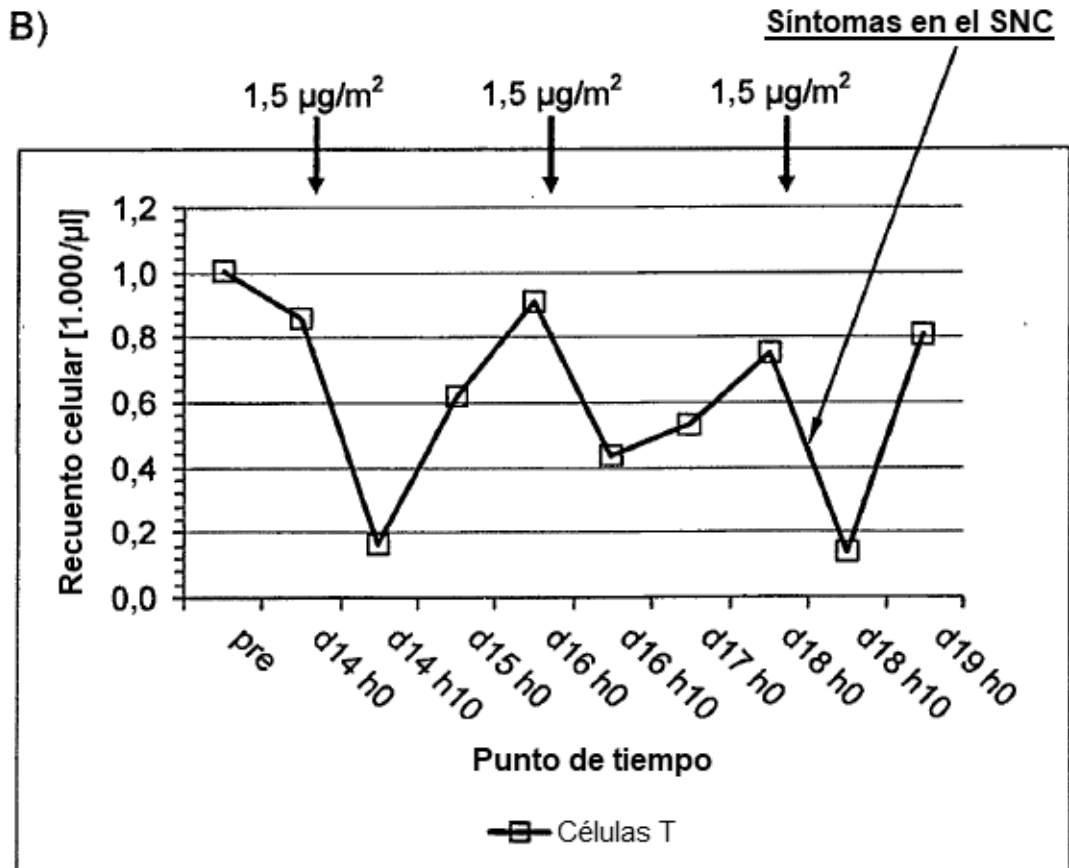


Figura 23f



Pac. 19 (infusión continua: 5 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$ durante 1 día seguido por 15 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$ de CD19xCD3 de mantenimiento)



Pac. 003002 (ensayo de infusión en bolo)

Figura 24

Pac. 20 (15 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$ CD19xCD3)
Inicio de la rampa

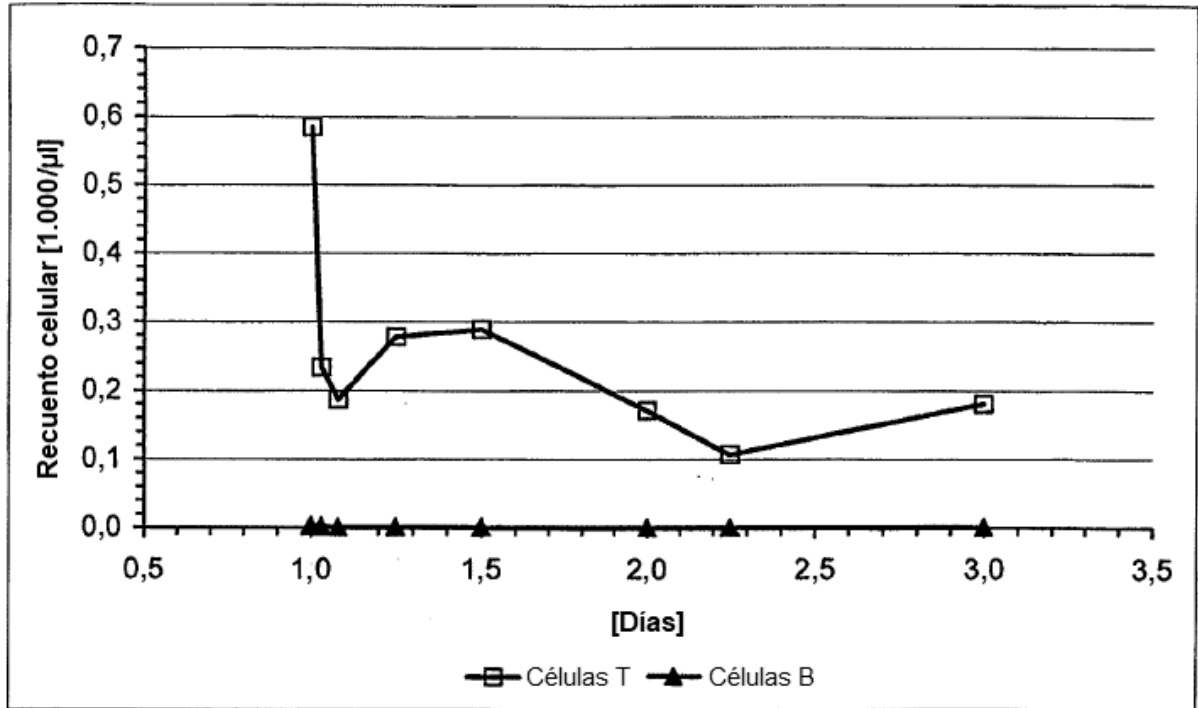


Figura 25

Pac. 13 (15 µg/m²/24h CD19xCD3)

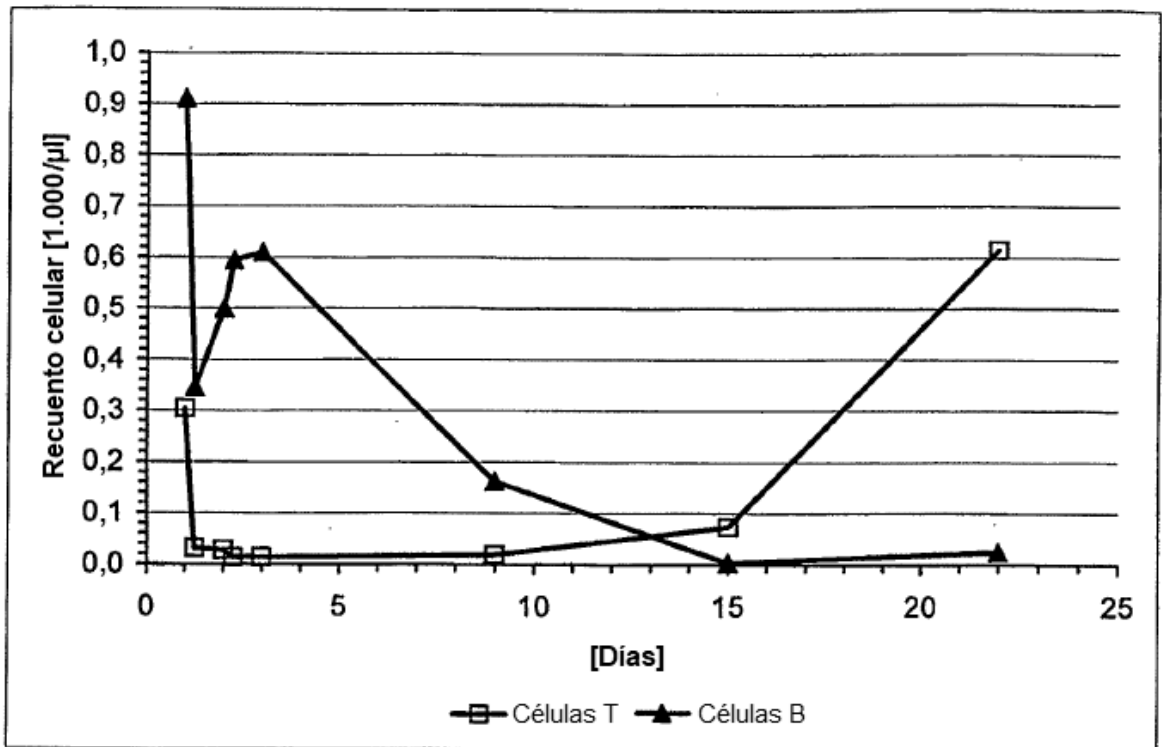
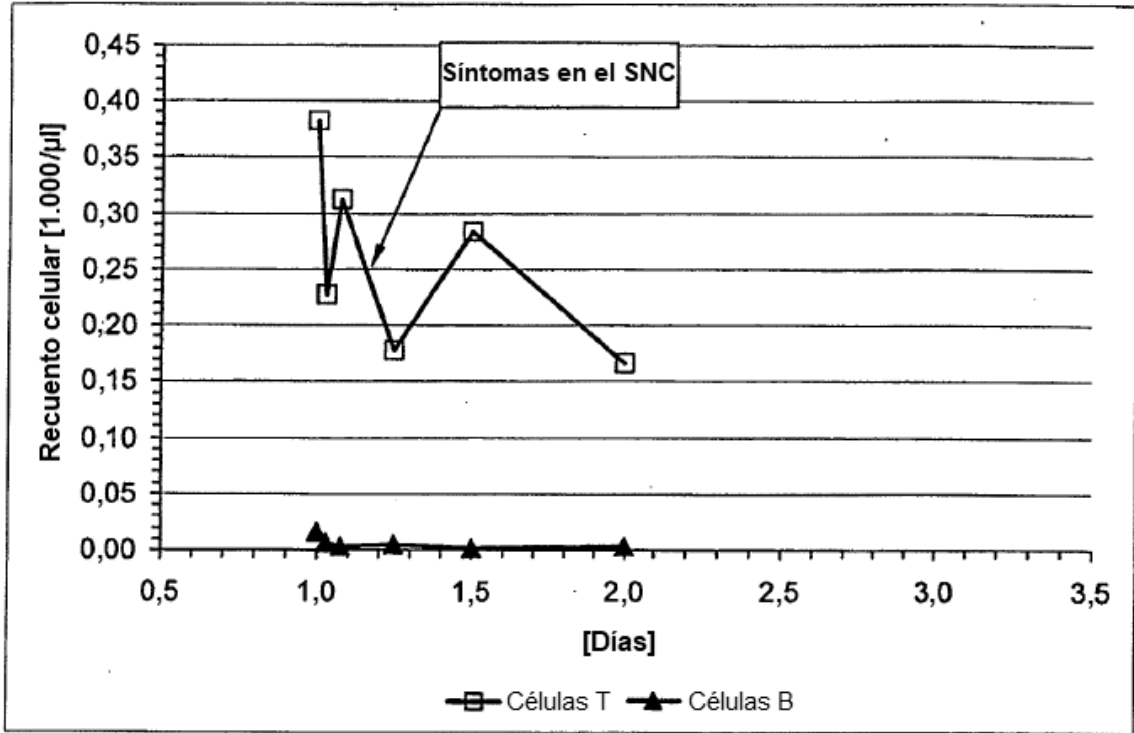


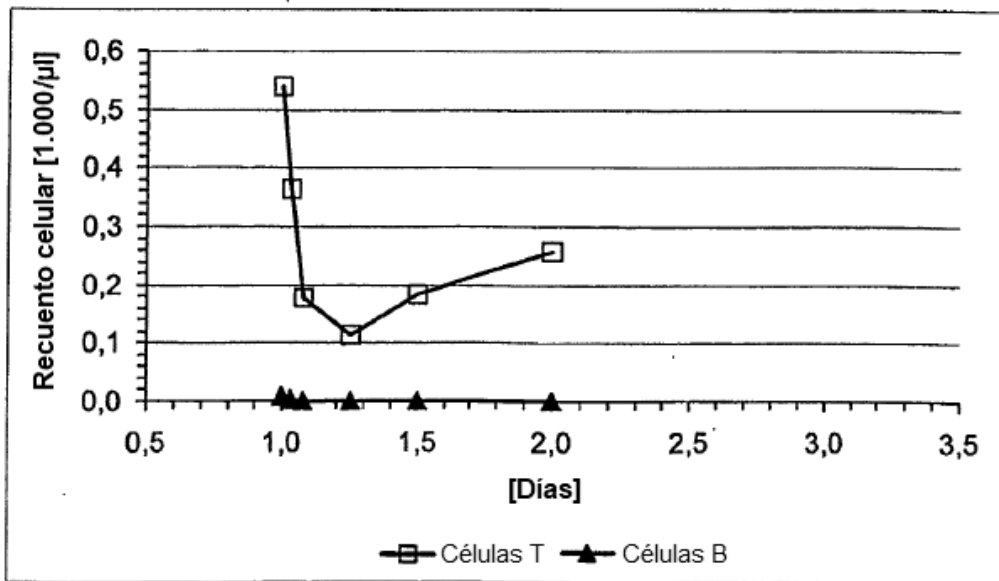
Figura 26

Figura 27

Pac. 24 (15 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$ CD19xCD3 sin HSA)
1^{er} Inicio del tratamiento



Pac. 24 (15 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$ CD19xCD3 con HSA)
2^o Inicio del tratamiento



Modelo de adhesión de las células T a las células endoteliales inducida por la unión monovalente a epítopos de CD3 dependientes de contexto

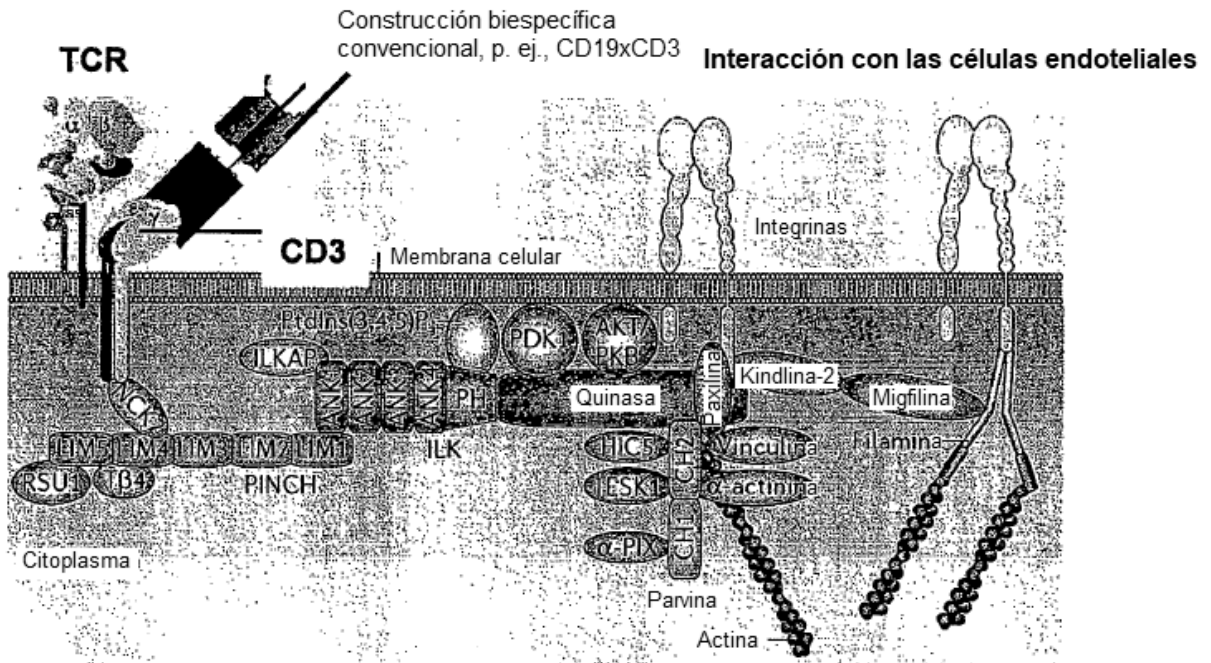


Figura 28

Figura 29

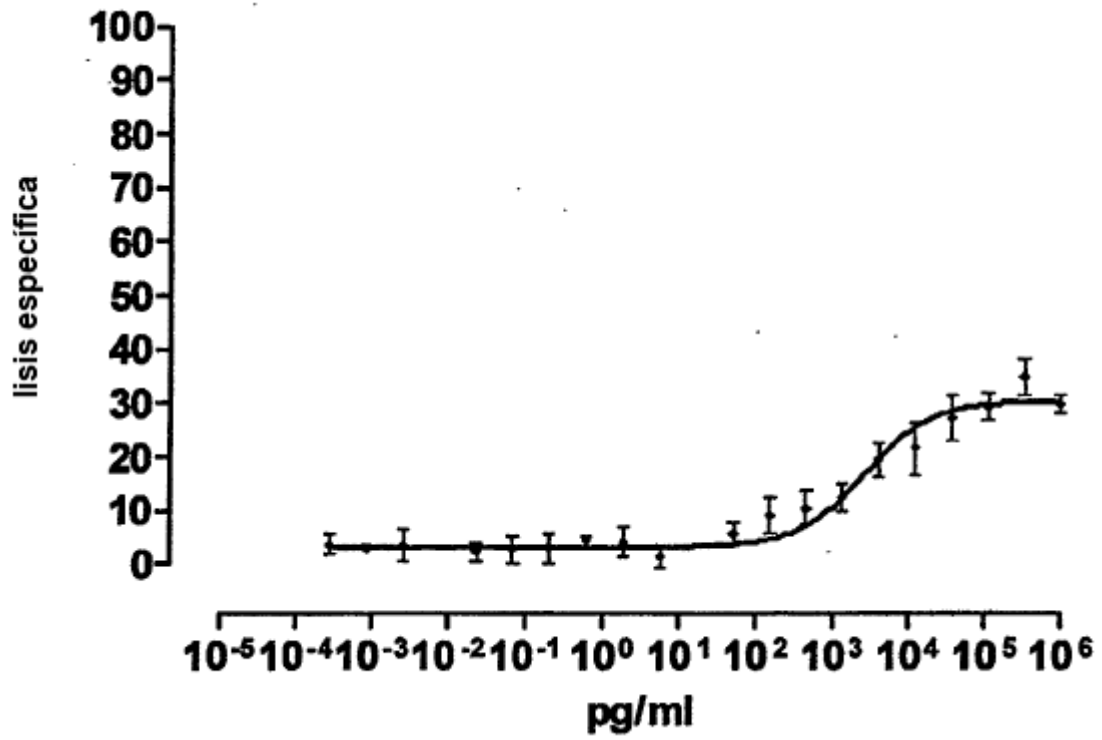
Actividad citotóxica de material de ensayo de cynomolgus

CD33-AF5 VH-VL x I2C VH-VL

Células diana: CHO CD33 de cyno; células efectoras: 4119 LnPx

Relación E:D 10:1; duración del ensayo 18 h

CE50: 2,7 ng/ml



Depleción dependiente de la dosis y del tiempo de monocitos sanguíneos CD33 a través de
 CD33-AF5 VH-VL x I2C VH-VL

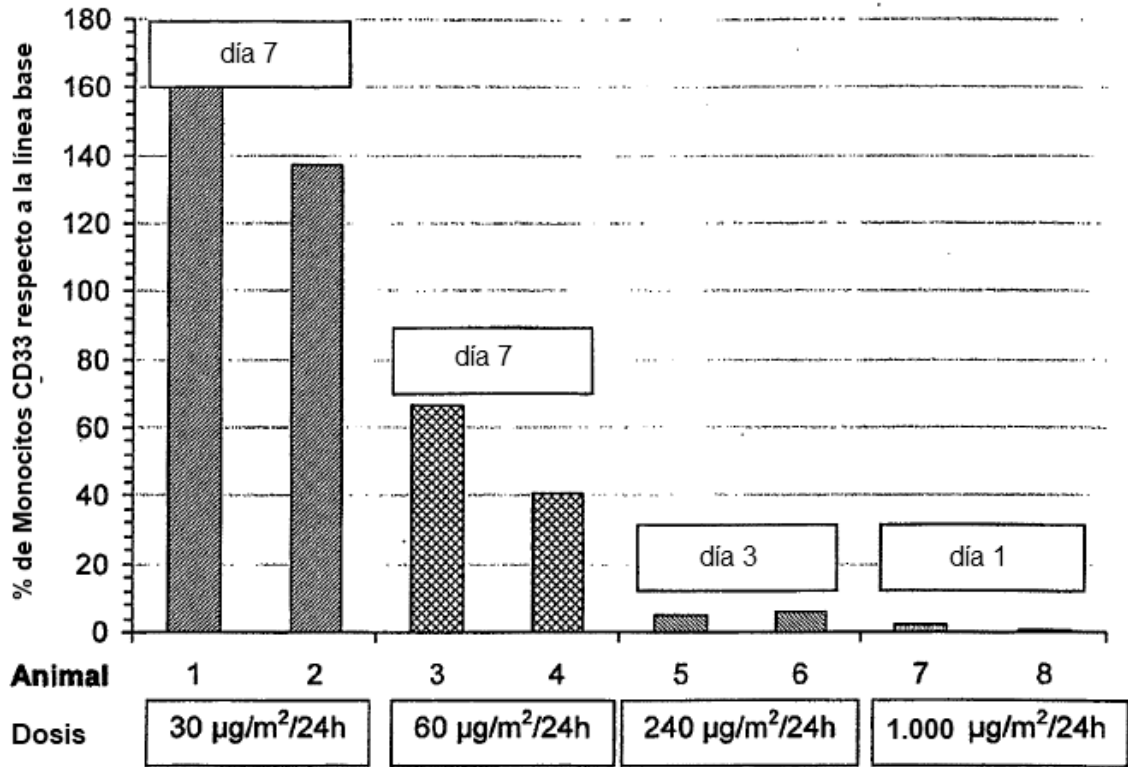
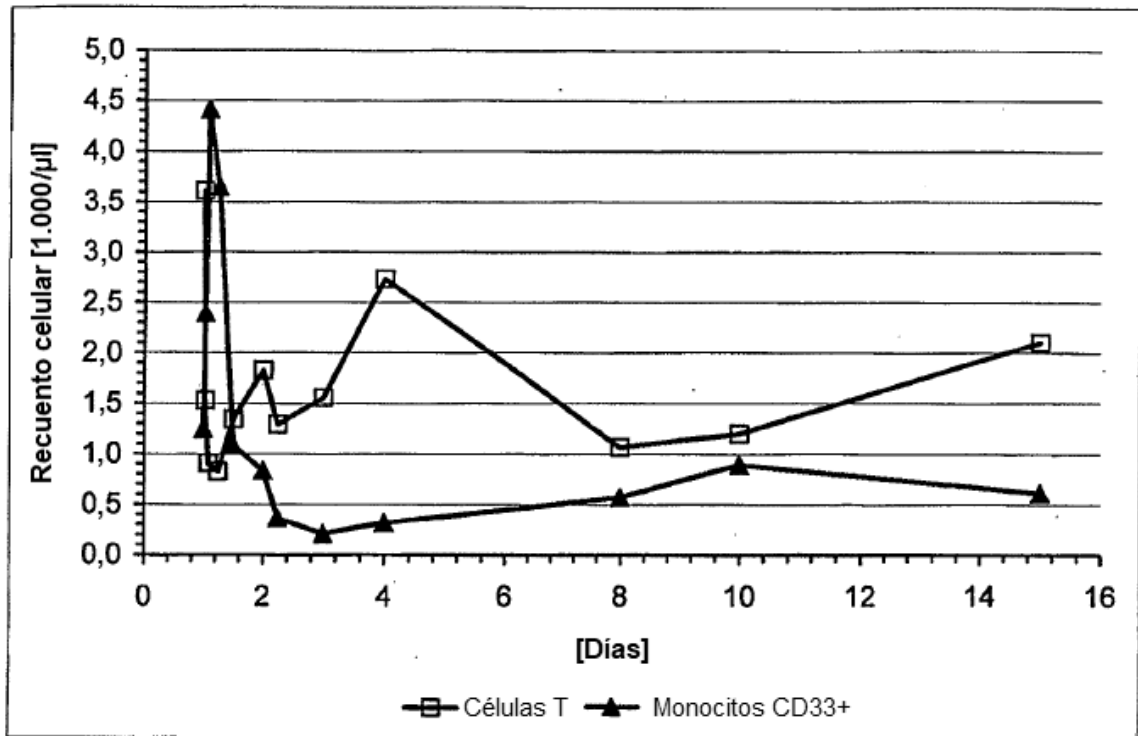


Figura 30 A

Animal 9 (120 µg/m²/24h CD33xCD3)



Animal 10 (120 µg/m²/24h CD33xCD3)

Figura 30 B (1)

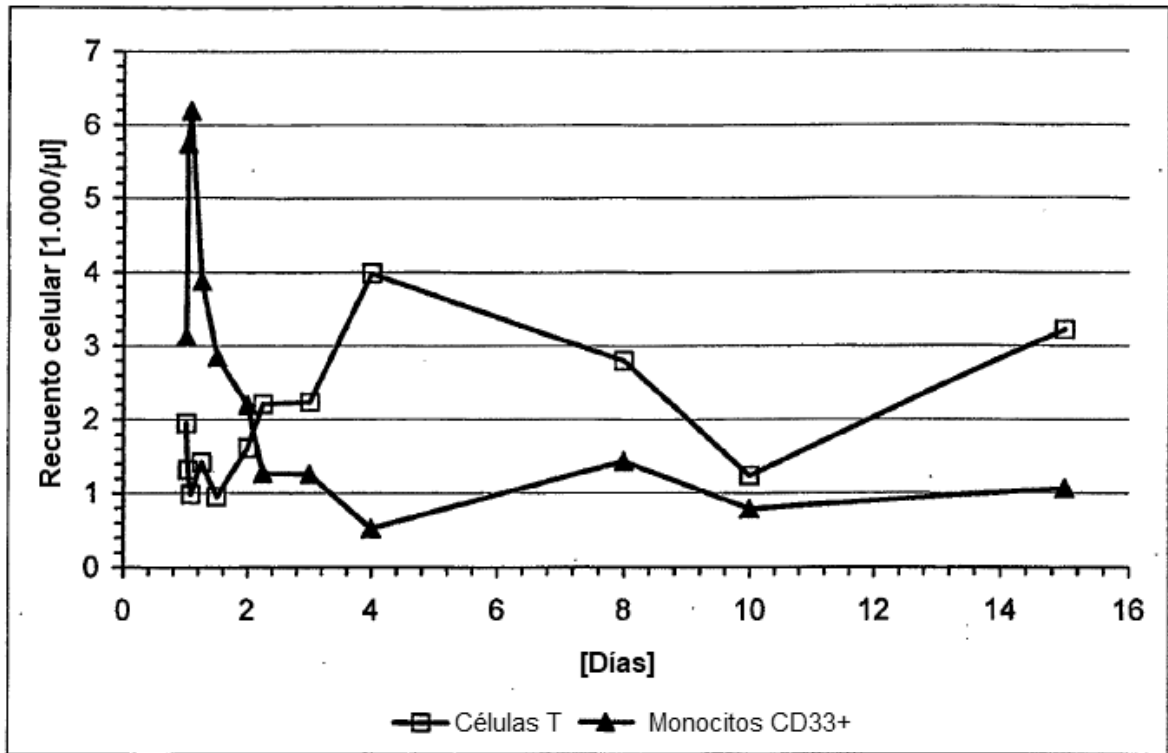


Figura 30 B (2)

Figura 31

Actividad citotóxica de material de ensayo de cynomolgus

MCSP-G4 VH-VL x I2C VH-VL

Células diana: CHO MCSP de cyno; células efectoras: 4119 LnPx

Relación E:D 10:1; duración del ensayo 18 h

CE50: 1,9 ng/ml

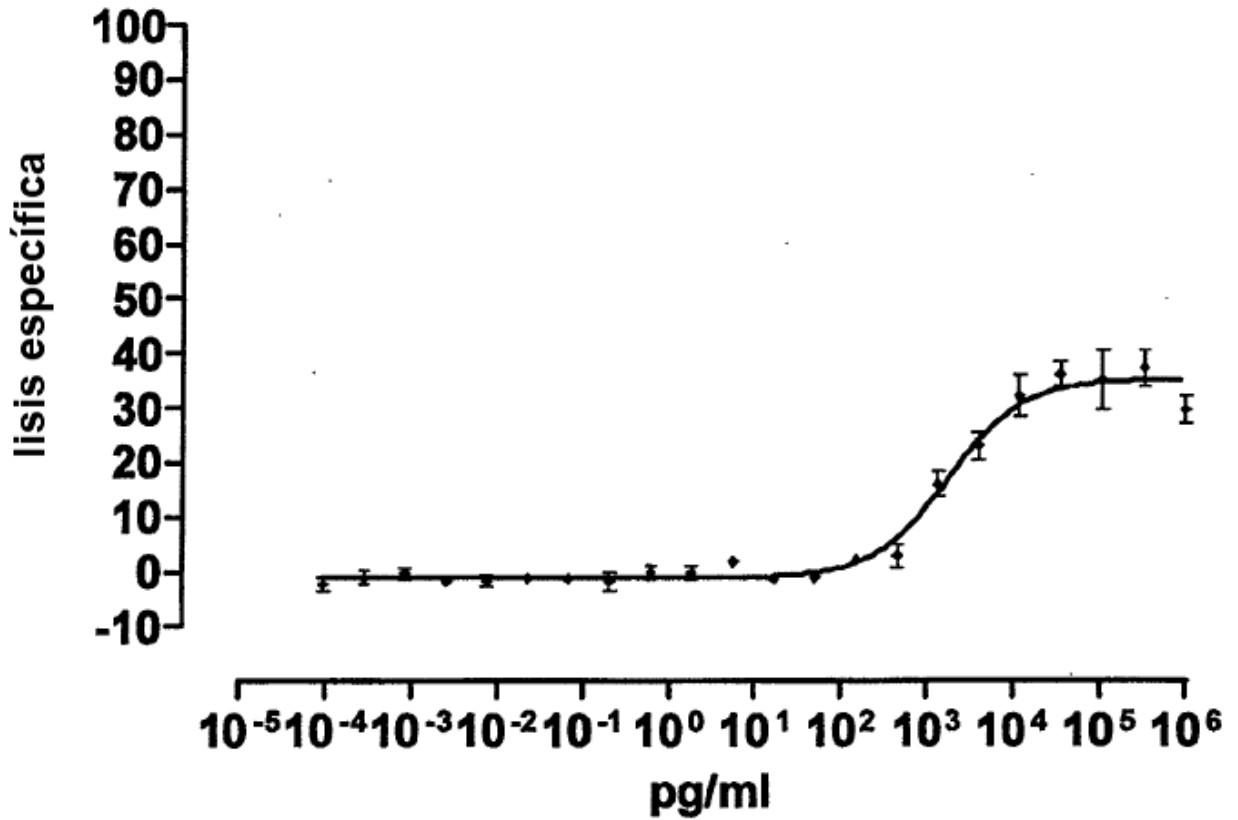
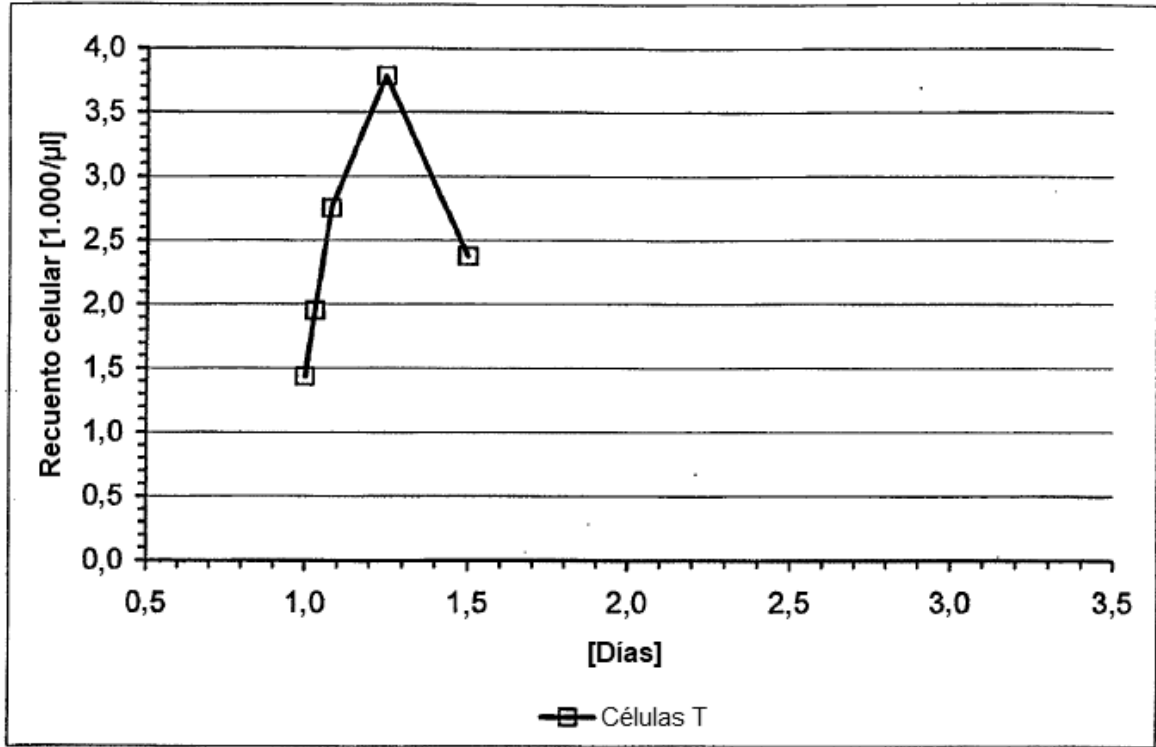


Figura 32 (1)

Animal 1 (60 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$ MCSP-G4 VH-VL x I2C VH-VL)



Animal 2 (240 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$ MCSP-G4 VH-VL x I2C VH-VL)

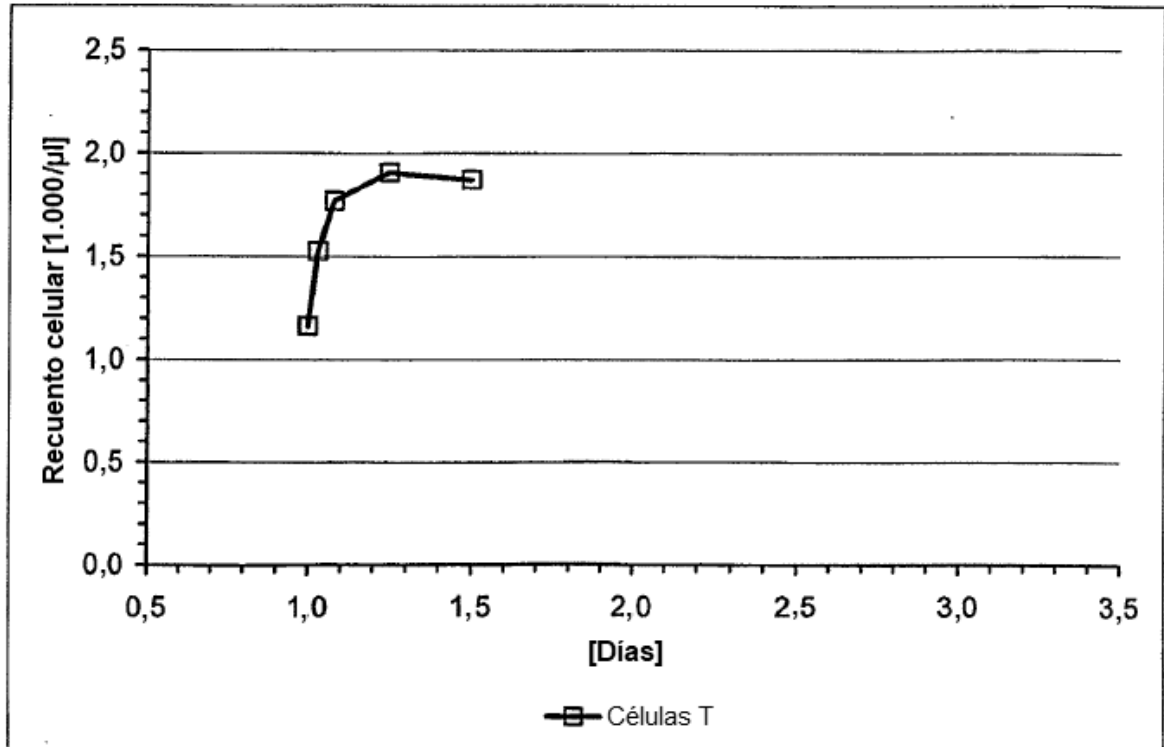
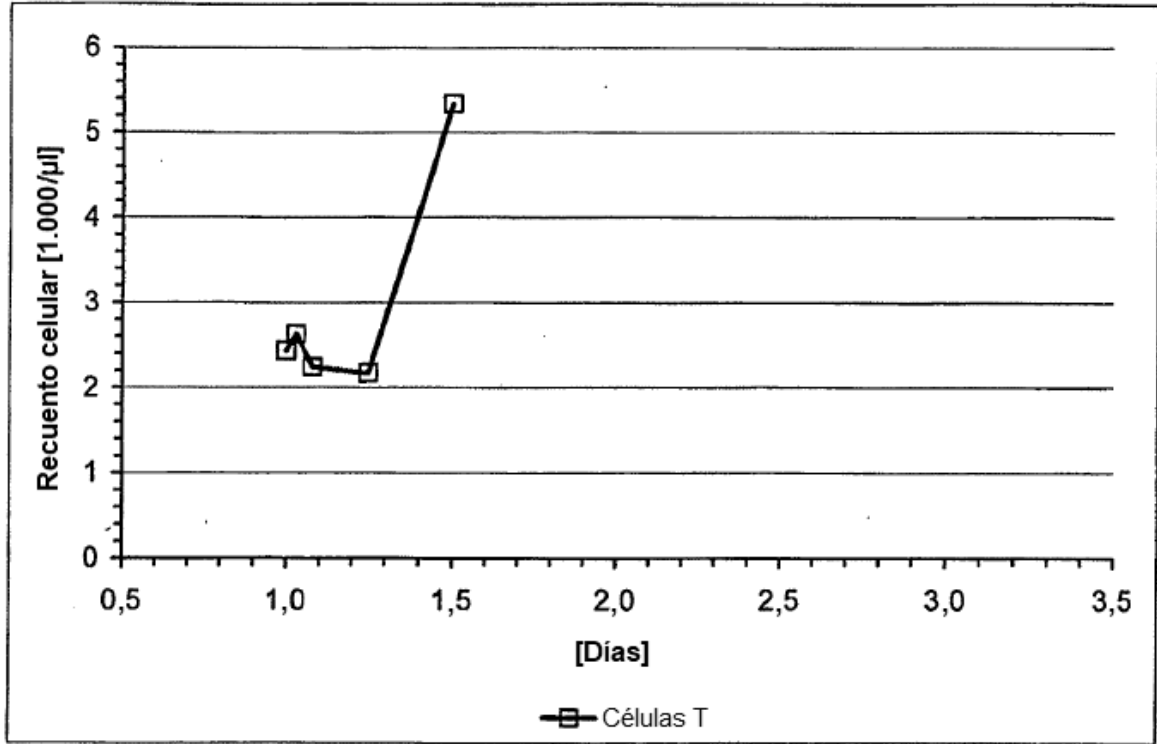
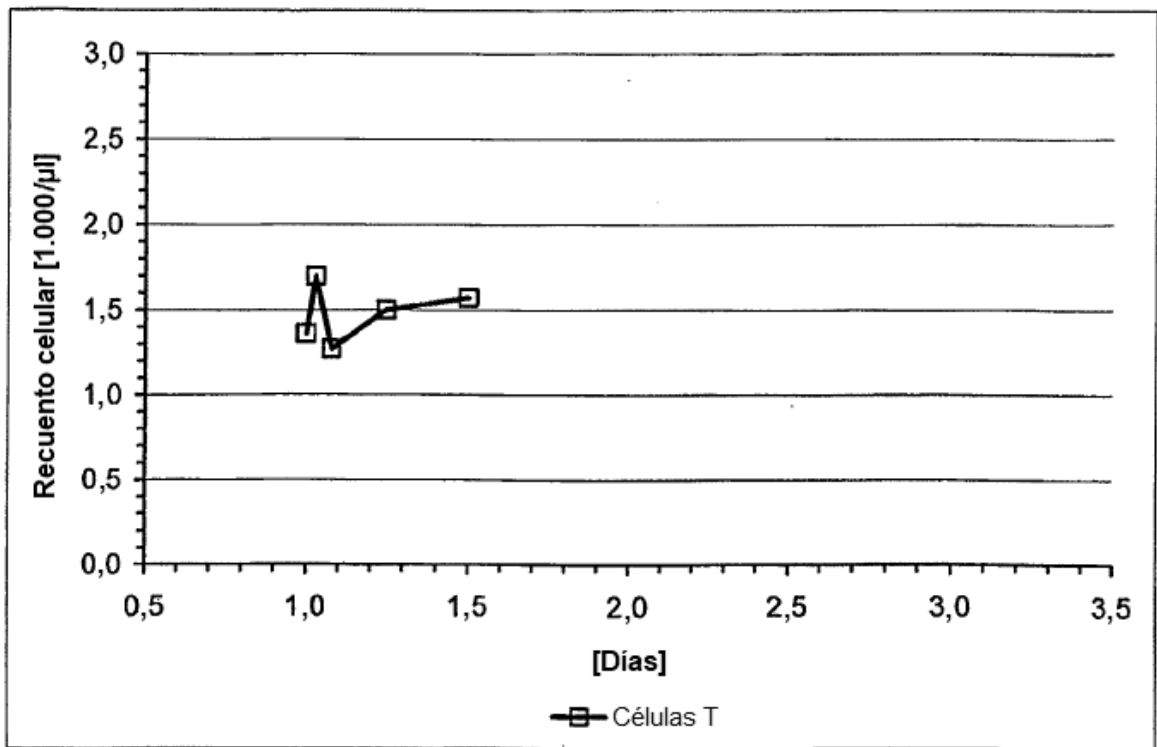


Figura 32 (2)

Animal 3 (240 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$ MCSP-G4 VH-VL x I2C VH-VL)

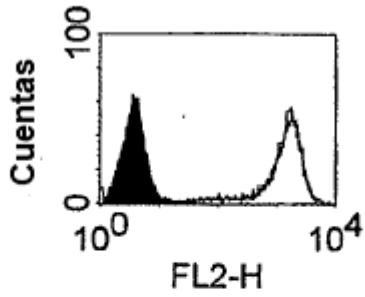


Animal 4 (1000 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$ MCSP-G4 VH-VL x I2C VH-VL)



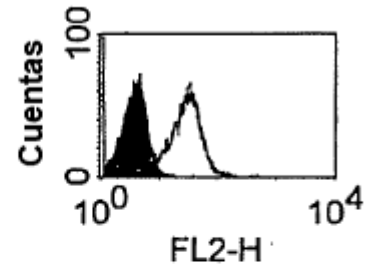
CHO transfectadas con CD33 humano

AH11HLxF12QHL



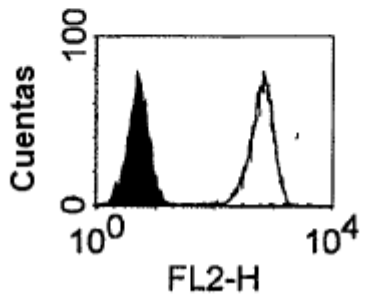
HPB-ALL

AH11HLxF12QHL



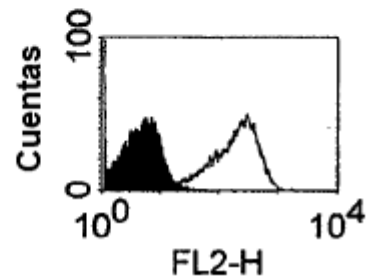
CHO transfectadas con CD33 de macaco

AH11HLxF12QHL



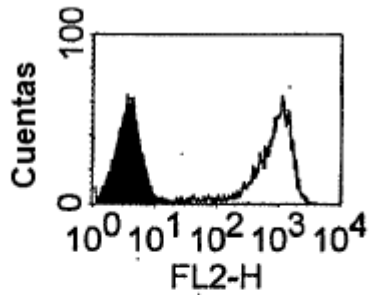
PBMC de macaco

AH11HLxF12QHL



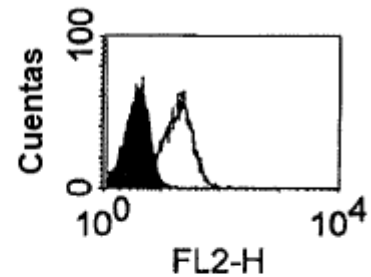
CHO transfectadas con CD33 humano

AH11HLxH2CHL



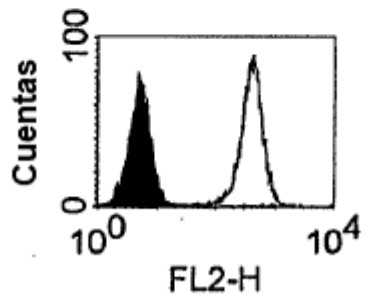
HPB-ALL

AH11HLxH2CHL



CHO transfectadas con CD33 de macaco

AH11HLxH2CHL



PBMC de macaco

AH11HLxH2CHL

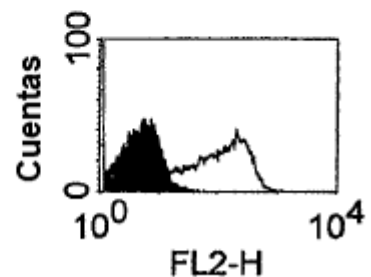
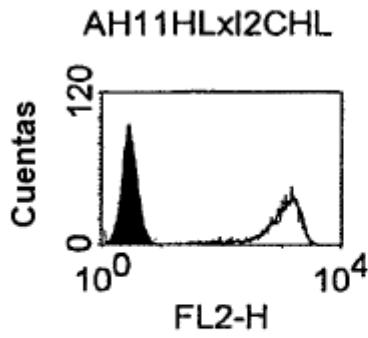
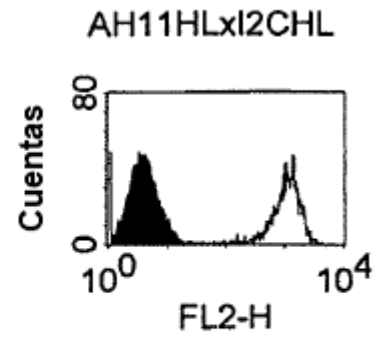


Figura 33(1)

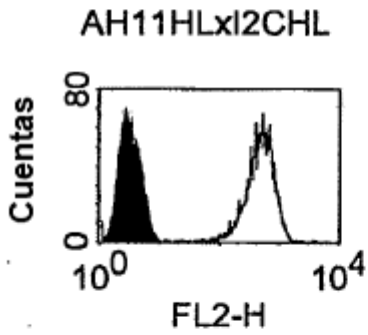
CHO transfectadas con CD33 humano



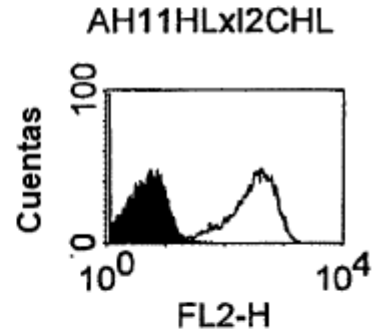
HPB-ALL



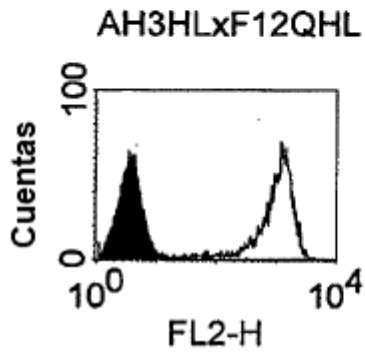
CHO transfectadas con CD33 de macaco



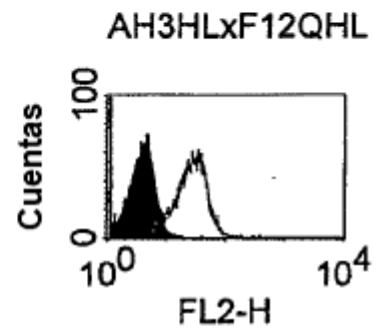
PBMC de macaco



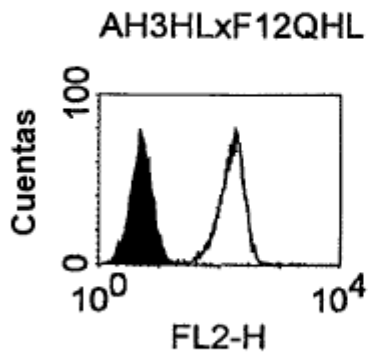
CHO transfectadas con CD33 humano



HPB-ALL



CHO transfectadas con CD33 de macaco



PBMC de macaco

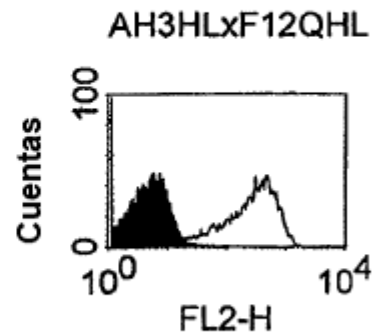


Figura 33(2)

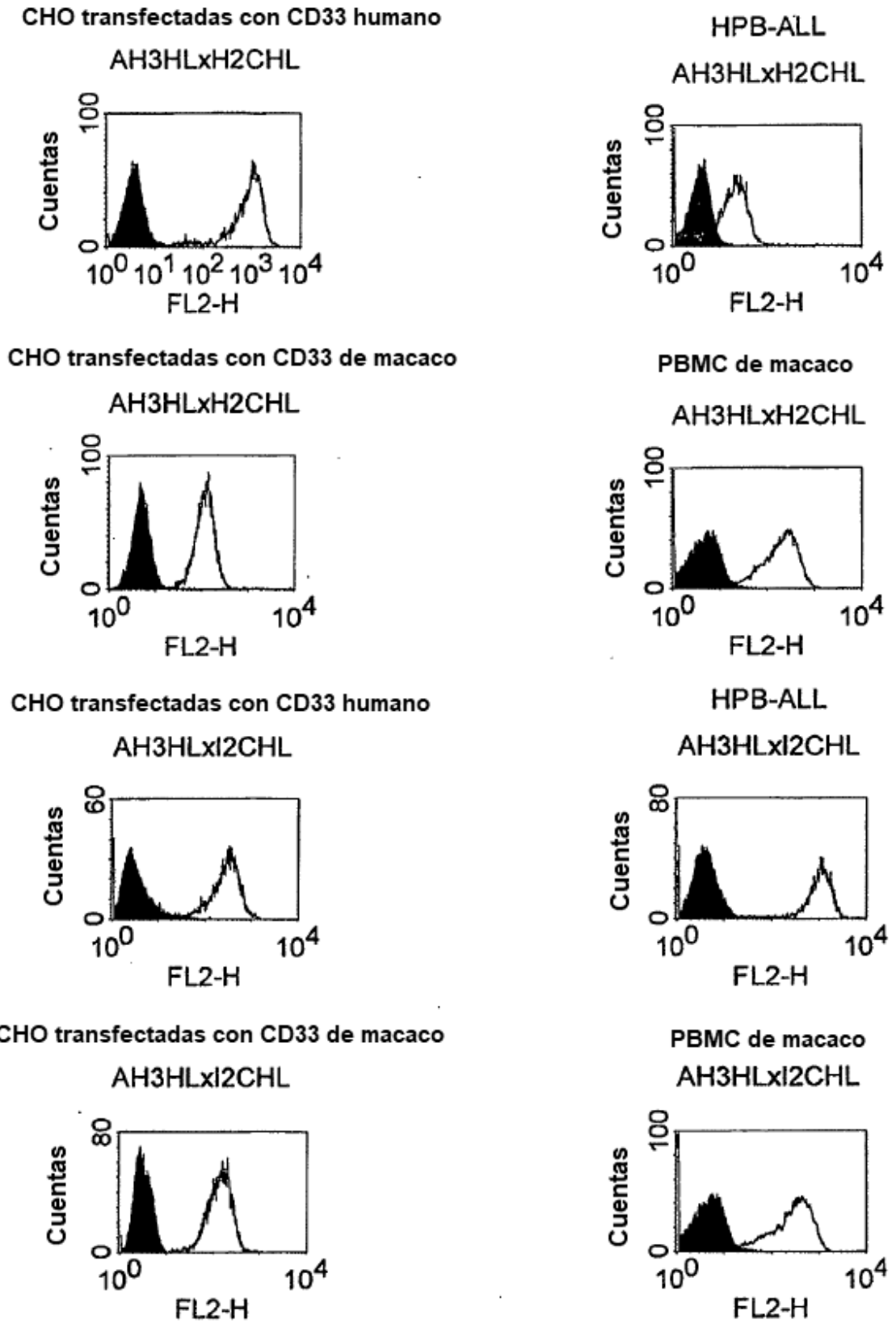
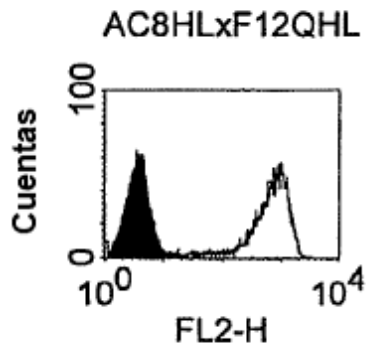
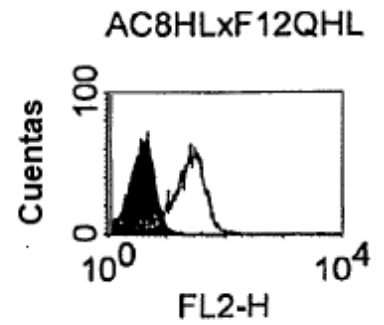


Figura 33(3)

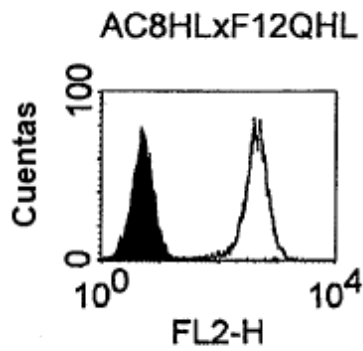
CHO transfectadas con CD33 humano



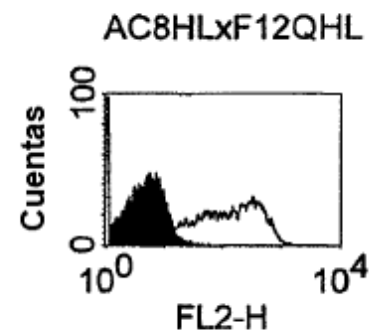
HPB-ALL



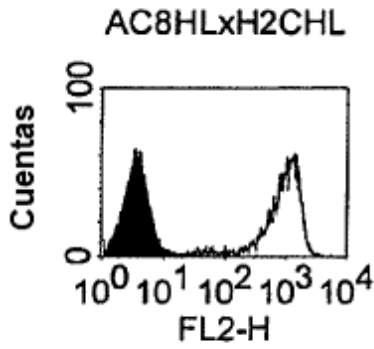
CHO transfectadas con CD33 de macaco



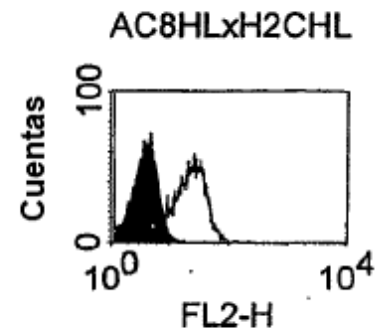
PBMC de macaco



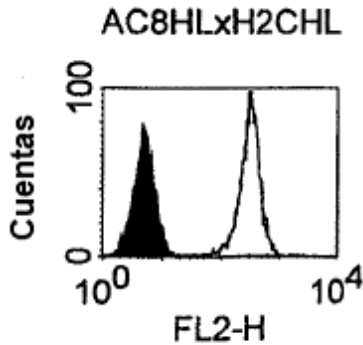
CHO transfectadas con CD33 humano



HPB-ALL



CHO transfectadas con CD33 de macaco



PBMC de macaco

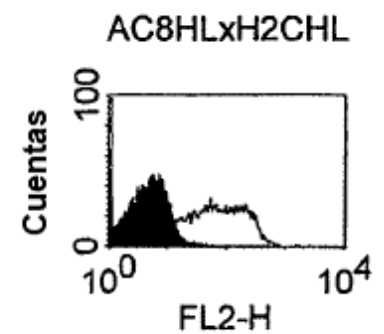
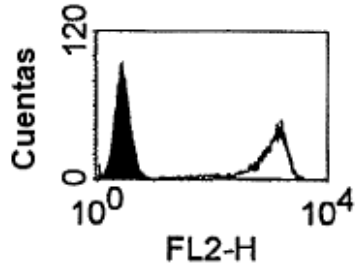


Figura 33(4)

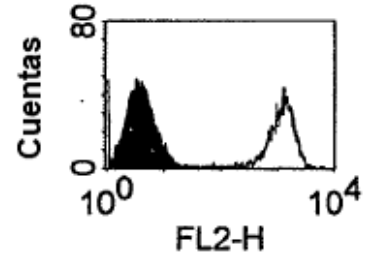
CHO transfectadas con CD33 humano

AC8HLxI2CHL



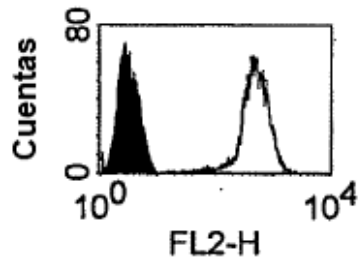
HPB-ALL

AC8HLxI2CHL



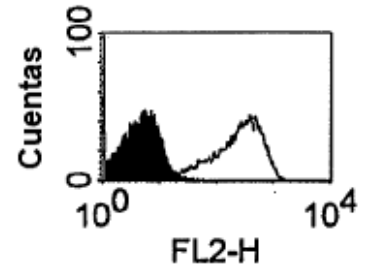
CHO transfectadas con CD33 de macaco

AC8HLxI2CHL



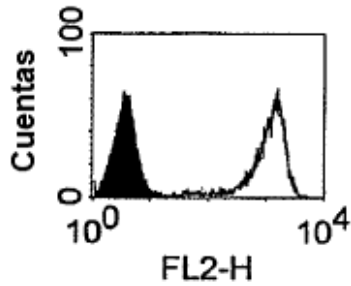
PBMC de macaco

AC8HLxI2CHL



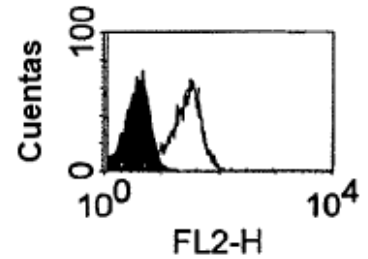
CHO transfectadas con CD33 humano

AF5HLxF12QHL



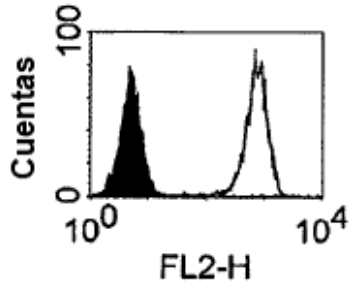
HPB-ALL

AF5HLxF12QHL



CHO transfectadas con CD33 de macaco

AF5HLxF12QHL



PBMC de macaco

AF5HLxF12QHL

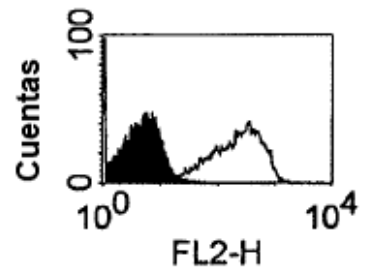
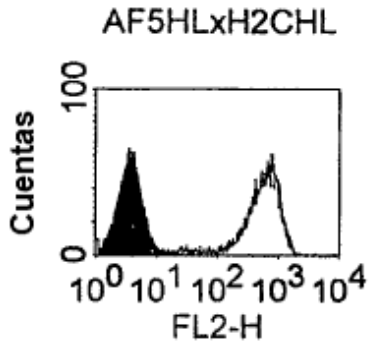
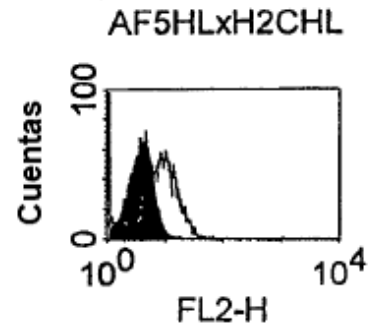


Figura 33(5)

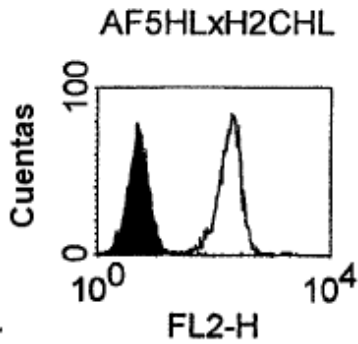
CHO transfectadas con CD33 humano



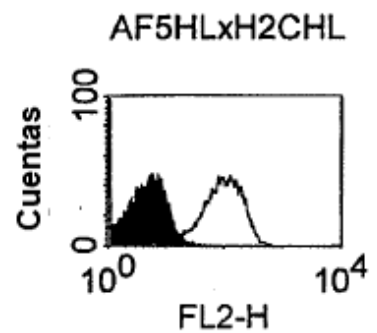
HPB-ALL



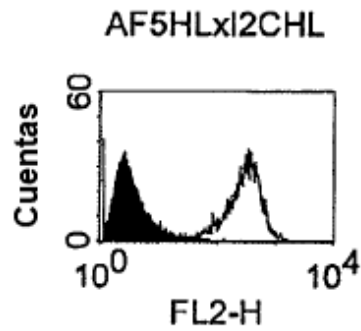
CHO transfectadas con CD33 de macaco



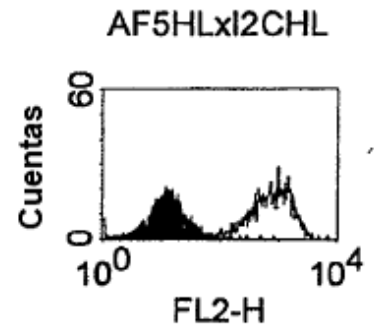
PBMC de macaco



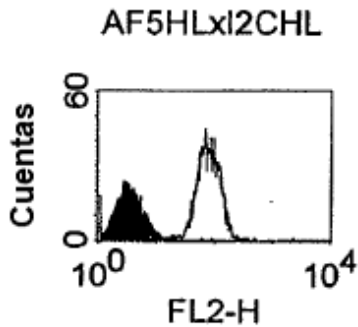
CHO transfectadas con CD33 humano



HPB-ALL



CHO transfectadas con CD33 de macaco



PBMC de macaco

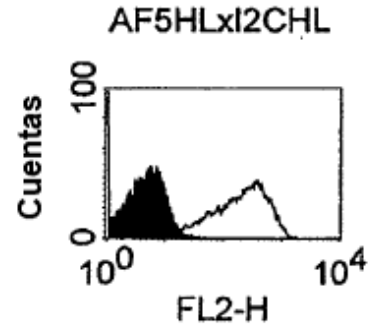
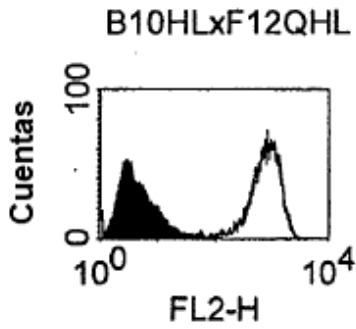
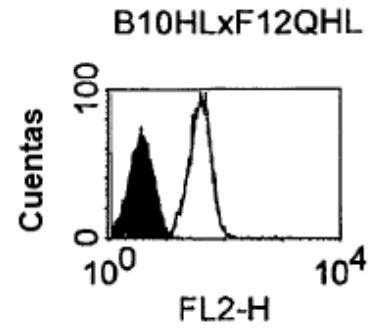


Figura 33(6)

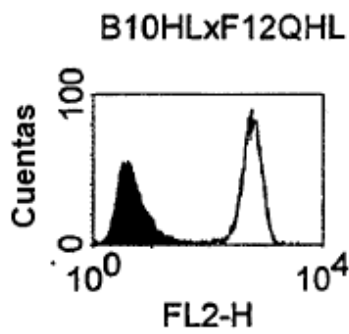
CHO transfectadas con CD33 humano



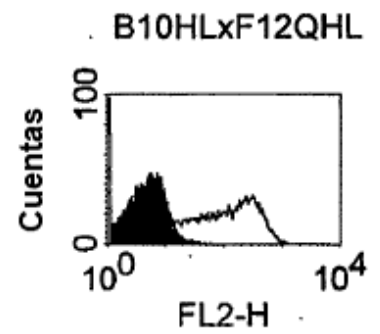
HPB-ALL



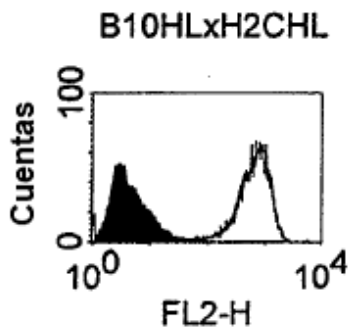
CHO transfectadas con CD33 de macaco



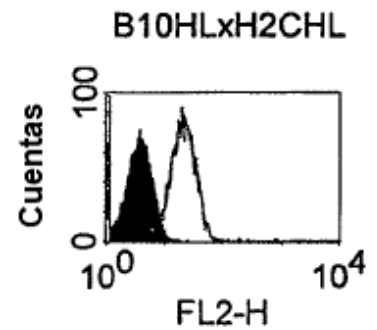
PBMC de macaco



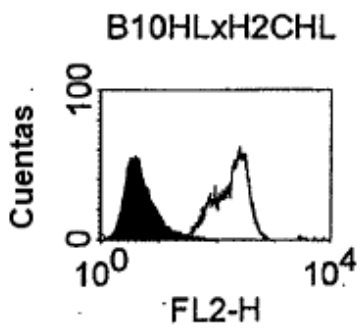
CHO transfectadas con CD33 humano



HPB-ALL



CHO transfectadas con CD33 de macaco



PBMC de macaco

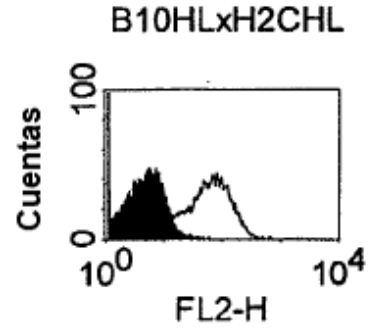
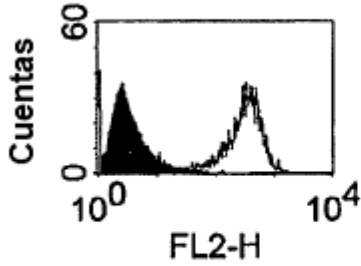


Figura 33(7)

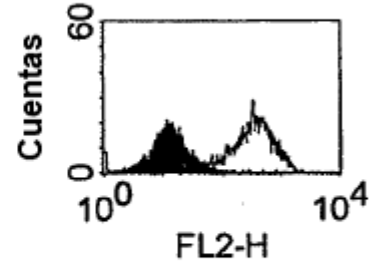
CHO transfectadas con CD33 humano

B10HLxI2CHL



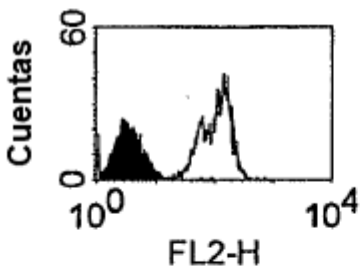
HPB-ALL

B10HLxI2CHL



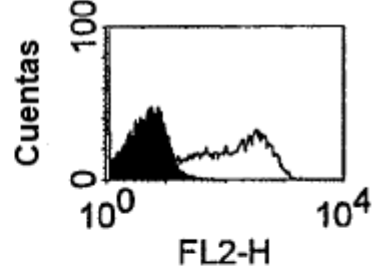
CHO transfectadas con CD33 de macaco

B10HLxI2CHL



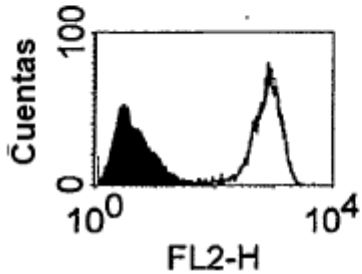
PBMC de macaco

B10HLxI2CHL



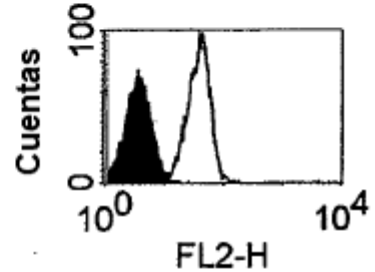
CHO transfectadas con CD33 humano

B3HLxF12QHL



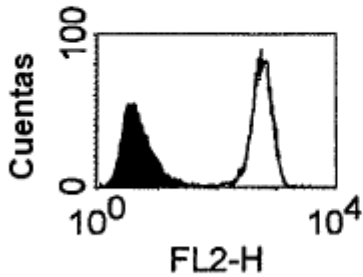
HPB-ALL

B3HLxF12QHL



CHO transfectadas con CD33 de macaco

B3HLxF12QHL



PBMC de macaco

B3HLxF12QHL

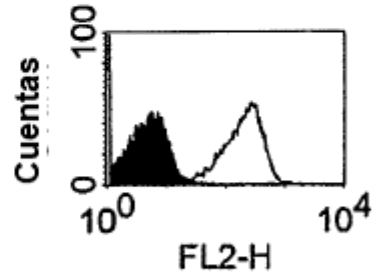
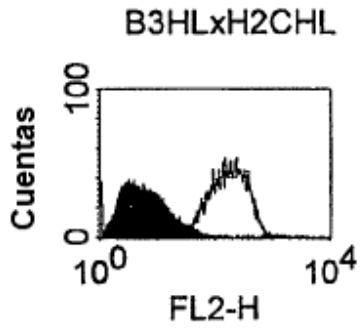
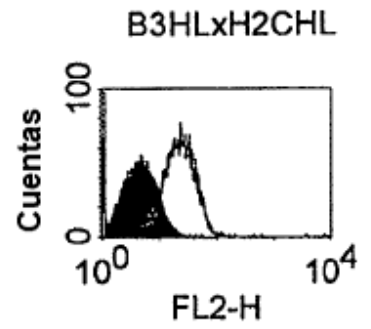


Figura 33(8)

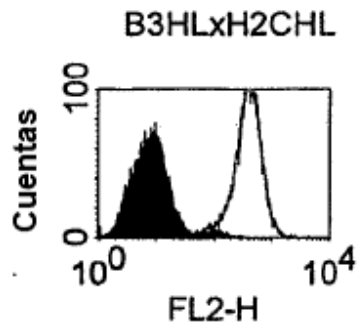
CHO transfectadas con CD33 humano



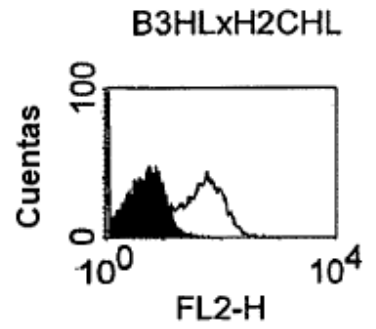
HPB-ALL



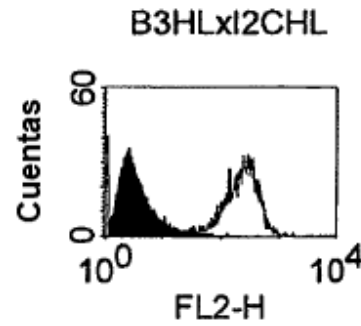
CHO transfectadas con CD33 de macaco



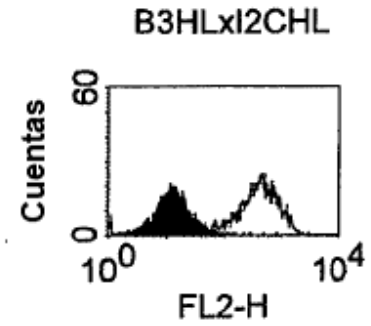
PBMC de macaco



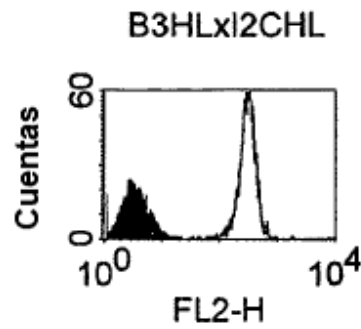
CHO transfectadas con CD33 humano



HPB-ALL



CHO transfectadas con CD33 de macaco



PBMC de macaco

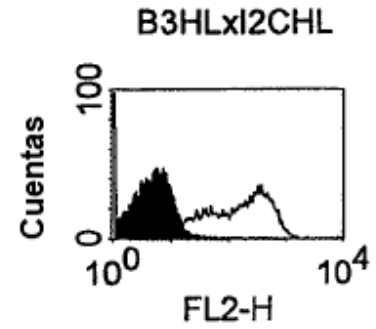
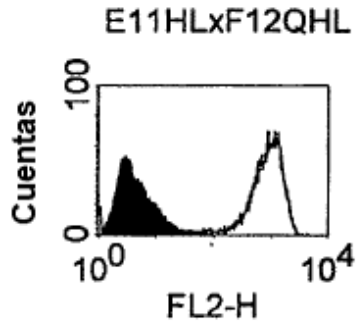
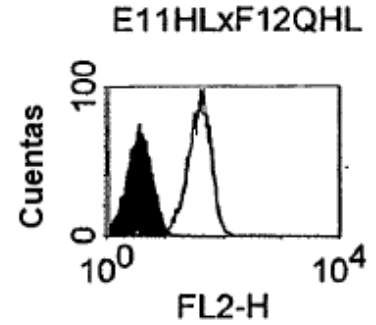


Figura 33(9)

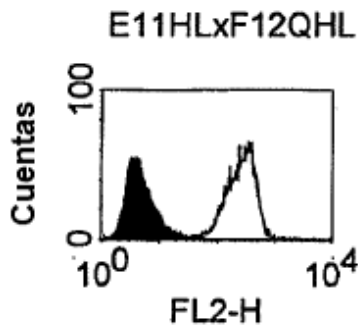
CHO transfectadas con CD33 humano



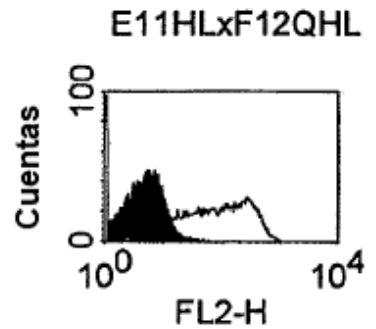
HPB-ALL



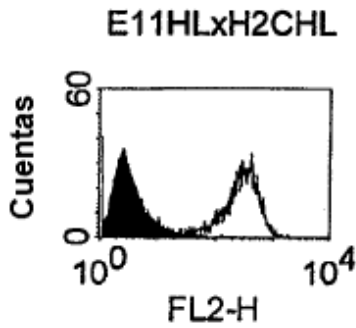
CHO transfectadas con CD33 de macaco



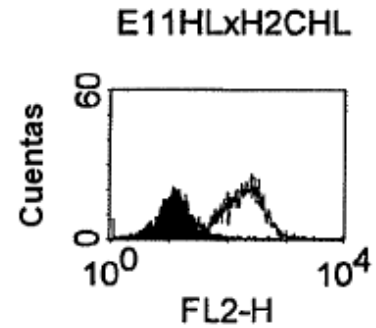
PBMC de macaco



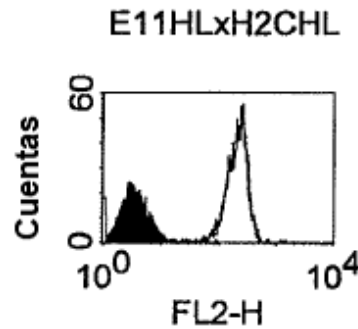
CHO transfectadas con CD33 humano



HPB-ALL



CHO transfectadas con CD33 de macaco



PBMC de macaco

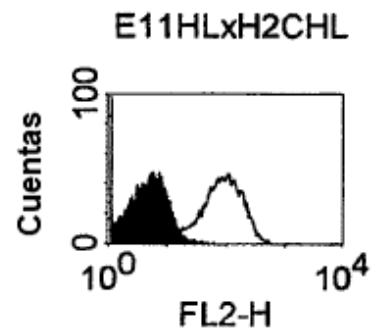
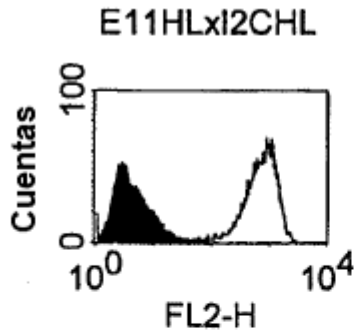
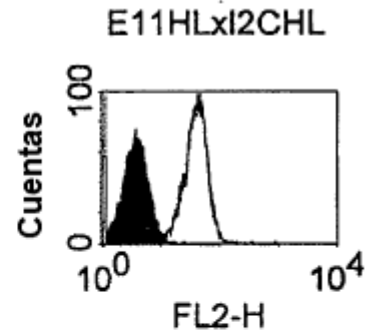


Figura 33(10)

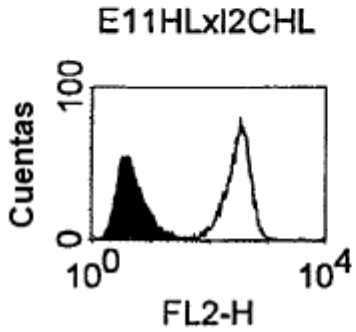
CHO transfectadas con CD33 humano



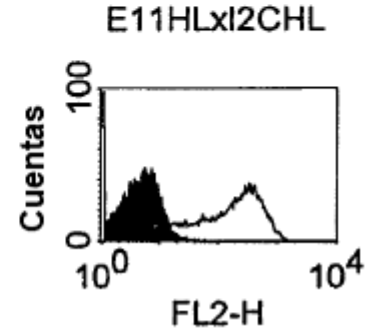
HPB-ALL



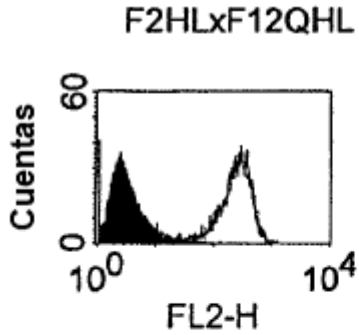
CHO transfectadas con CD33 de macaco



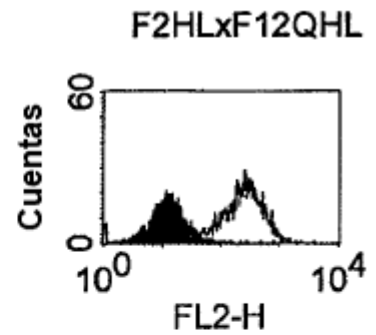
PBMC de macaco



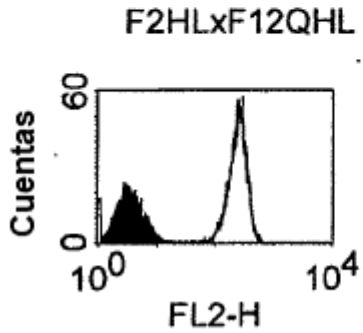
CHO transfectadas con CD33 humano



HPB-ALL



CHO transfectadas con CD33 de macaco



PBMC de macaco

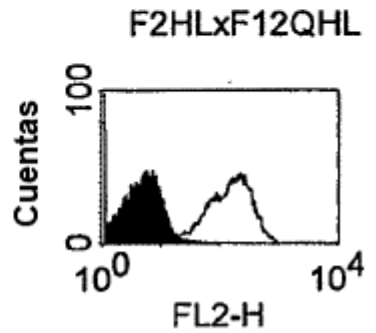
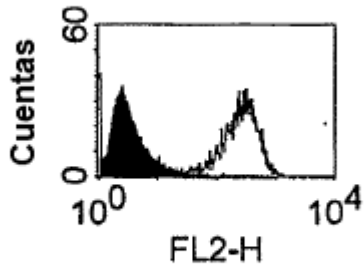


Figura 33(11)

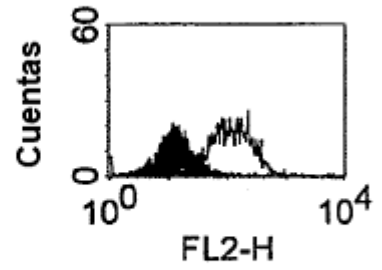
CHO transfectadas con CD33 humano

F2HLxH2CHL



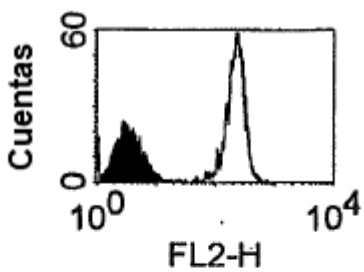
HPB-ALL

F2HLxH2CHL



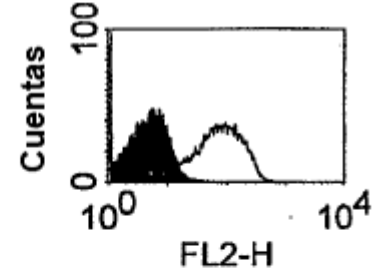
CHO transfectadas con CD33 de macaco

F2HLxH2CHL



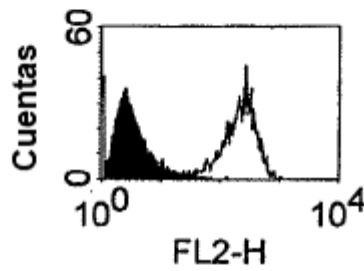
PBMC de macaco

F2HLxH2CHL



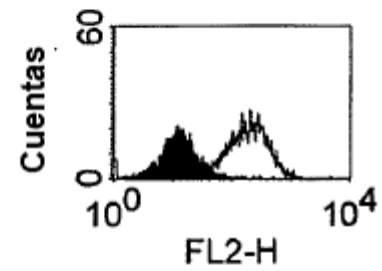
CHO transfectadas con CD33 humano

F2HLxI2CHL



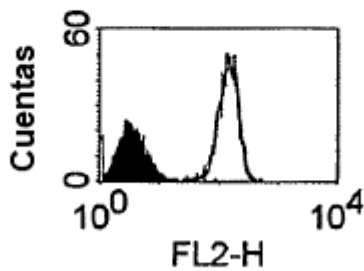
HPB-ALL

F2HLxI2CHL



CHO transfectadas con CD33 de macaco

F2HLxI2CHL



PBMC de macaco

F2HLxI2CHL

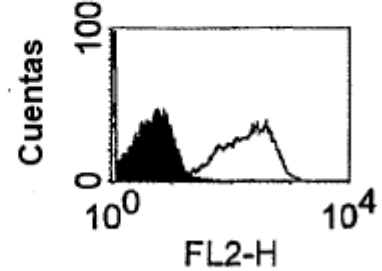
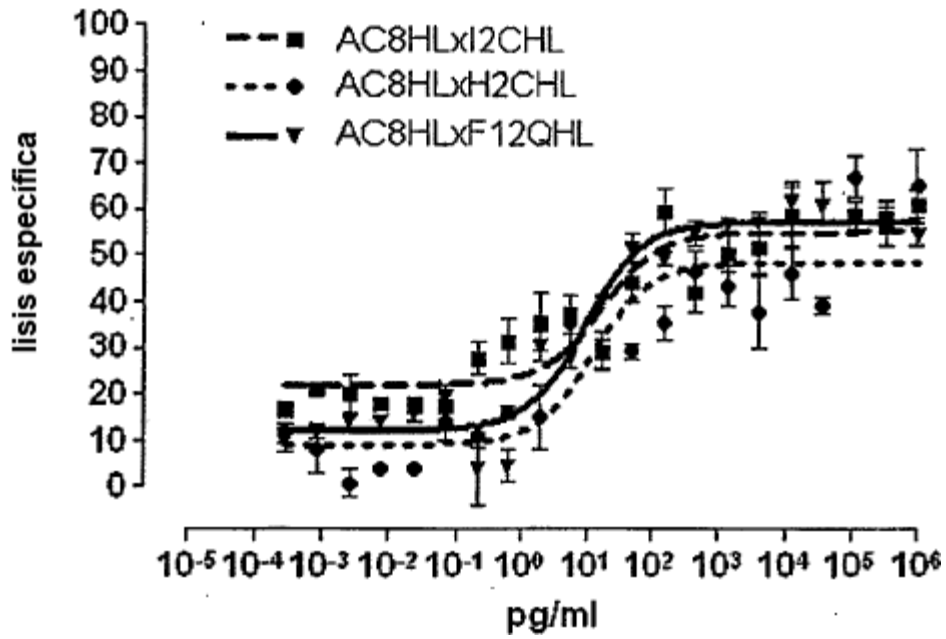


Figura 33(12)

Células efectoras: PBMC humanas deplecionadas de CD4/CD56 estimuladas

Células diana: CHO transfectadas con CD33 humano



Células efectoras: 4119 LnPx de macaco

Células diana: CHO transfectadas con CD33 de macaco

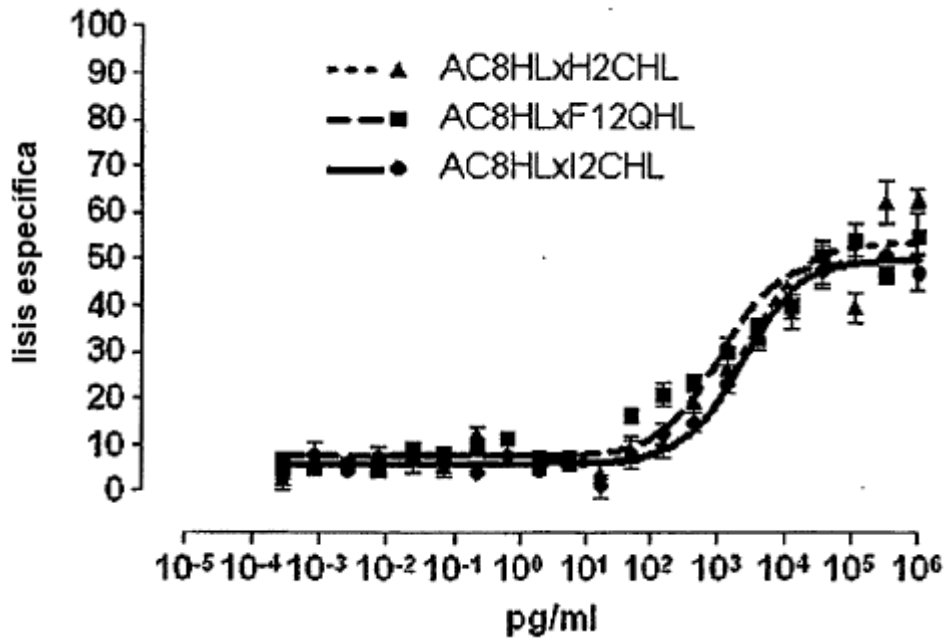
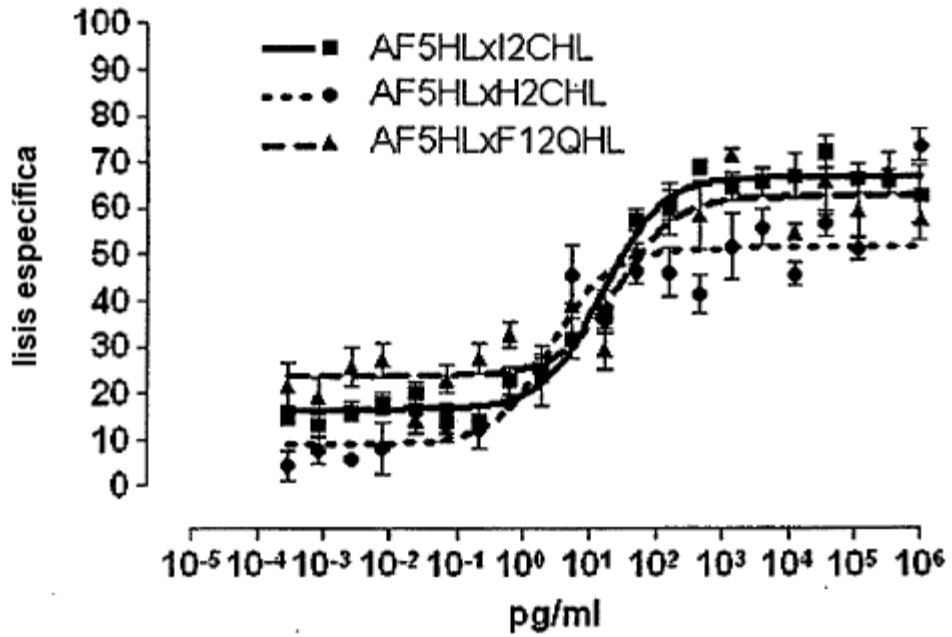


Figura 34(1)

Células efectoras: PBMC humanas deplecionadas de CD4/CD56 estimuladas

Células diana: CHO transfectadas con CD33 humano



Células efectoras: 4119 LnPx de macaco

Células diana: CHO transfectadas con CD33 de macaco

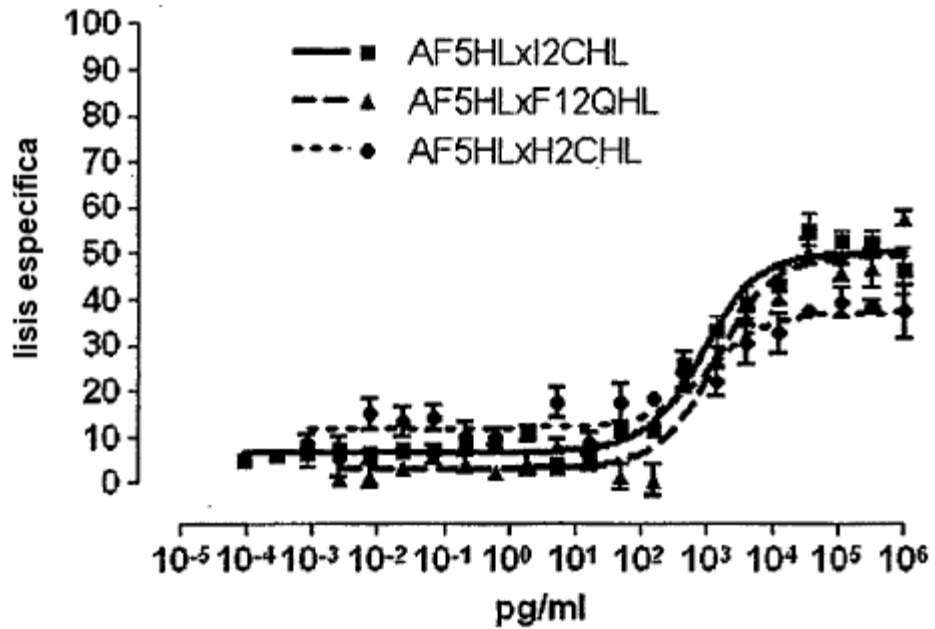
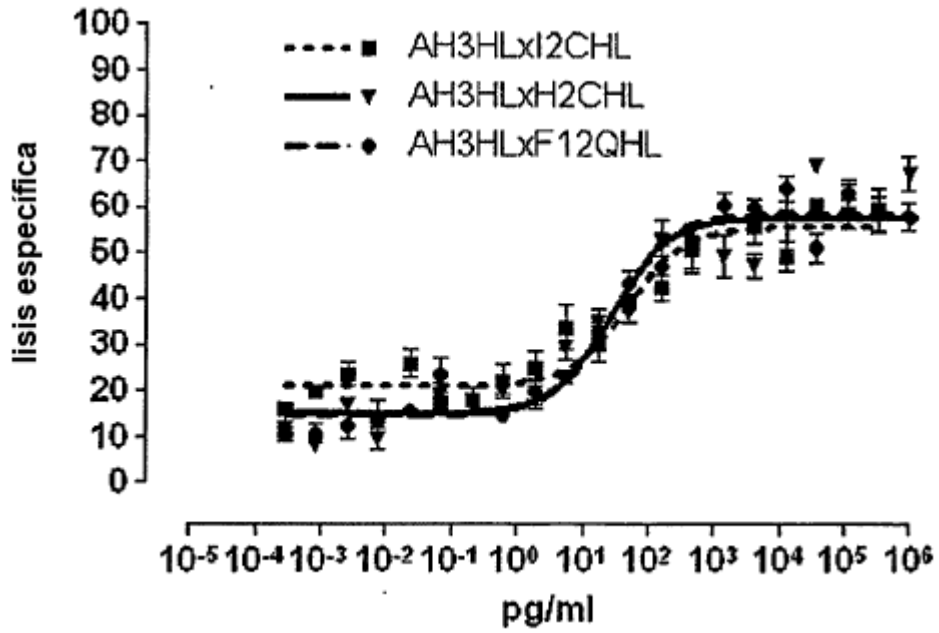


Figura 34(2)

Células efectoras: PBMC humanas deplecionadas de CD4/CD56 estimuladas

Células diana: CHO transfectadas con CD33 humano



Células efectoras: 4119 LnPx de macaco

Células diana: CHO transfectadas con CD33 de macaco

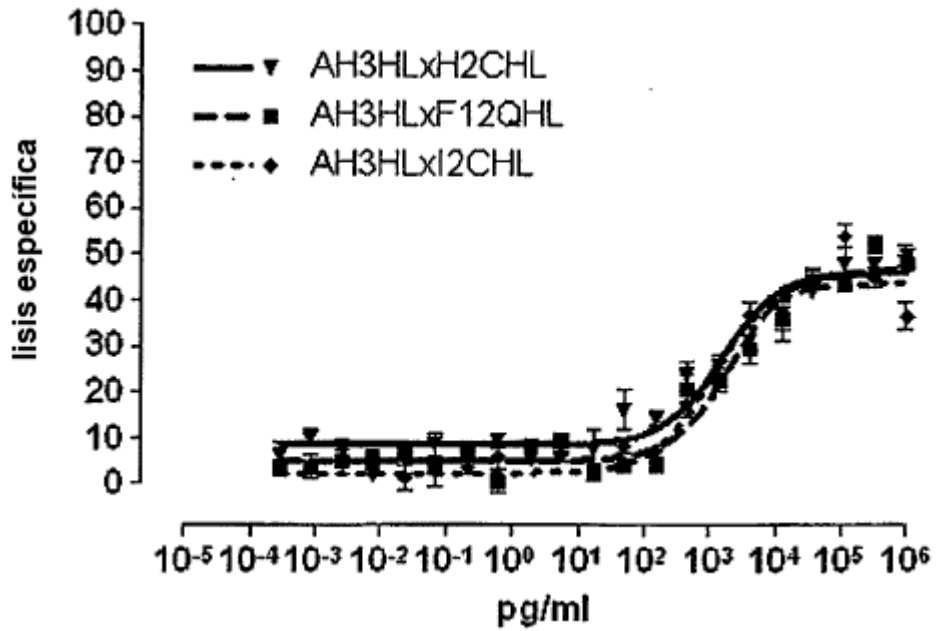
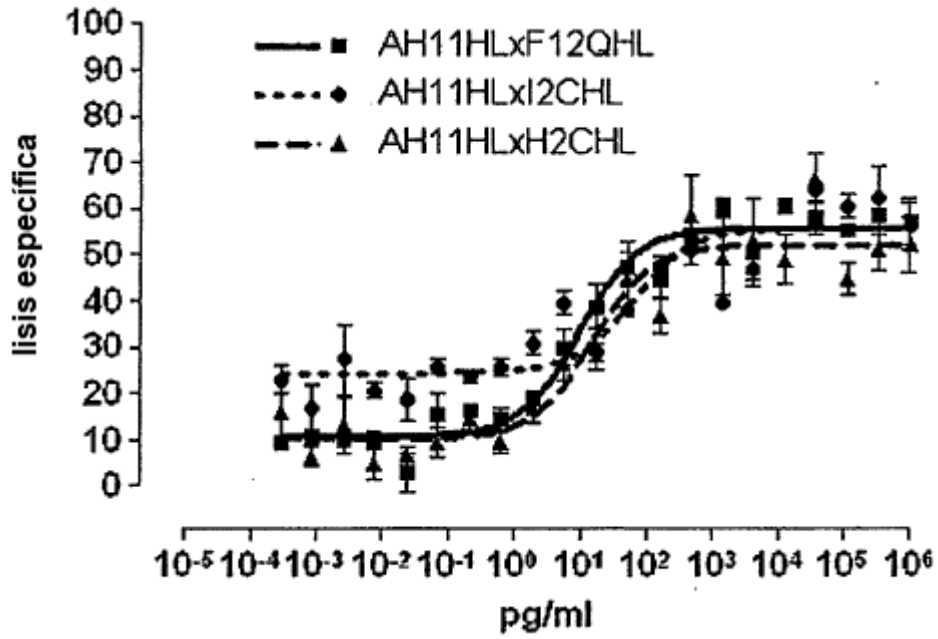


Figura 34(3)

Células efectoras: PBMC humanas deplecionadas de CD4/CD56 estimuladas

Células diana: CHO transfectadas con CD33 humano



Células efectoras: 4119 LnPx de macaco

Células diana: CHO transfectadas con CD33 de macaco

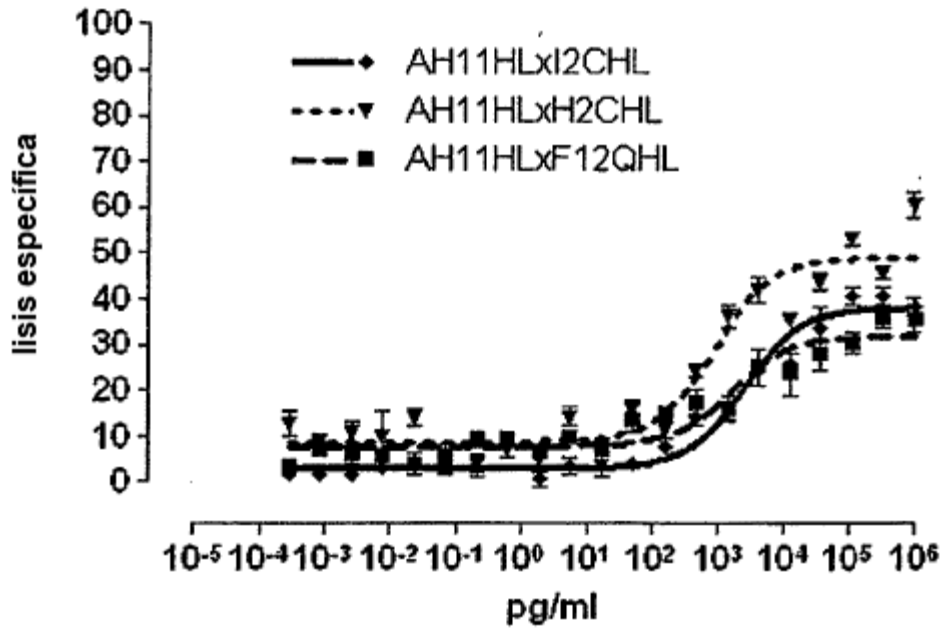
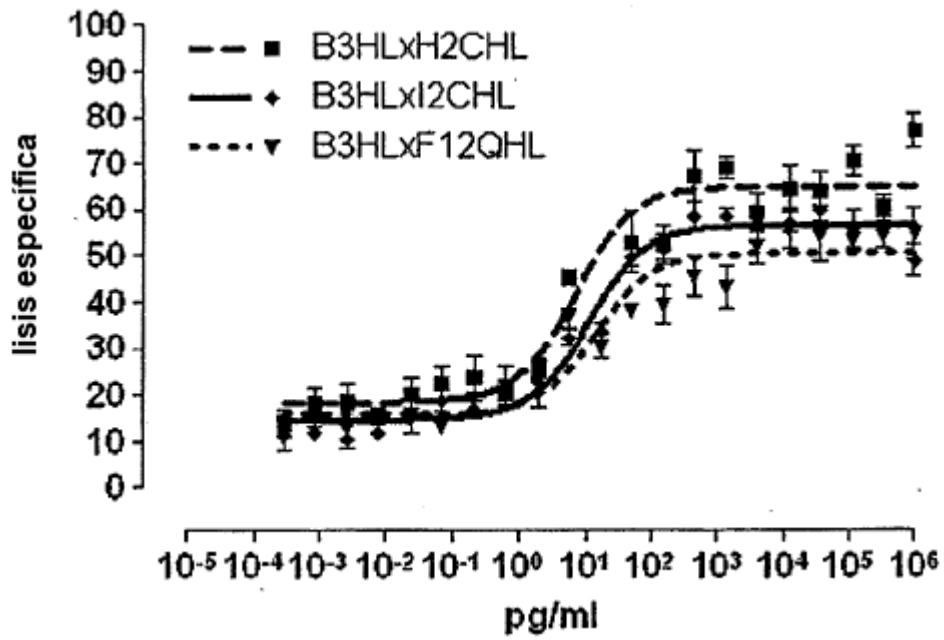


Figura 34(4)

Células efectoras: PBMC humanas deplecionadas de CD4/CD56 estimuladas

Células diana: CHO transfectadas con CD33 humano



Células efectoras: 4119 LnPx de macaco

Células diana: CHO transfectadas con CD33 de macaco

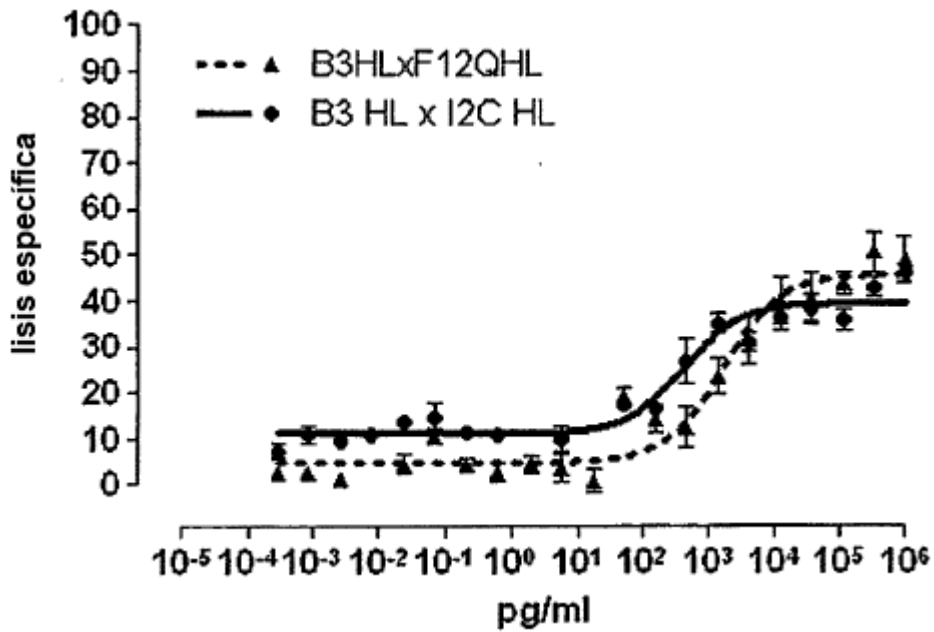
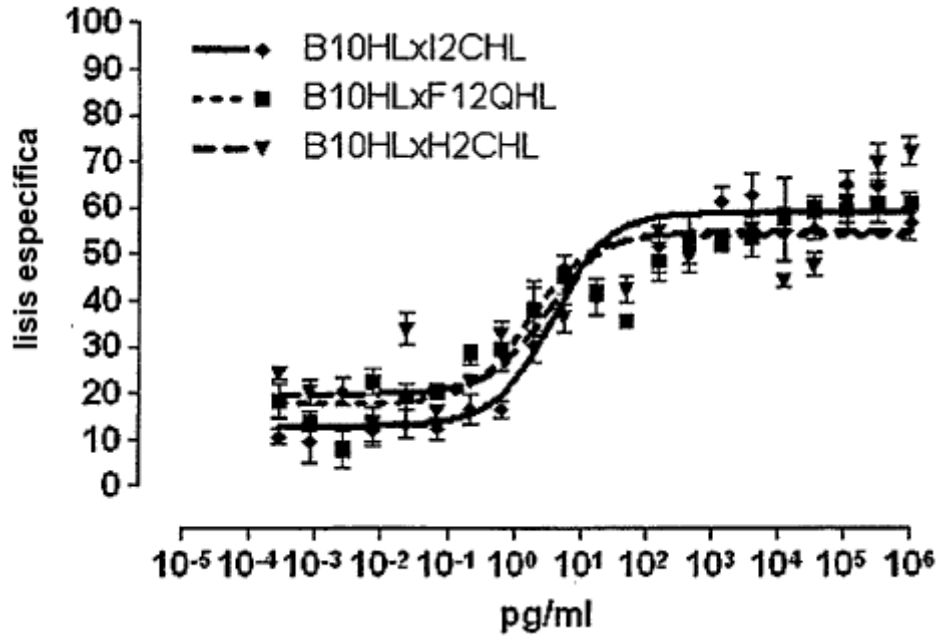


Figura 34(5)

Células efectoras: PBMC humanas deplecionadas de CD4/CD56 estimuladas

Células diana: CHO transfectadas con CD33 humano



Células efectoras: 4119 LnPx de macaco

Células diana: CHO transfectadas con CD33 de macaco

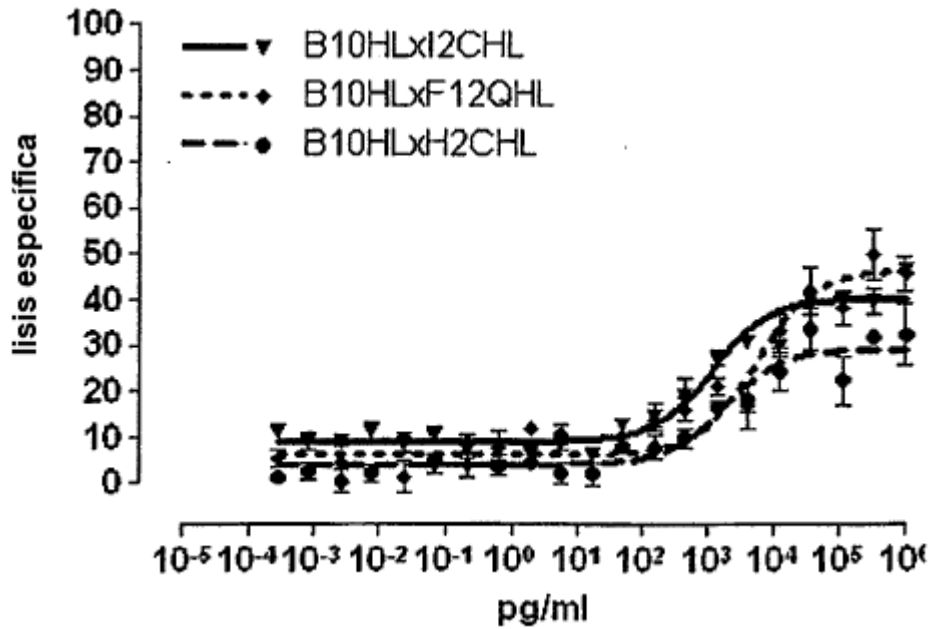
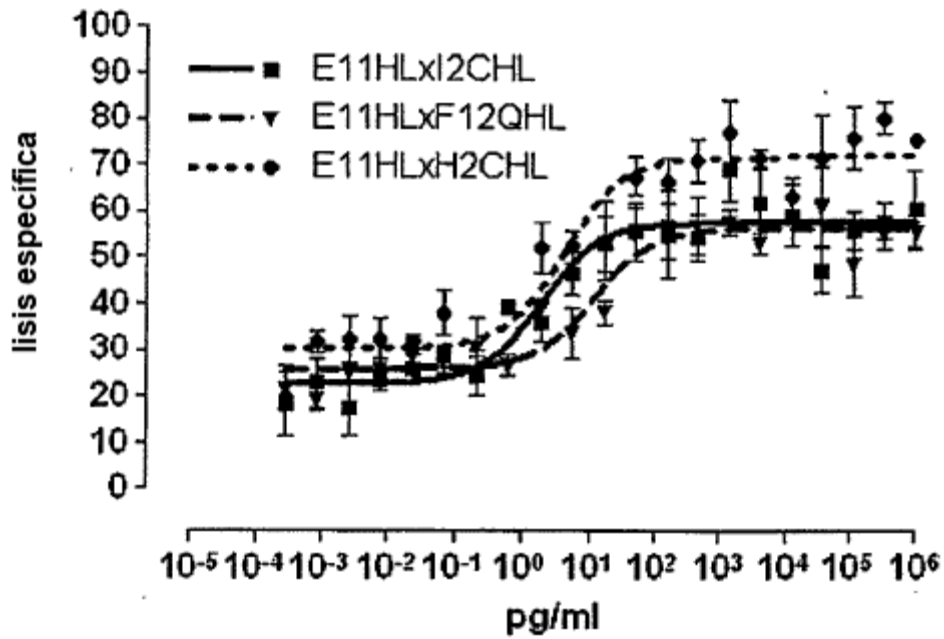


Figura 34(6)

Células efectoras: PBMC humanas deplecionadas de CD4/CD56 estimuladas

Células diana: CHO transfectadas con CD33 humano



Células efectoras: 4119 LnPx de macaco

Células diana: CHO transfectadas con CD33 de macaco

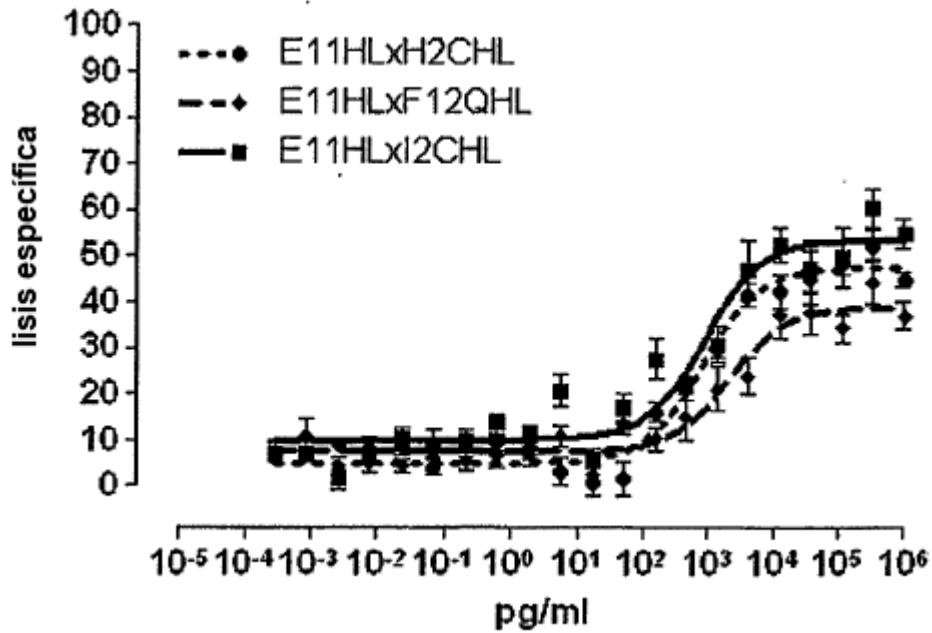
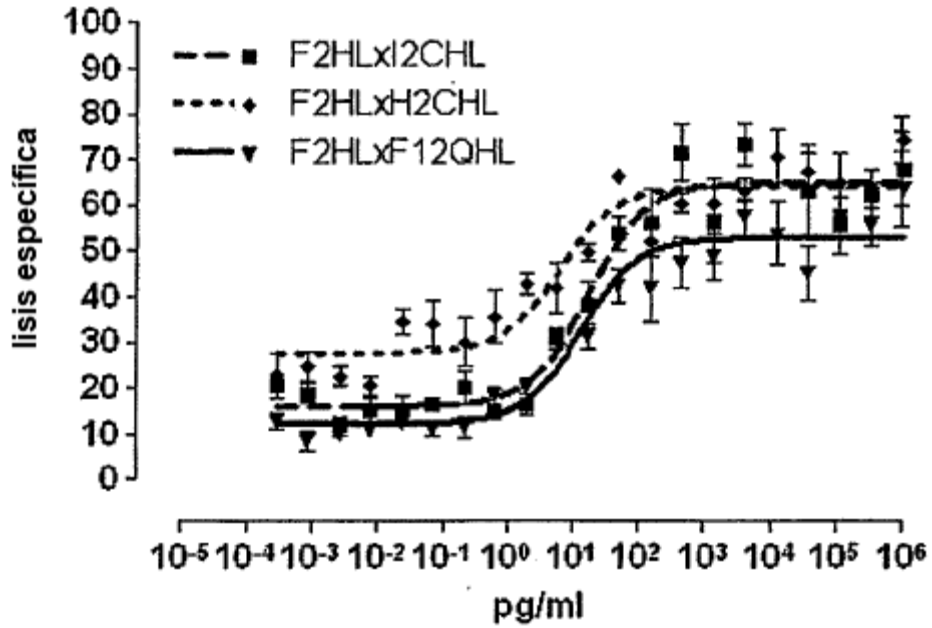


Figura 34(7)

Células efectoras: PBMC humanas deplecionadas de CD4/CD56 estimuladas

Células diana: CHO transfectadas con CD33 humano



Células efectoras: 4119 LnPx de macaco

Células diana: CHO transfectadas con CD33 de macaco

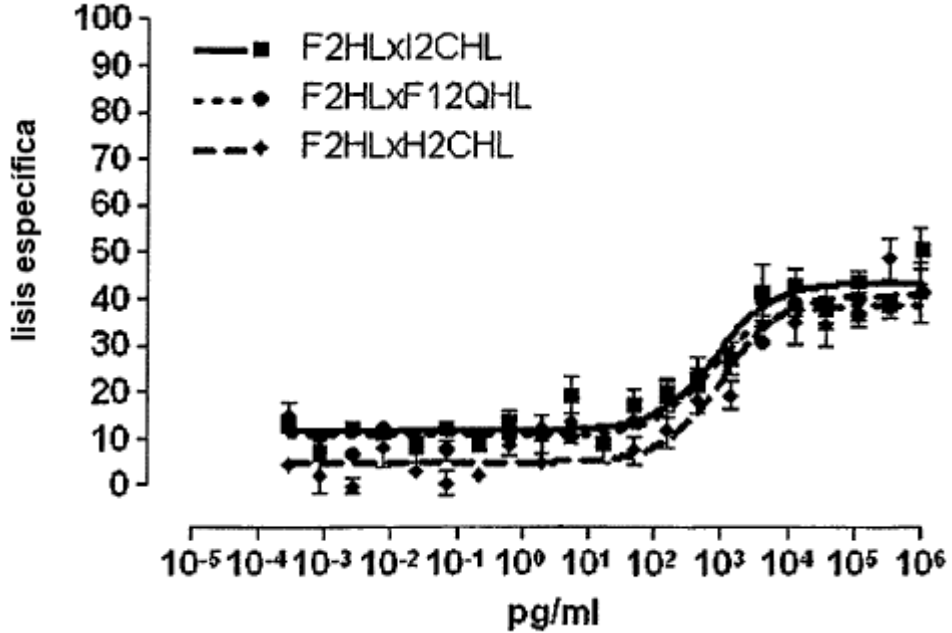
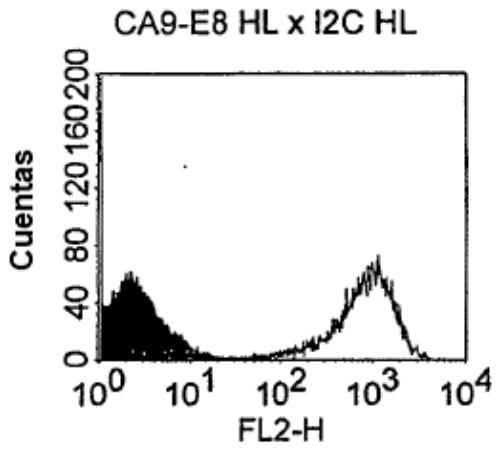
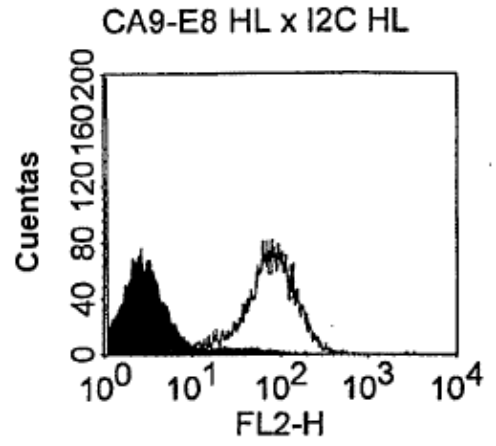


Figura 34(8)

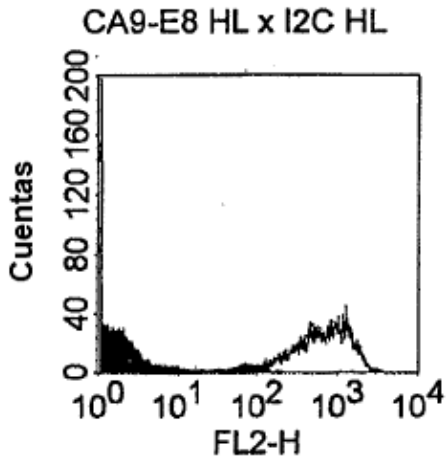
CHO transfectadas con CAIX humano



HPB-ALL



CHO transfectadas con CAIX de macaco



4119 LnPx

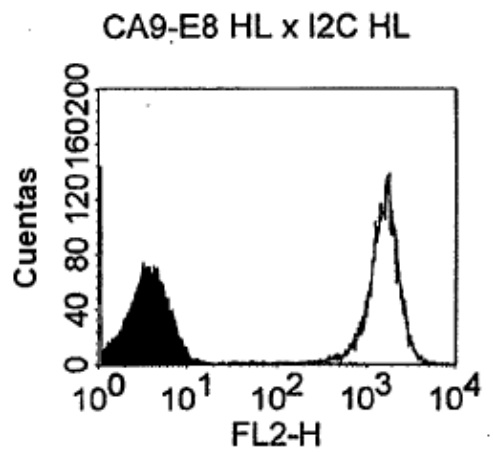
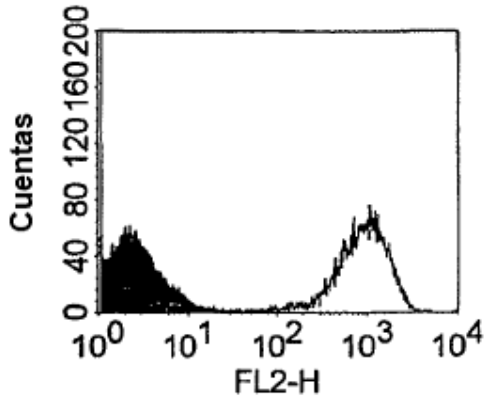


Figura 35a

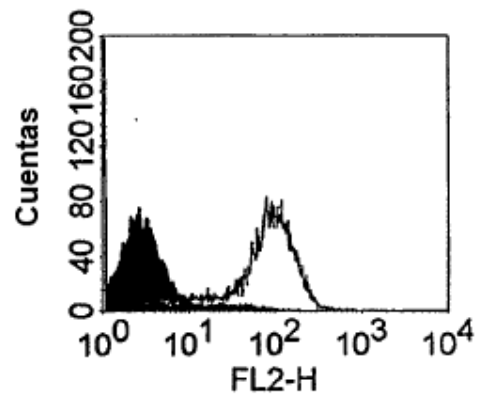
CHO transfectadas con CAIX humano

CA9-A8 HL x I2C HL



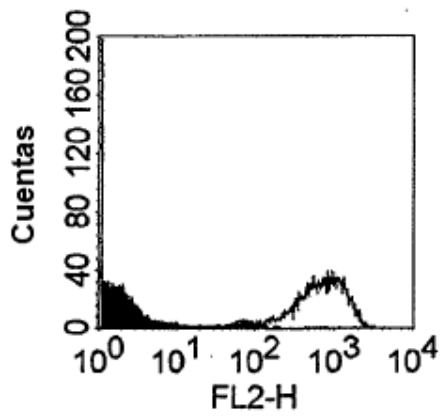
HPB-ALL

CA9-A8 HL x I2C HL



CHO transfectadas con CAIX de macaco

CA9-A8 HL x I2C HL



4119 LnPx

CA9-A8 HL x I2C HL

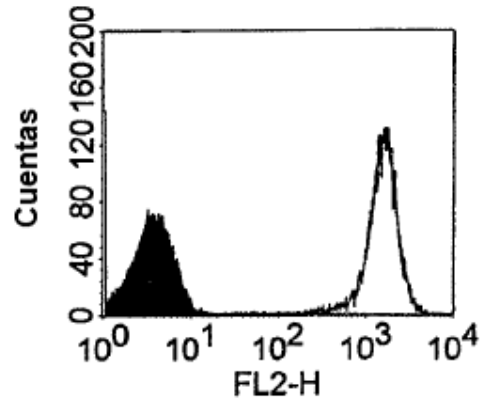
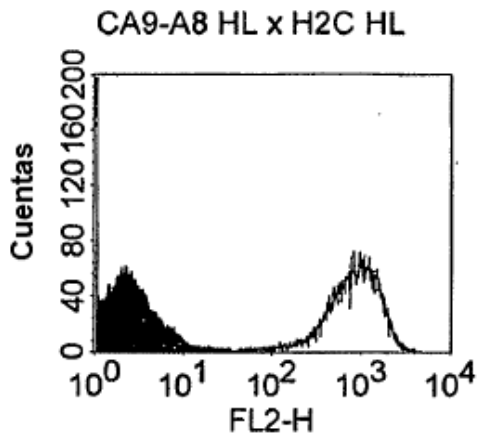
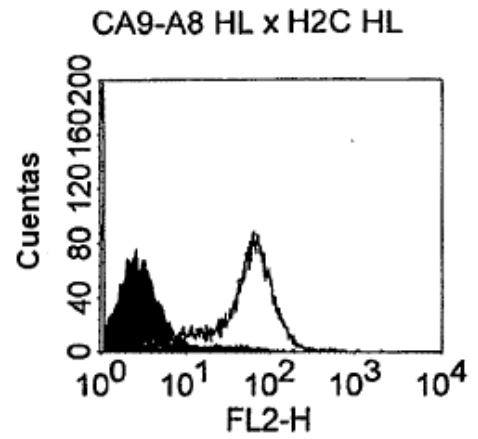


Figura 35b

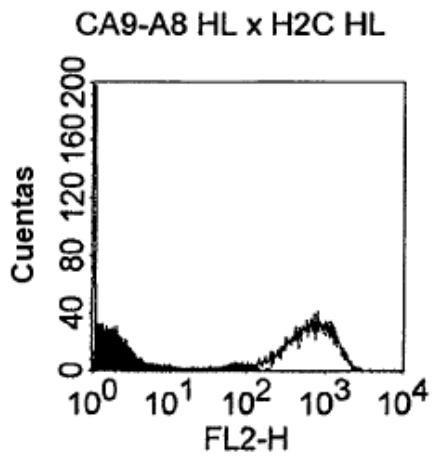
CHO transfectadas con CAIX humano



HPB-ALL



CHO transfectadas con CAIX de macaco



4119 LnPx

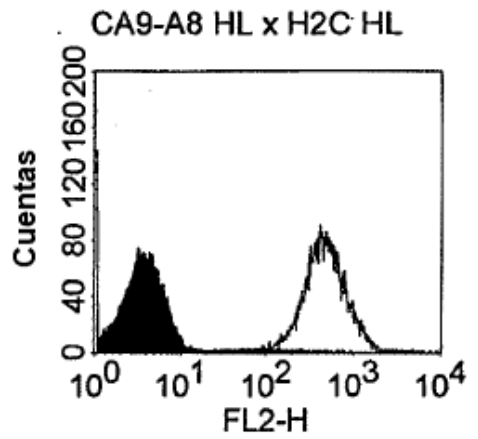
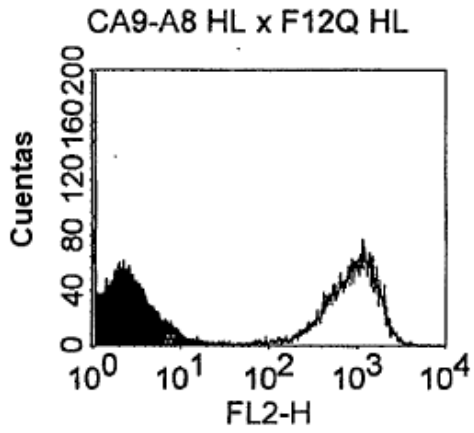
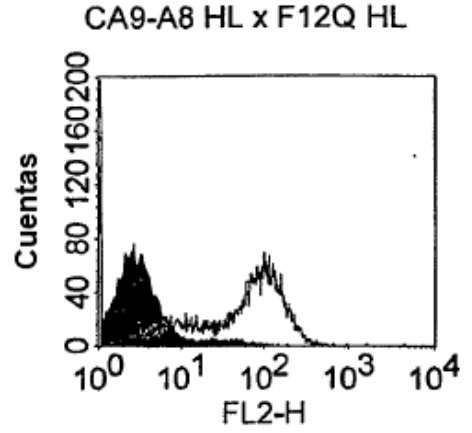


Figura 35c

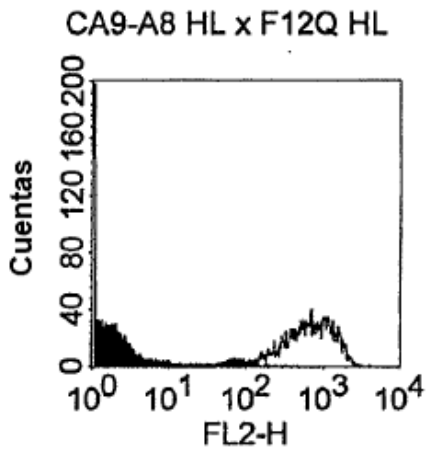
CHO transfectadas con CAIX humano



HPB-ALL



CHO transfectadas con CAIX de macaco



4119 LnPx

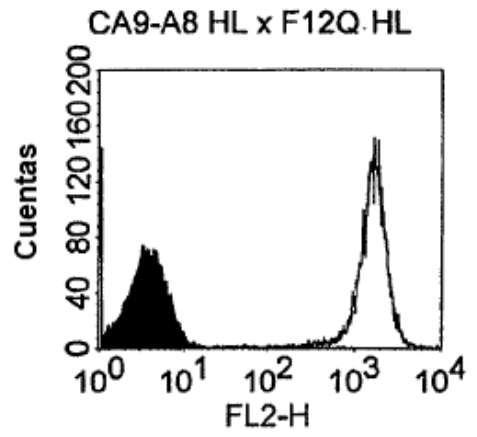
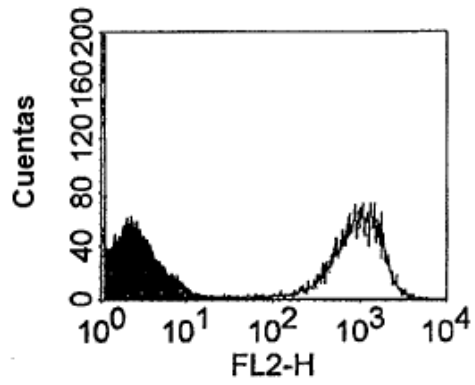


Figura 35d

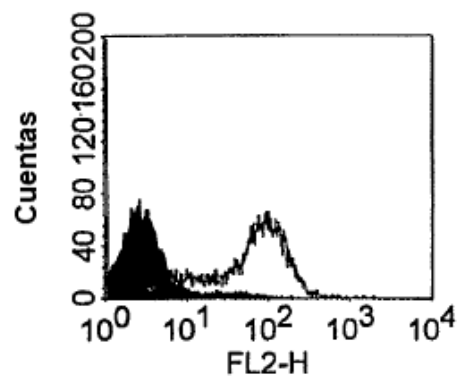
CHO transfectadas con CAIX humano

CA9-B2 HL x I2C HL



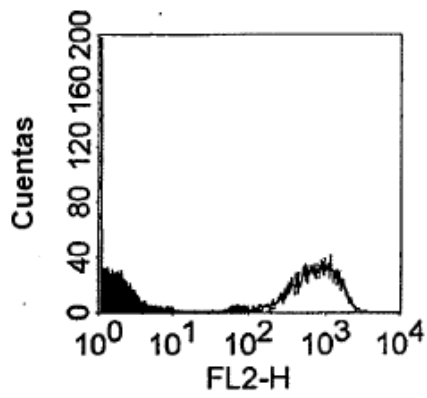
HPB-ALL

CA9-B2 HL x I2C HL



CHO transfectadas con CAIX de macaco

CA9-B2 HL x I2C HL



4119 LnPx

CA9-B2 HL x I2C HL

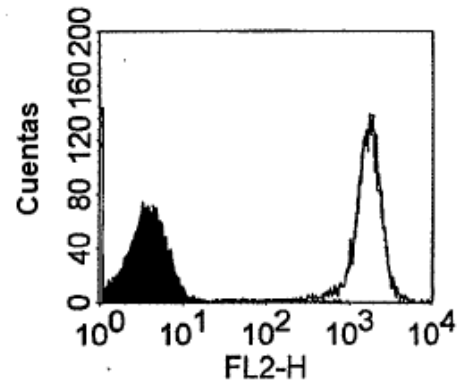
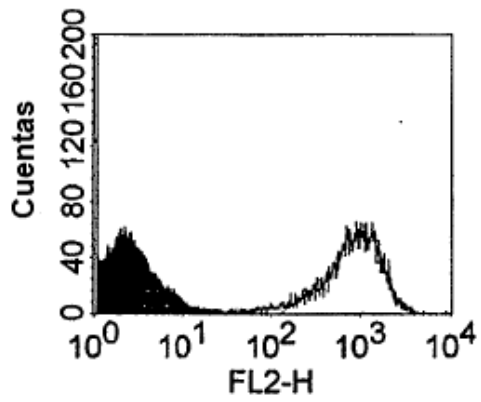


Figura 35e

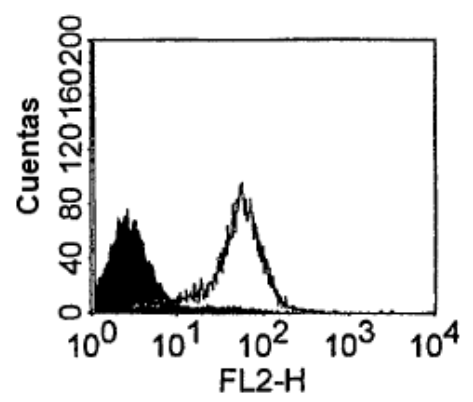
CHO transfectadas con CAIX humano

CA9-B2 HL x H2C HL



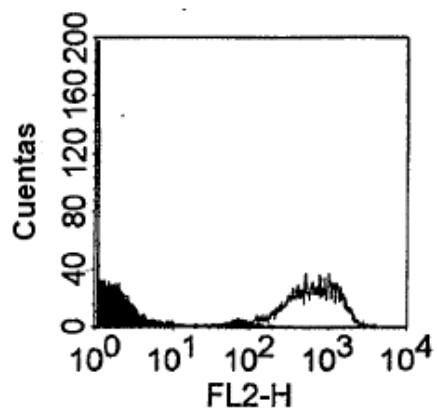
HPB-ALL

CA9-B2 HL x H2C HL



CHO transfectadas con CAIX de macaco

CA9-B2 HL x H2C HL



4119 LnPx

CA9-B2 HL x H2C HL

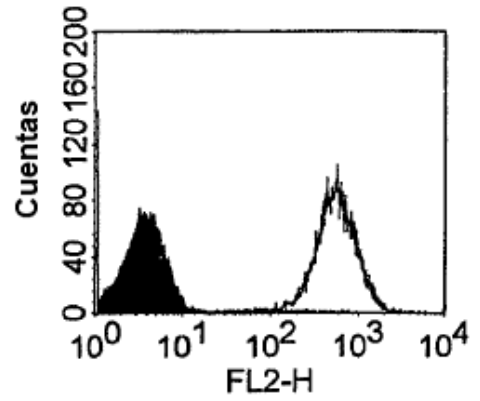
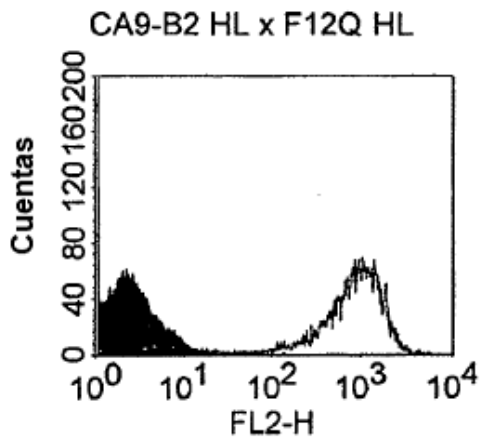
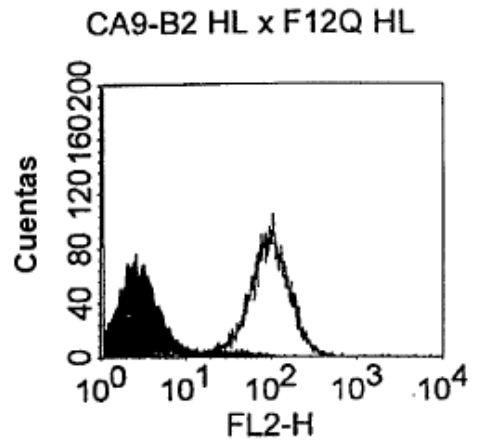


Figura 35f

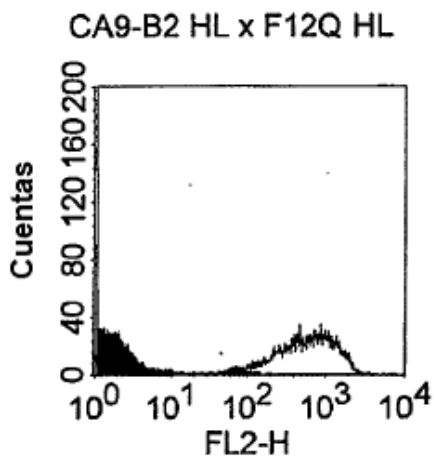
CHO transfectadas con CAIX humano



HPB-ALL



CHO transfectadas con CAIX de macaco



4119 LnPx

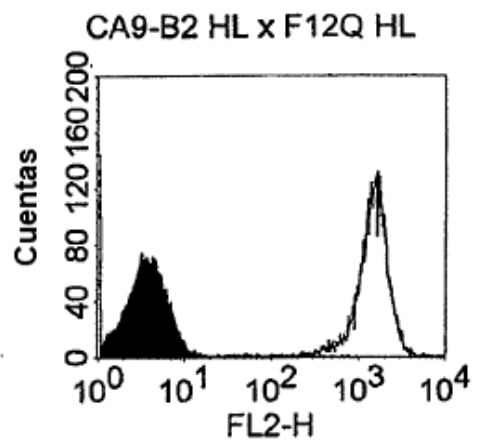
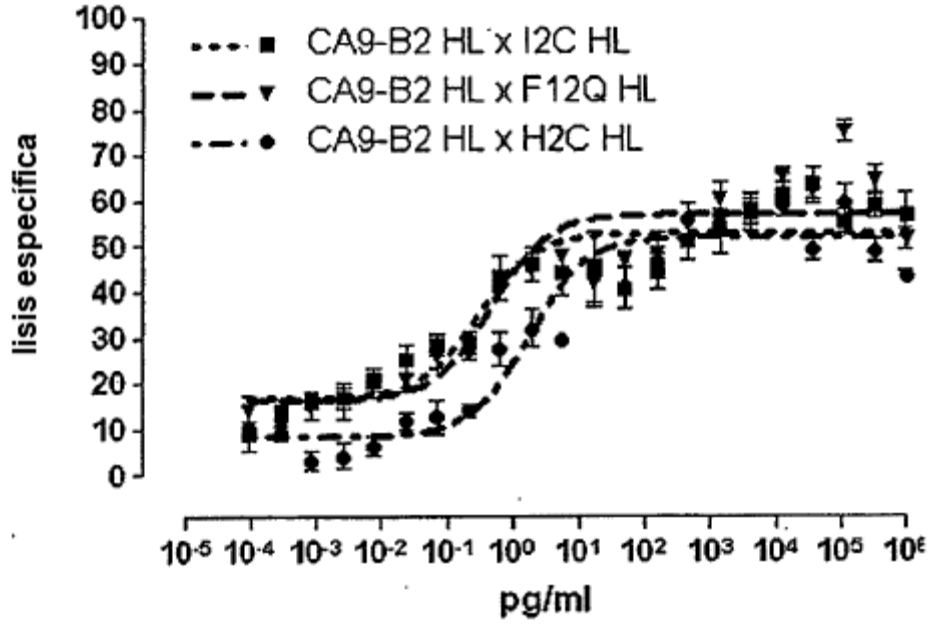


Figura 35g

Células efectoras: PBMC humanas deplecionadas de CD4/CD56 estimuladas

Células diana: CHO transfectadas con CAIX humano

Relación E:D: 10:1



Células efectoras: 4119 LnPx

Células diana: CHO transfectadas con CAIX de macaco

Relación E:D: 50:1

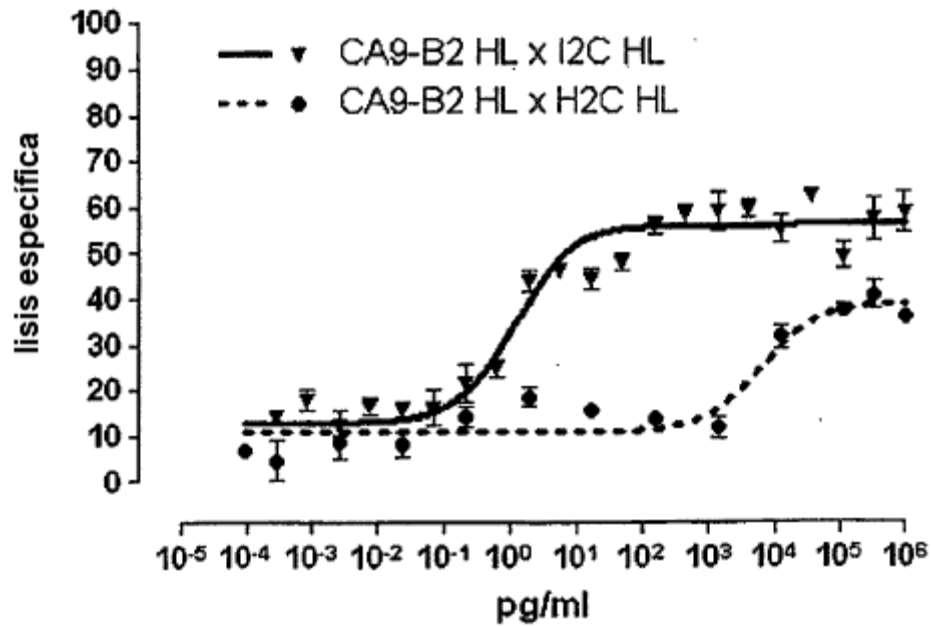
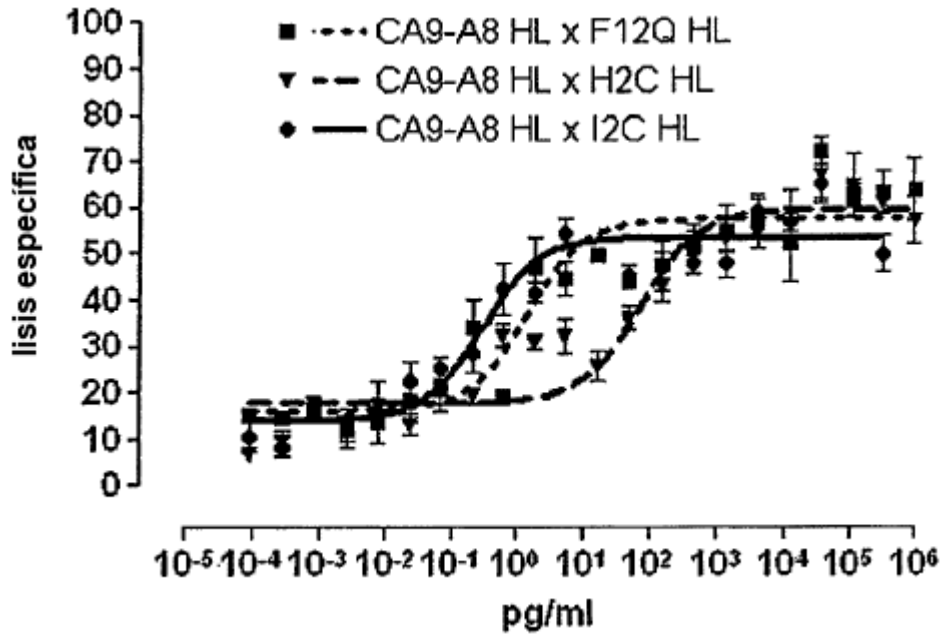


Figura 36a

Células efectoras: PBMC humanas deplecionadas de CD4/CD56 estimuladas

Células diana: CHO transfectadas con CAIX humano

Relación E:D: 10:1



Células efectoras: 4119 LnPx

Células diana: CHO transfectadas con CAIX de macaco

Relación E:D: 50:1

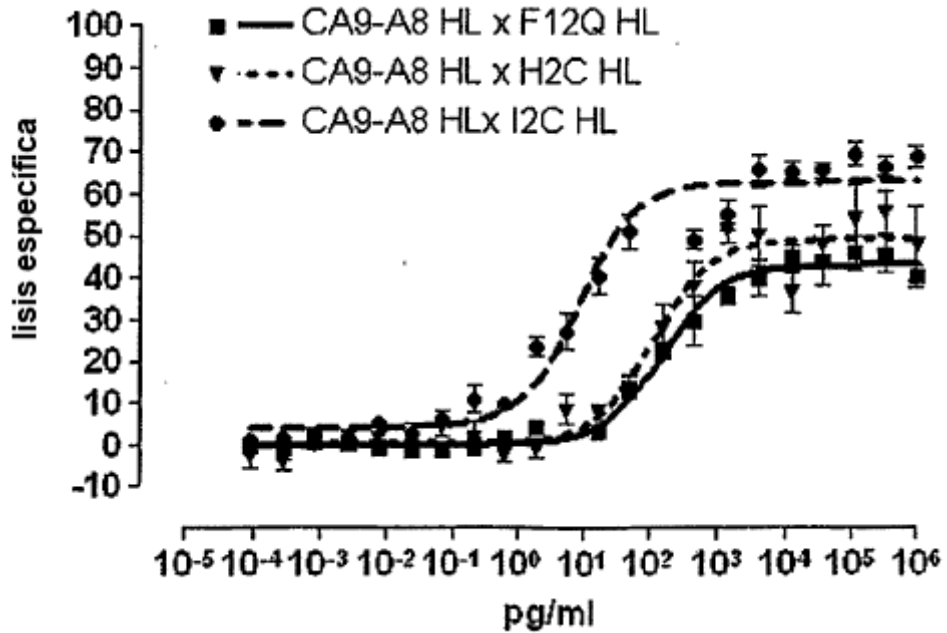
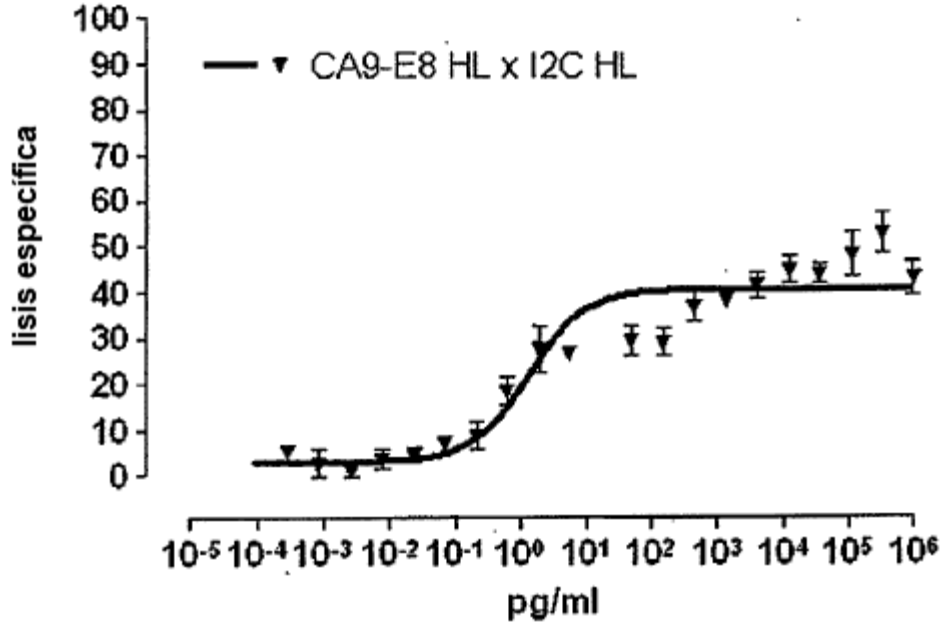


Figura 36b

Células efectoras: PBMC humanas deplecionadas de CD4/CD56 estimuladas

Células diana: CHO transfectadas con CAIX humano

Relación E:D: 5:1



Células efectoras: 4119 LnPx

Células diana: CHO transfectadas con CAIX de macaco

Relación E:D: 50:1

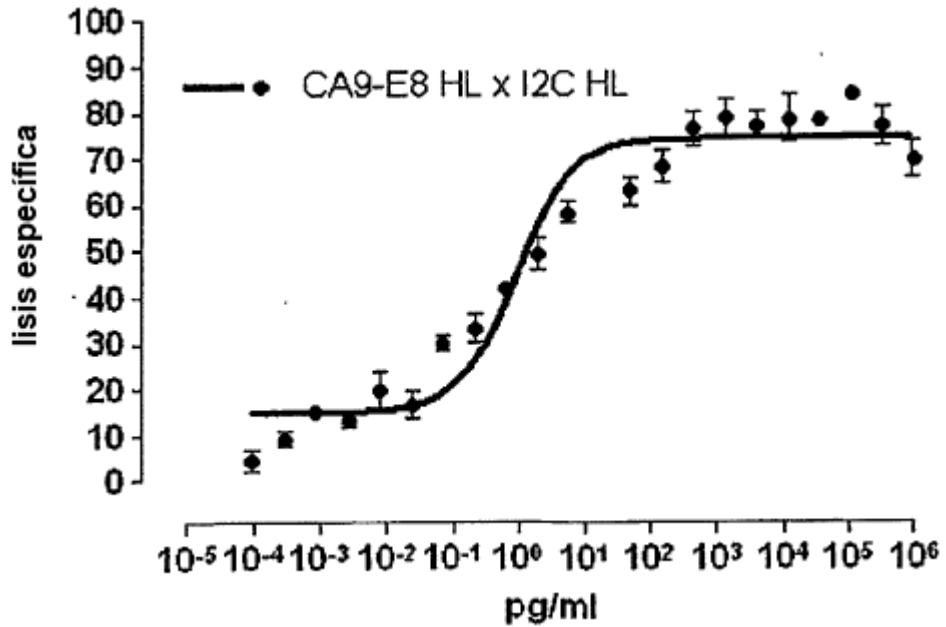


Figura 36c

- • HD69 HL x I2C HL
- ■ HD69 HL x F12Q HL
- ▼ HD69 HL x H2C HL
- □ CONTROL

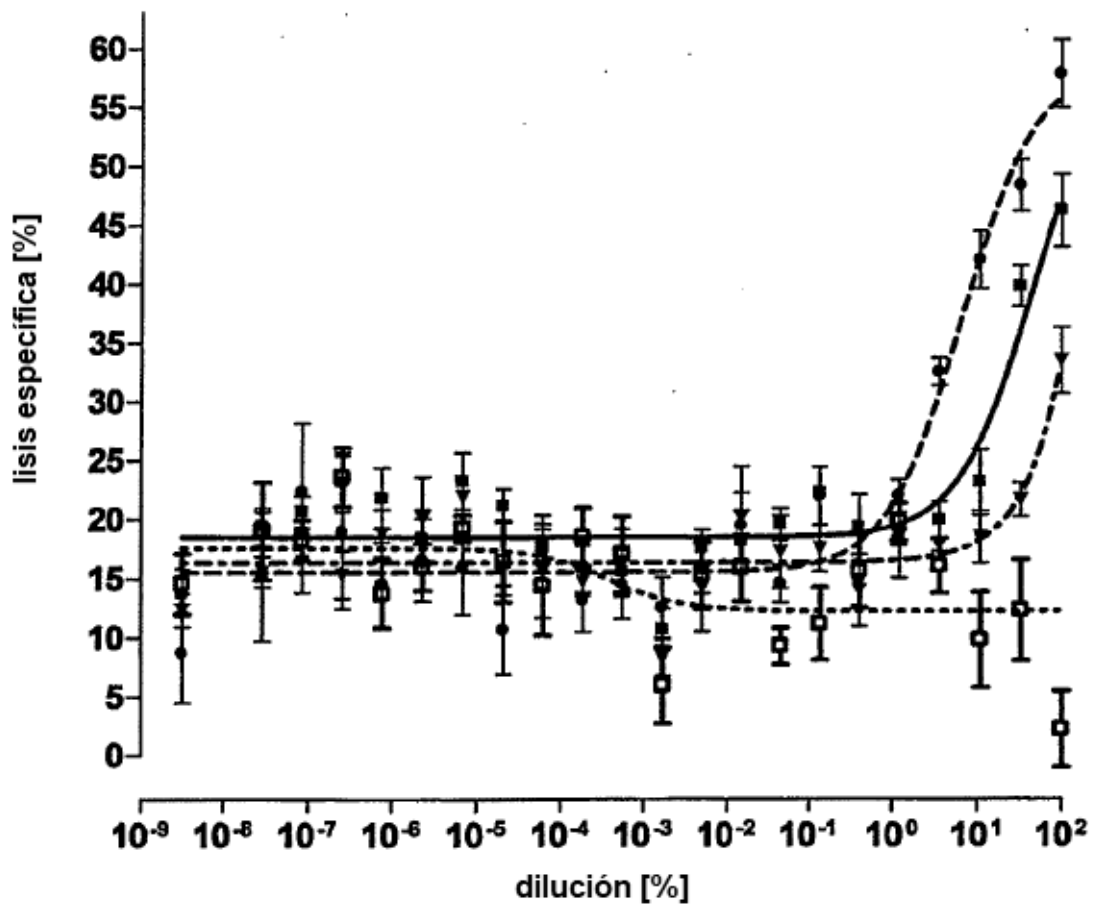


Figura 37

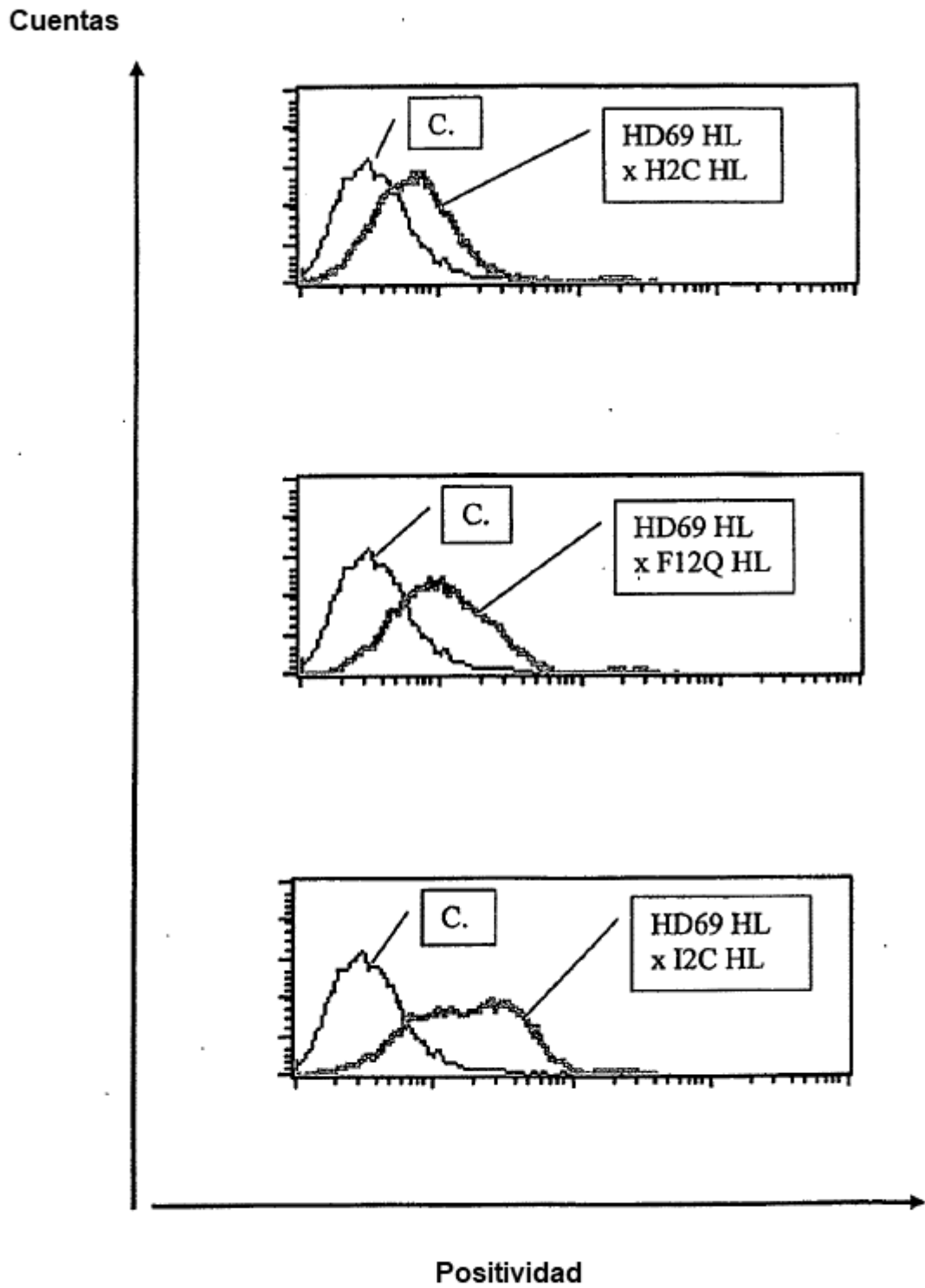


Figura 38a: CHO-EpCAM (humano)

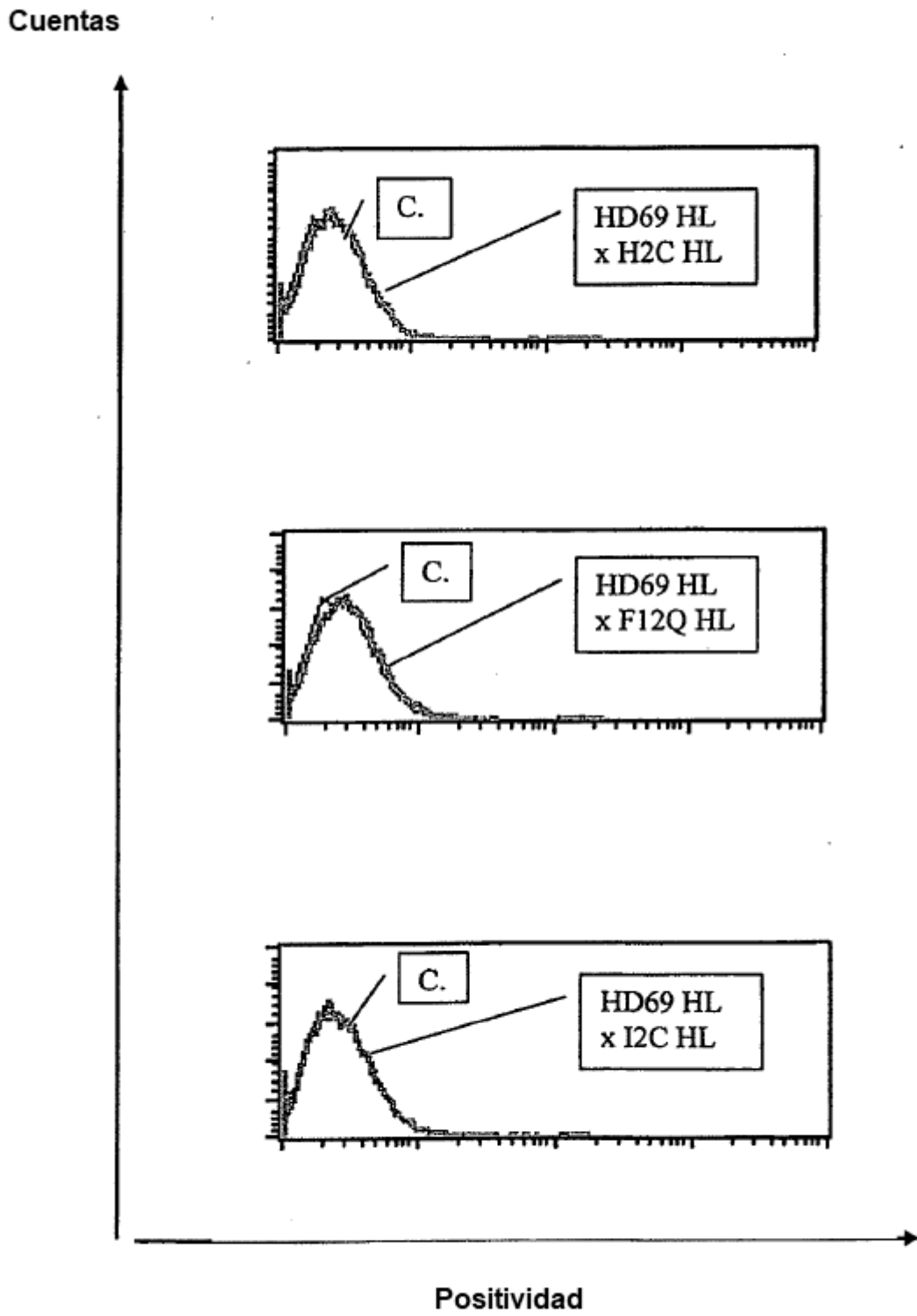


Figura 38b: CHO (no transfectadas)

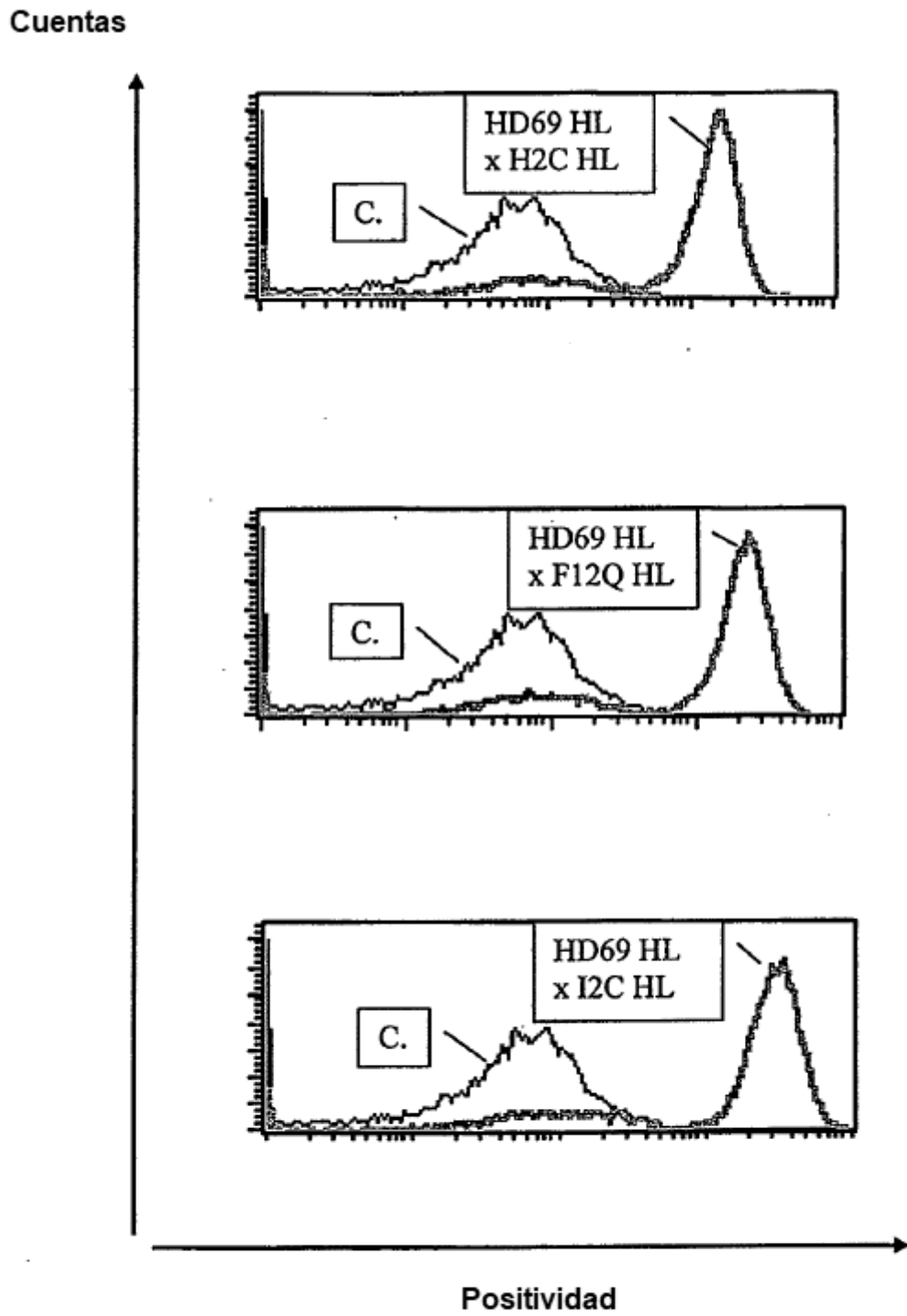


Figura 38c: PBMC humanas

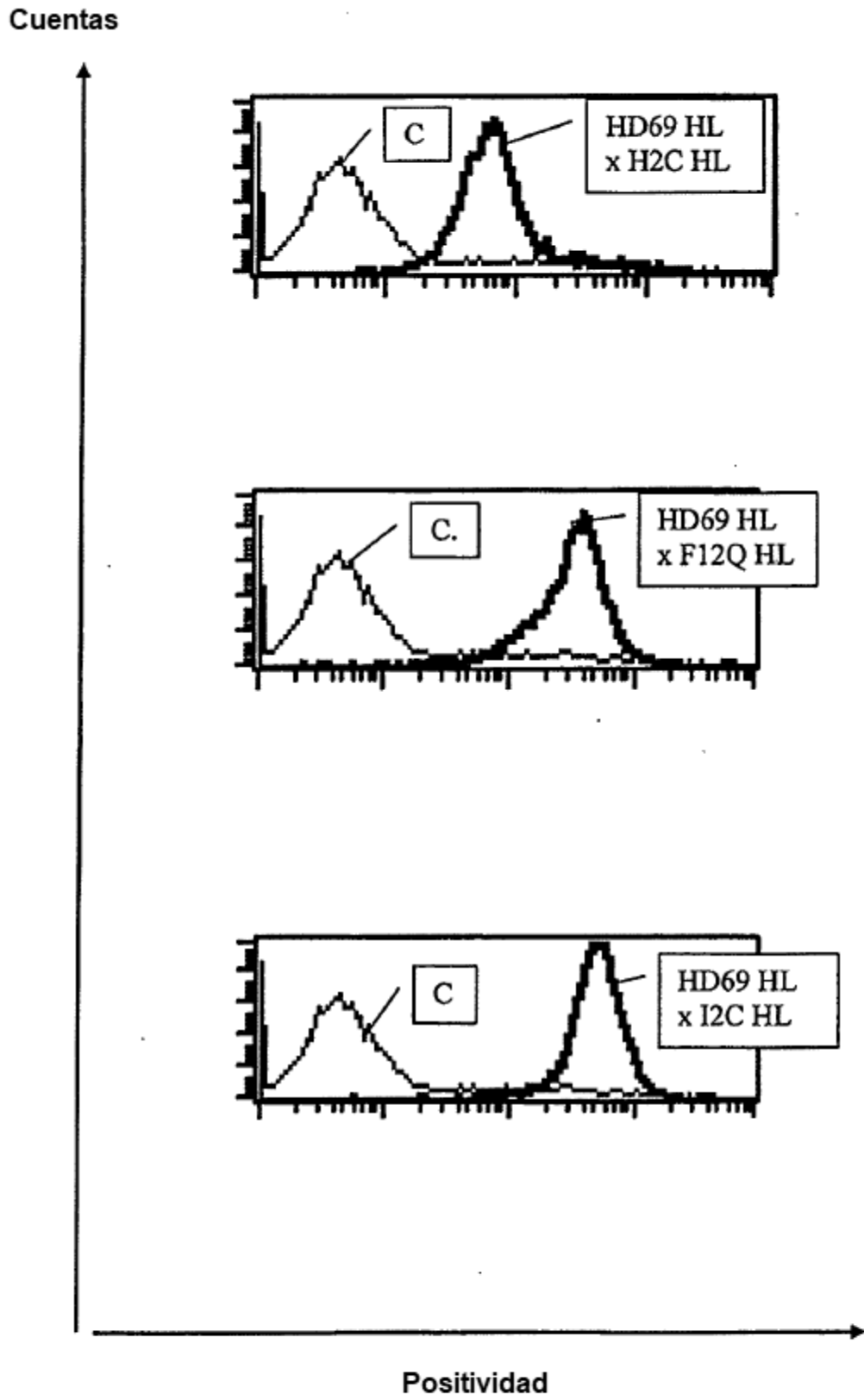


Figura 38d: 4119LnPx de macaco (CD3+)

Figura: 39a

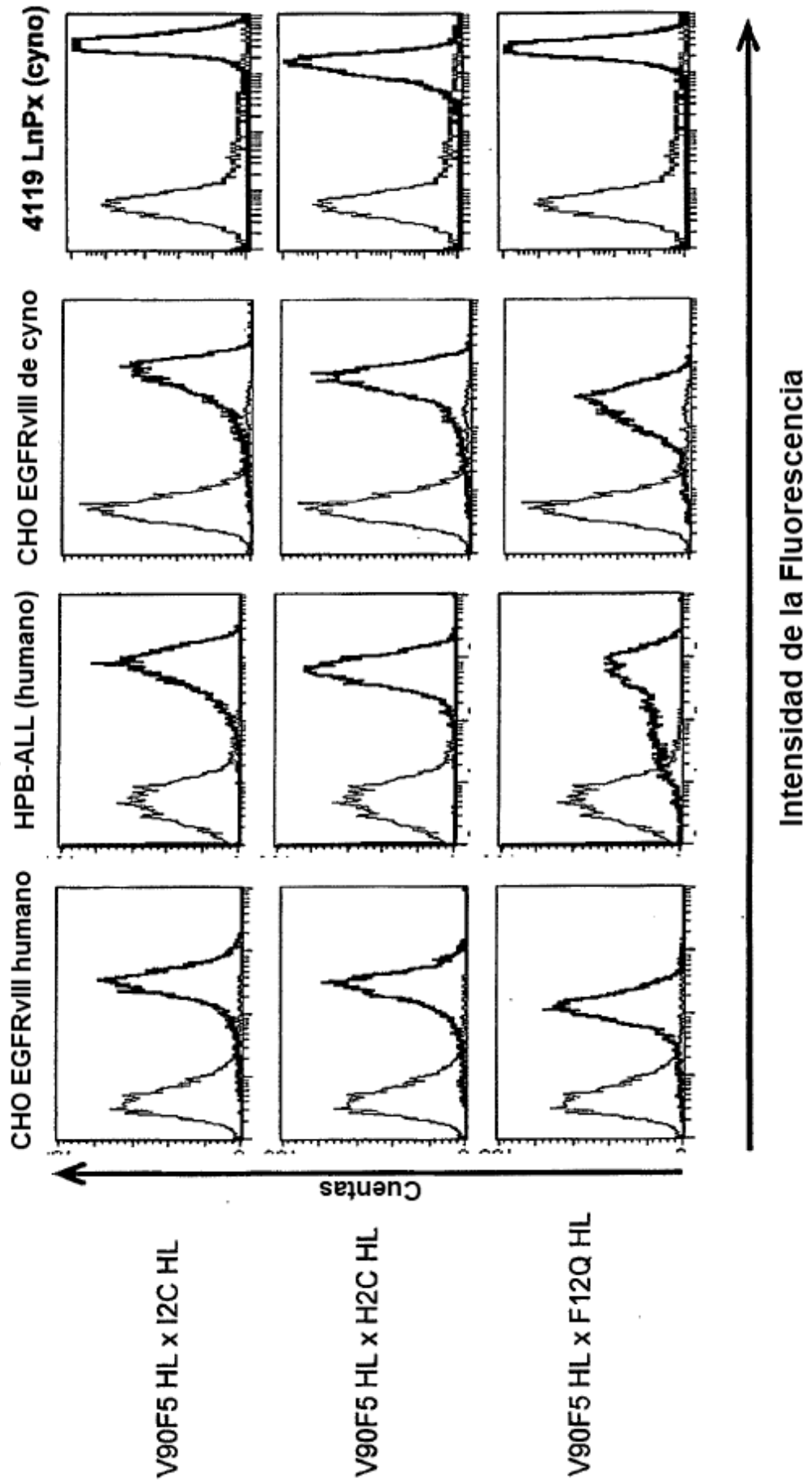


Figura: 39b

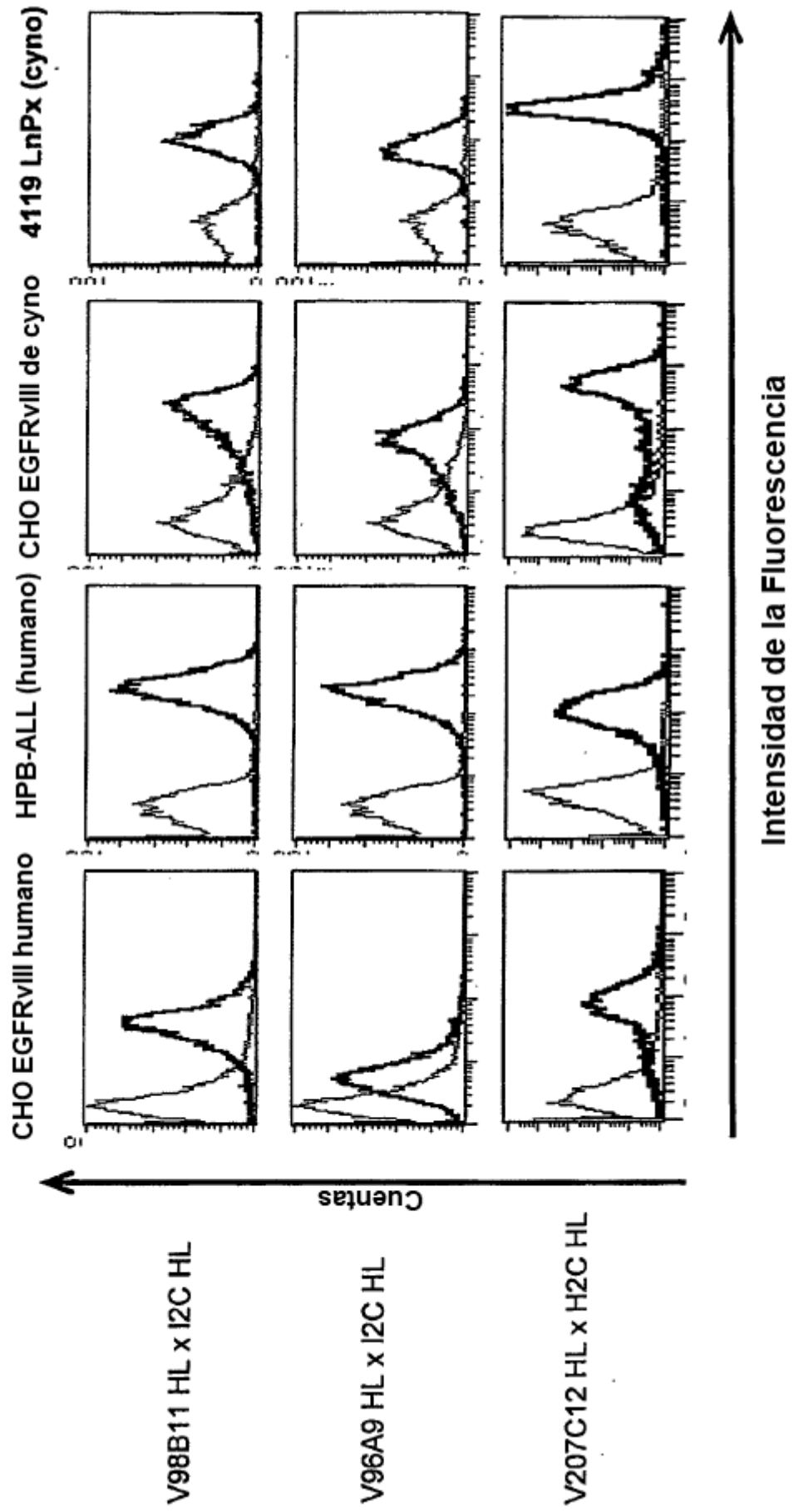


Figura: 39c

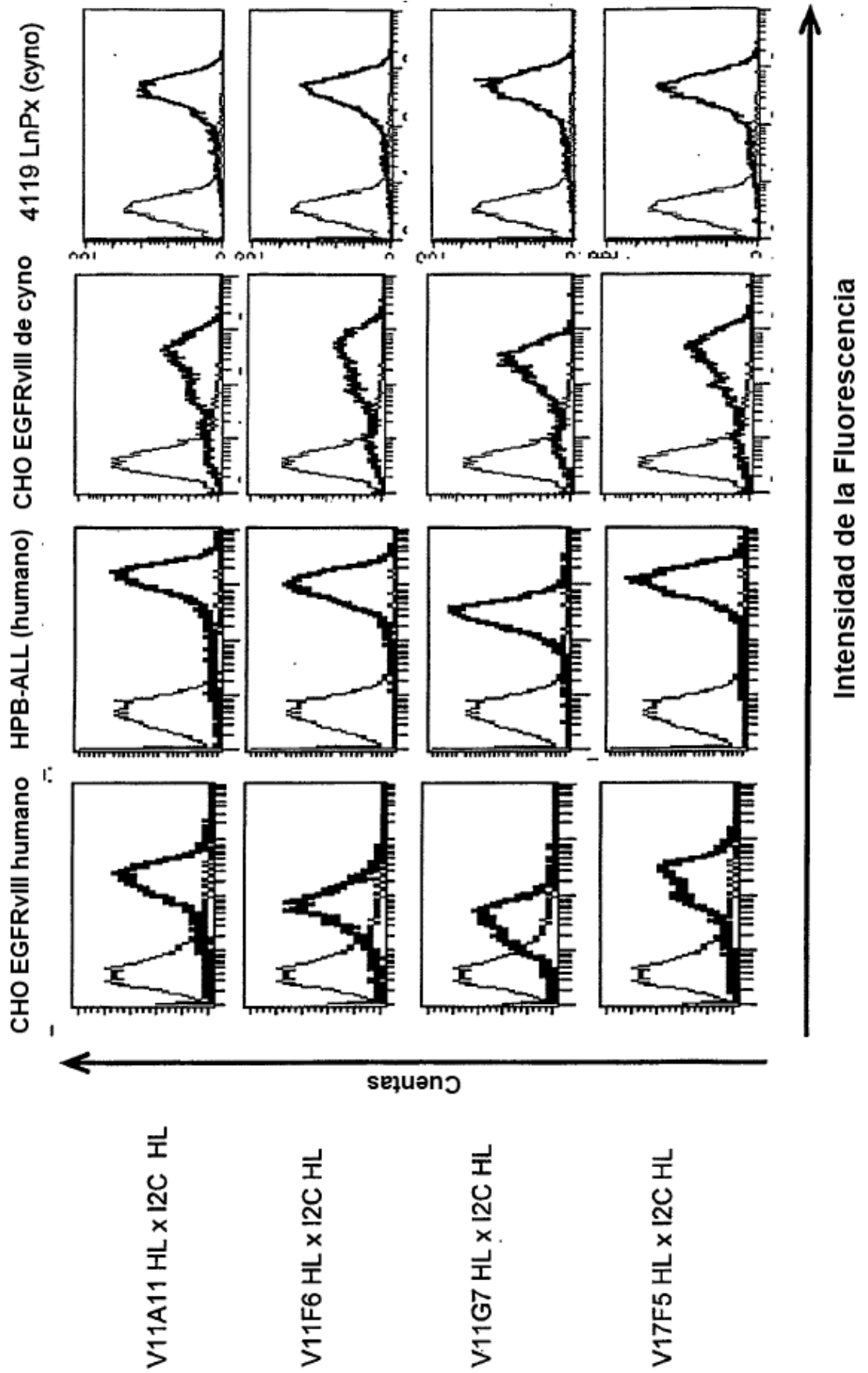


Figura: 39d

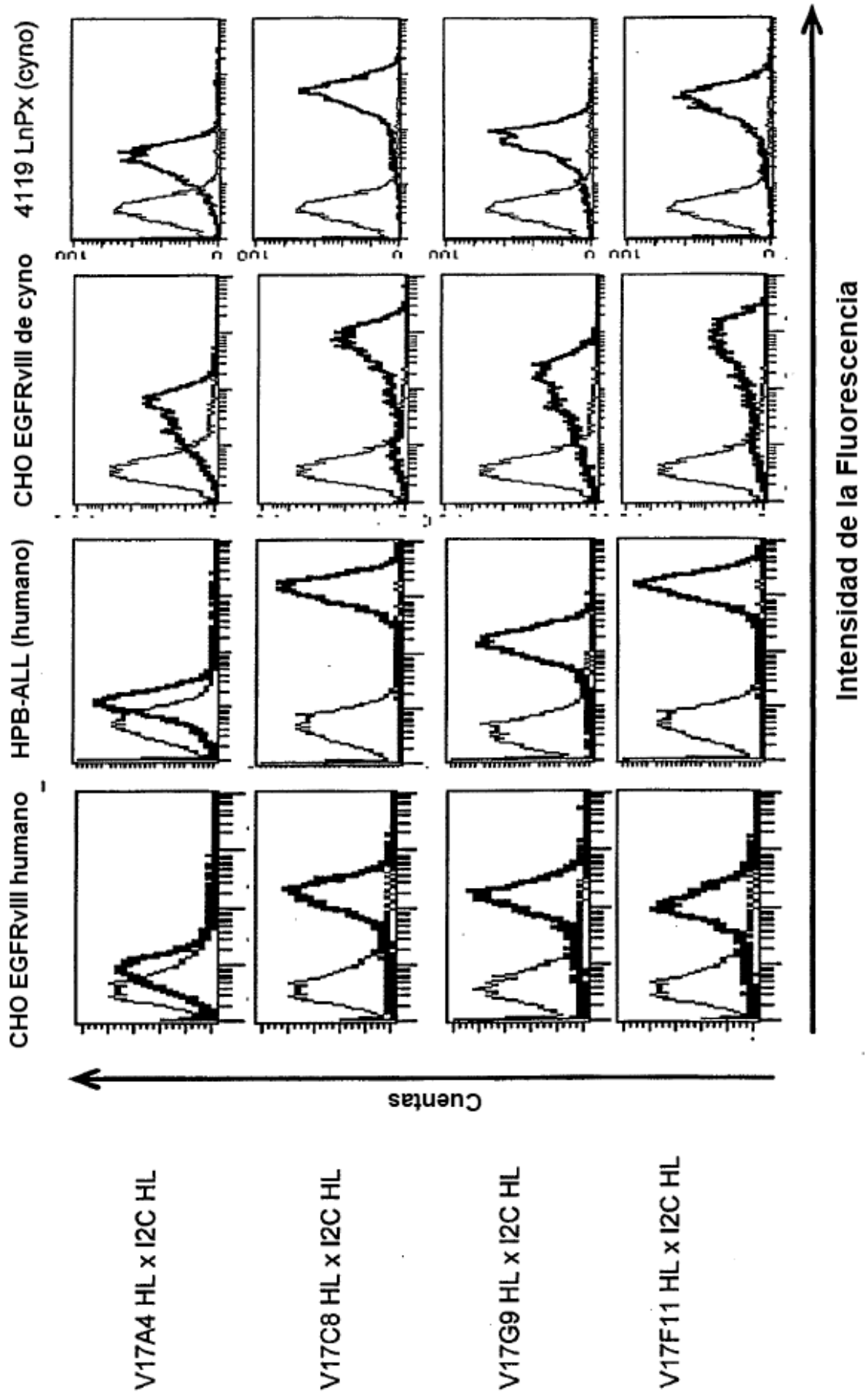


Figura: 39e

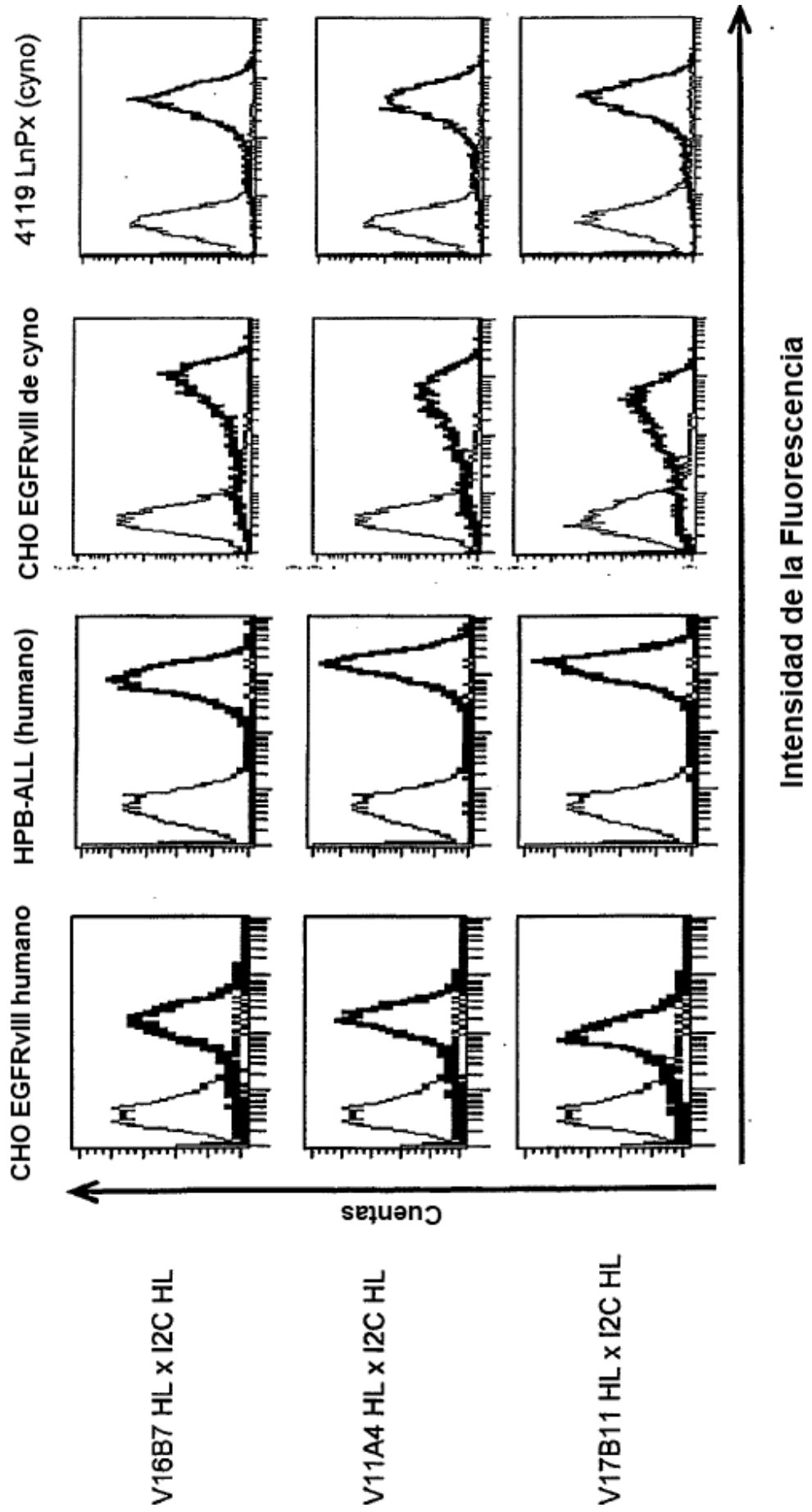


Figura: 39f

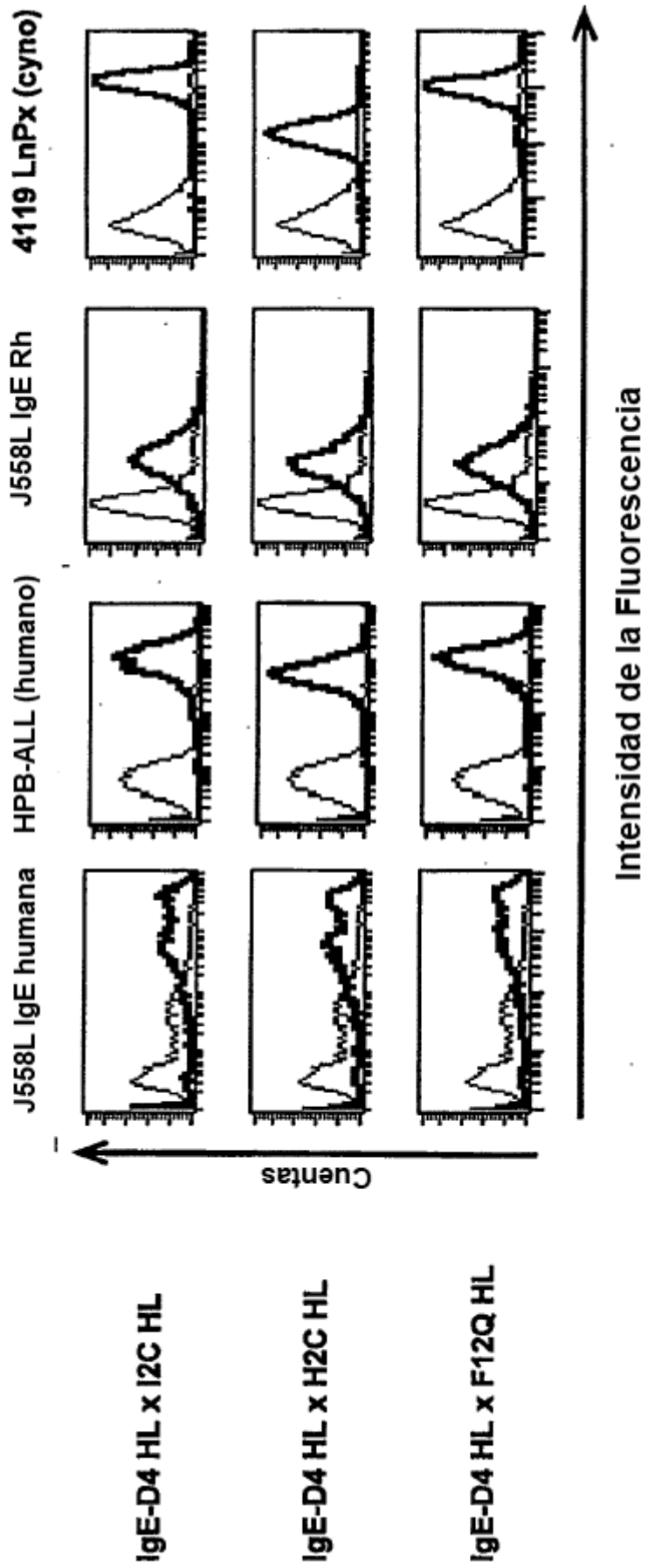
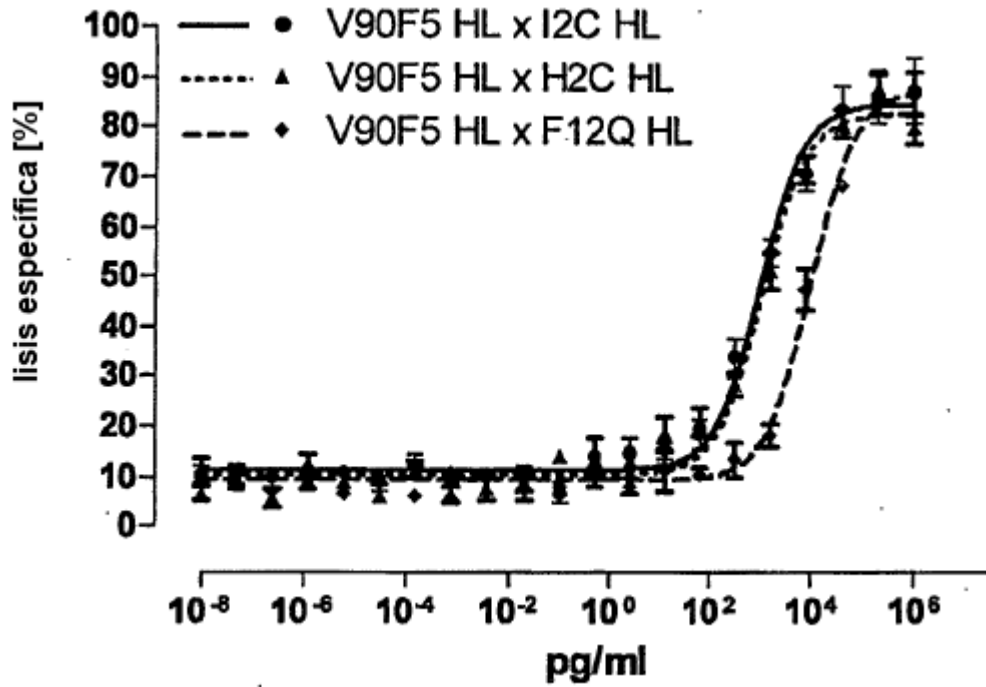


Figura 40a

A) Células efectoras: PBMC humanas deplecionadas de CD4/CD56 estimuladas

Células diana: CHO transfectadas con EGFRvIII humano



B) Células efectoras: 4119LnPx

Células diana: CHO transfectadas con EGFRvIII de cyno

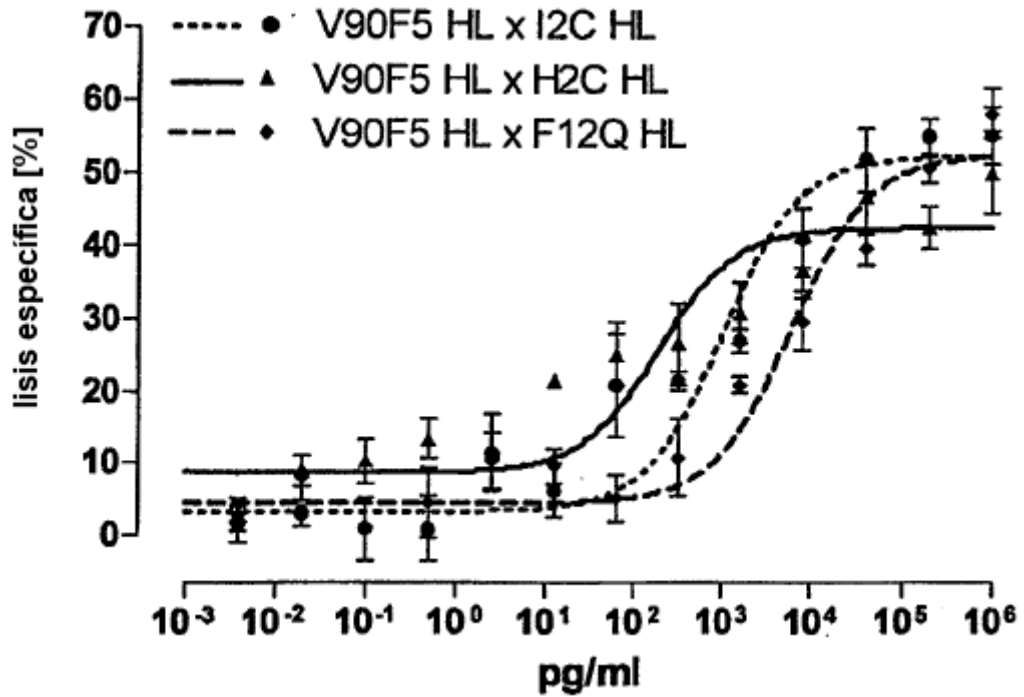
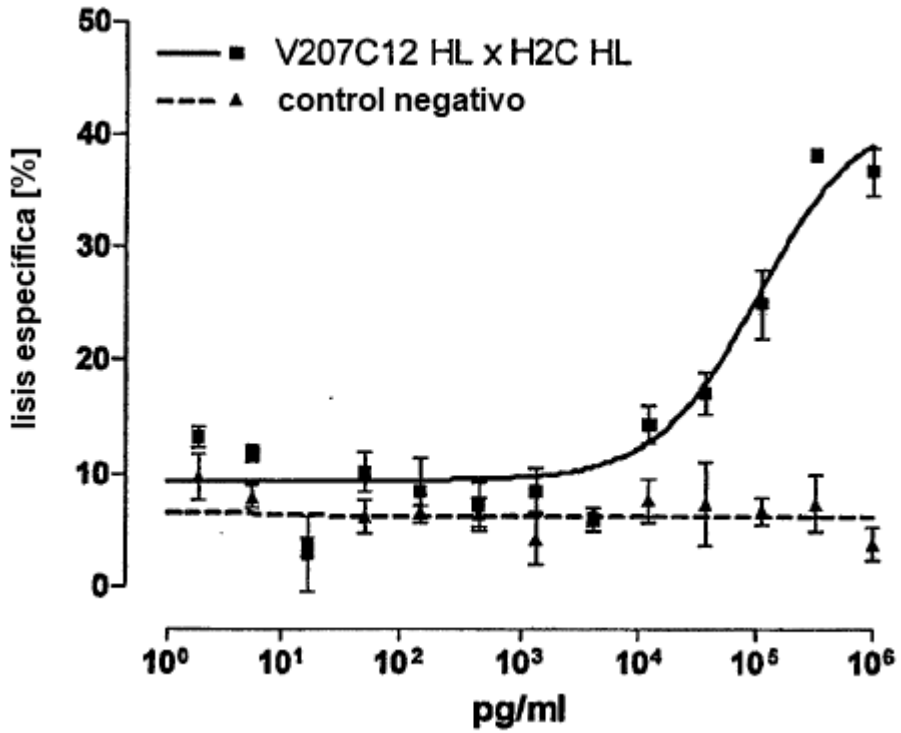


Figura 40b

A) Células efectoras: PBMC humanas deplecionadas de CD4/CD56 estimuladas

Células diana: CHO transfectadas con EGFRvIII humano



B) Células efectoras: 4119LnPx

Células diana: CHO transfectadas con EGFRvIII de cyno

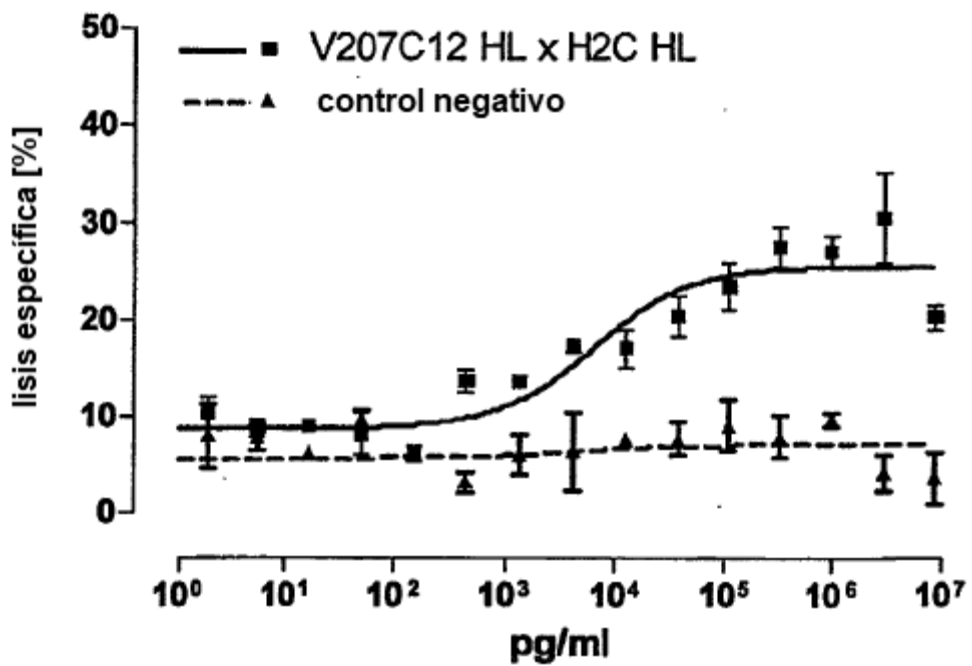
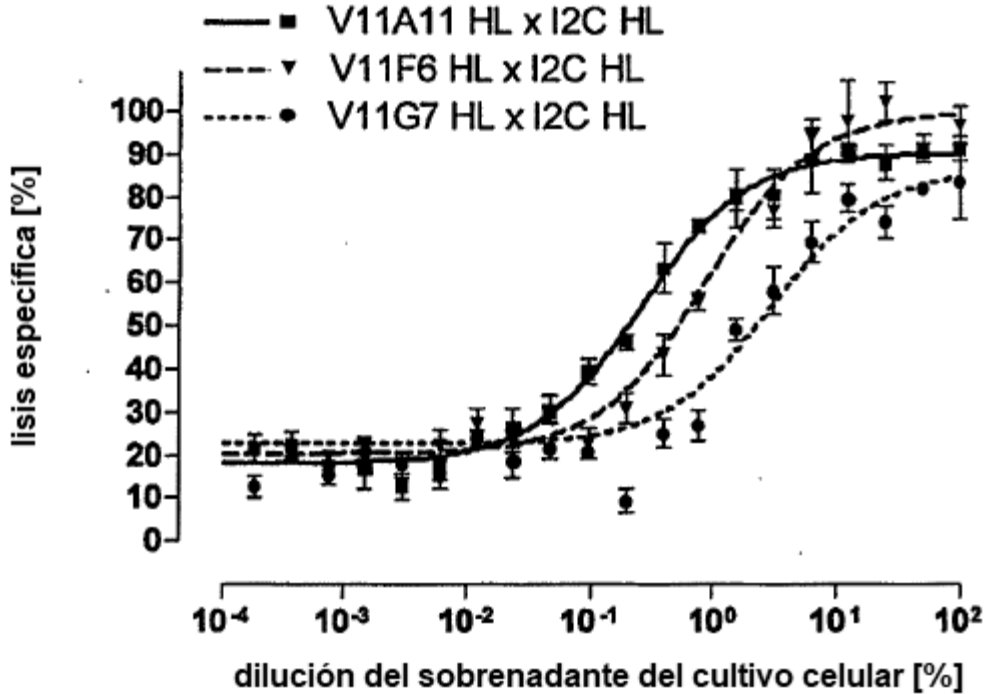


Figura 40c

A) Células efectoras: PBMC humanas deplecionadas de CD4/CD56 estimuladas

Células diana: CHO transfectadas con EGFRvIII humano



B) Células efectoras: PBMC humanas deplecionadas de CD4/CD56 estimuladas

Células diana: CHO transfectadas con EGFRvIII humano

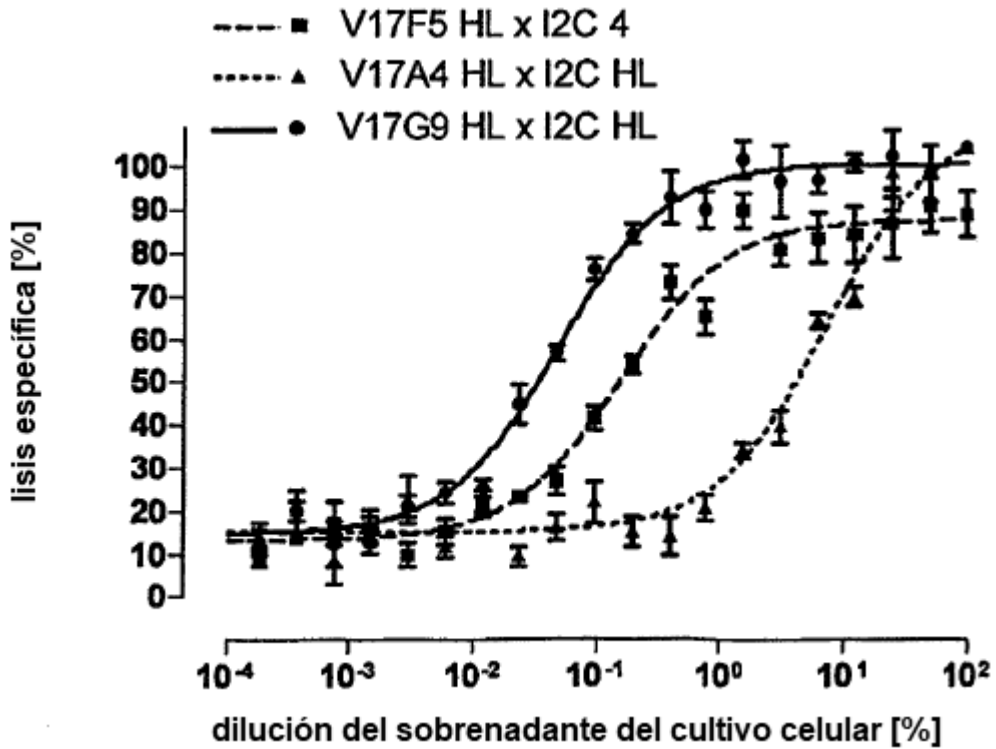
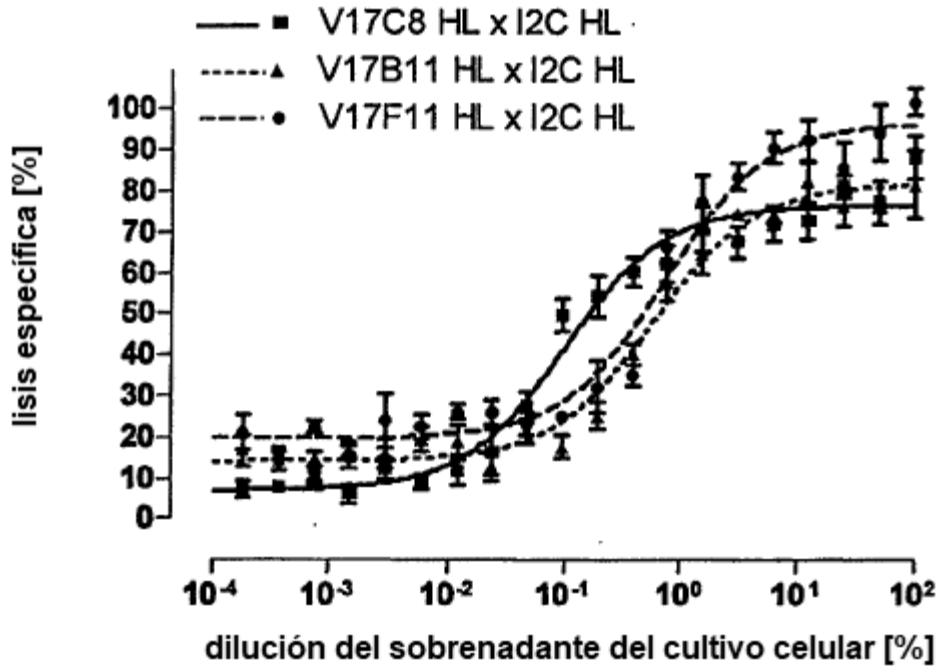


Figura 40d

A) Células efectoras: PBMC humanas deplecionadas de CD4/CD56 estimuladas

Células diana: CHO transfectadas con EGFRvIII humano



B) Células efectoras: PBMC humanas deplecionadas de CD4/CD56 estimuladas

Células diana: CHO transfectadas con EGFRvIII humano

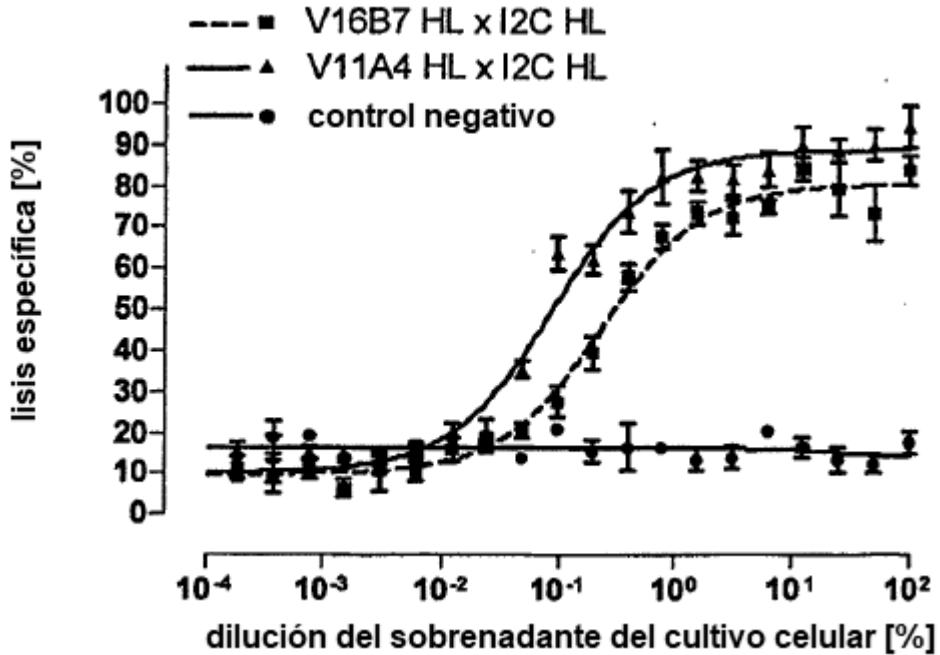
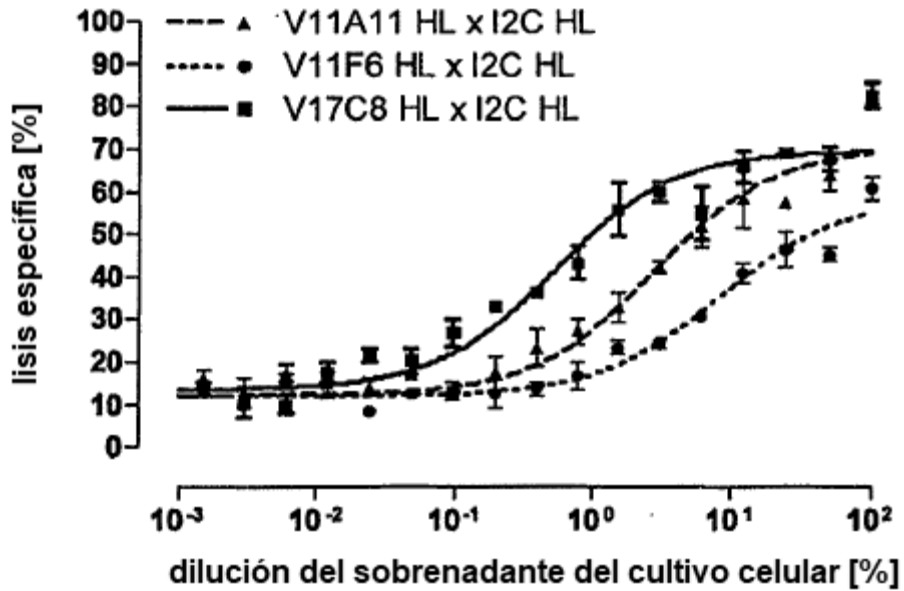


Figura 40e

A) Células efectoras: 4119LnPx

Células diana: CHO transfectadas con EGFRvIII de cyno



B) Células efectoras: 4119LnPx

Células diana: CHO transfectadas con EGFRvIII de cyno

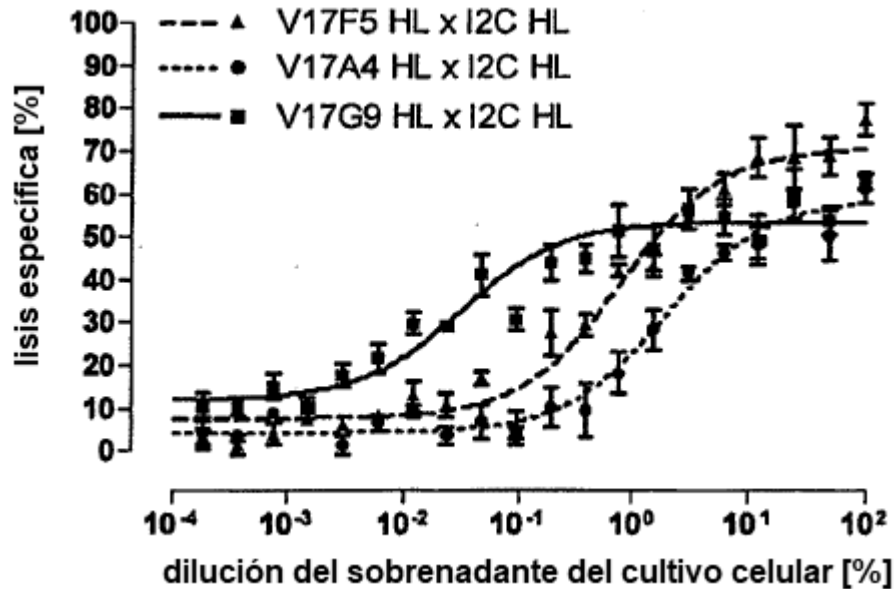
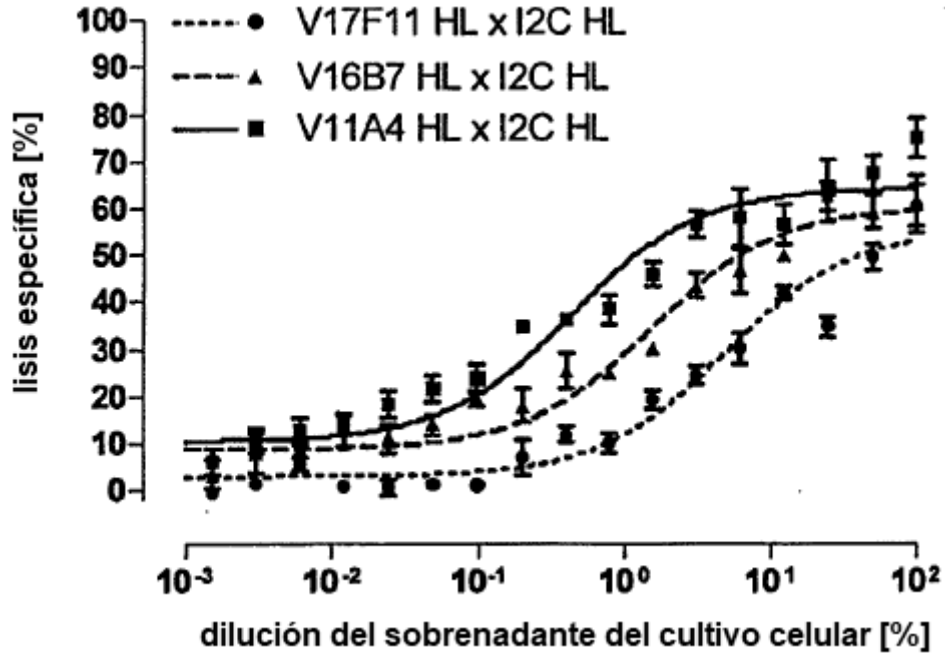


Figura 40f

A) Células efectoras: 4119LnPx

Células diana: CHO transfectadas con EGFRvIII de cyno



B) Células efectoras: 4119LnPx

Células diana: CHO transfectadas con EGFRvIII de cyno

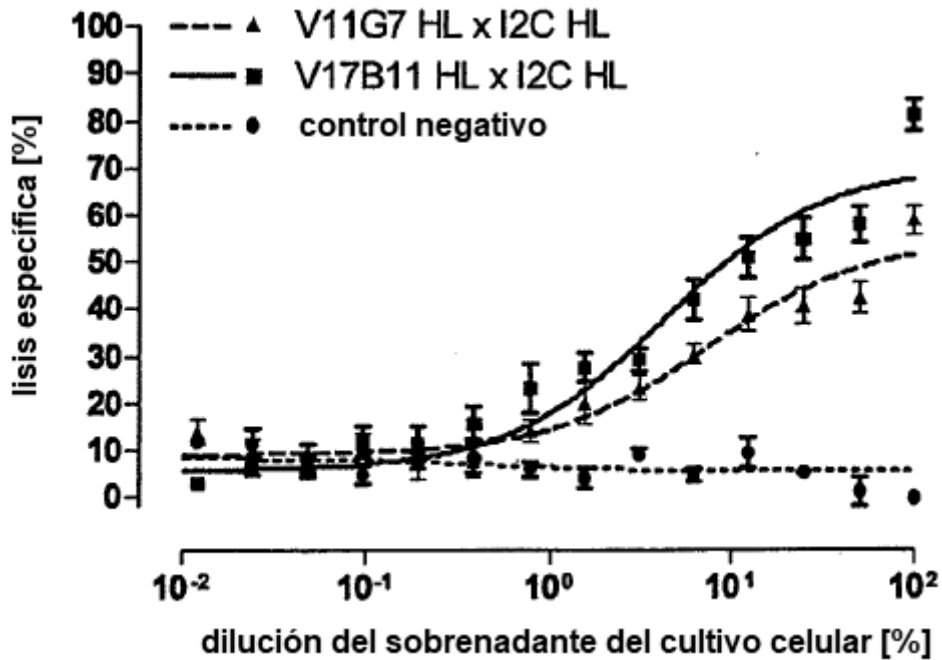
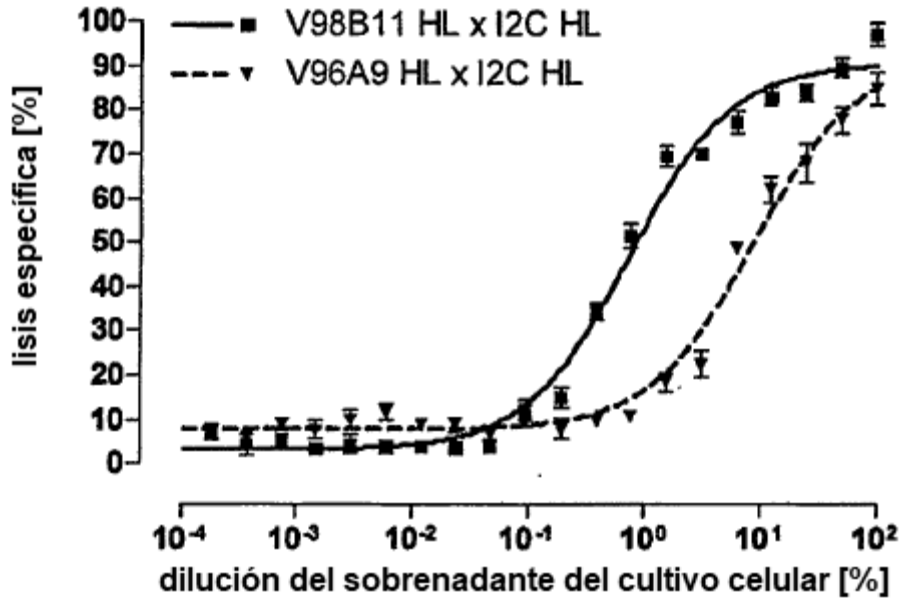


Figura 40g

A) Células efectoras: PBMC humanas deplecionadas de CD4/CD56 estimuladas

Células diana: CHO transfectadas con EGFRvIII humano



B) Células efectoras: 4119LnPx

Células diana: CHO transfectadas con EGFRvIII de cyno

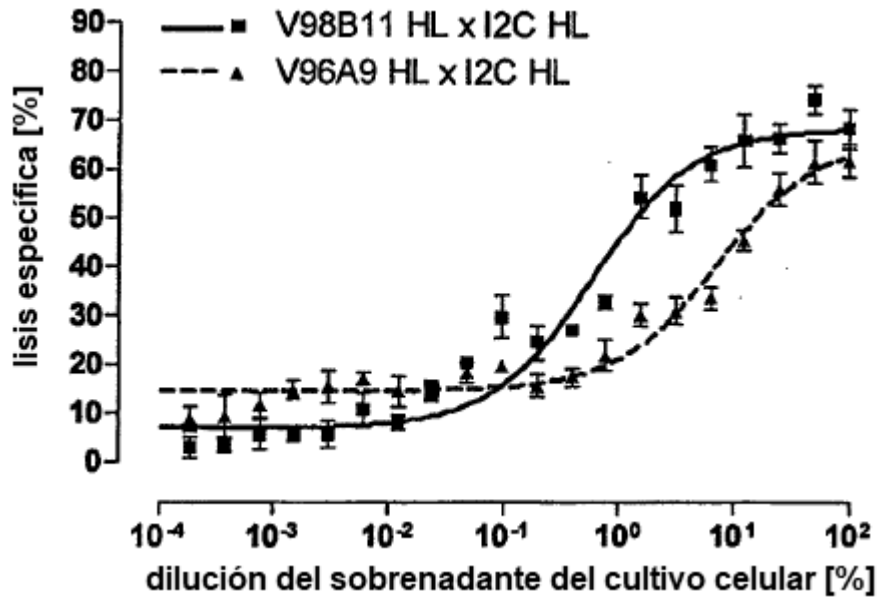


Figura: 41a

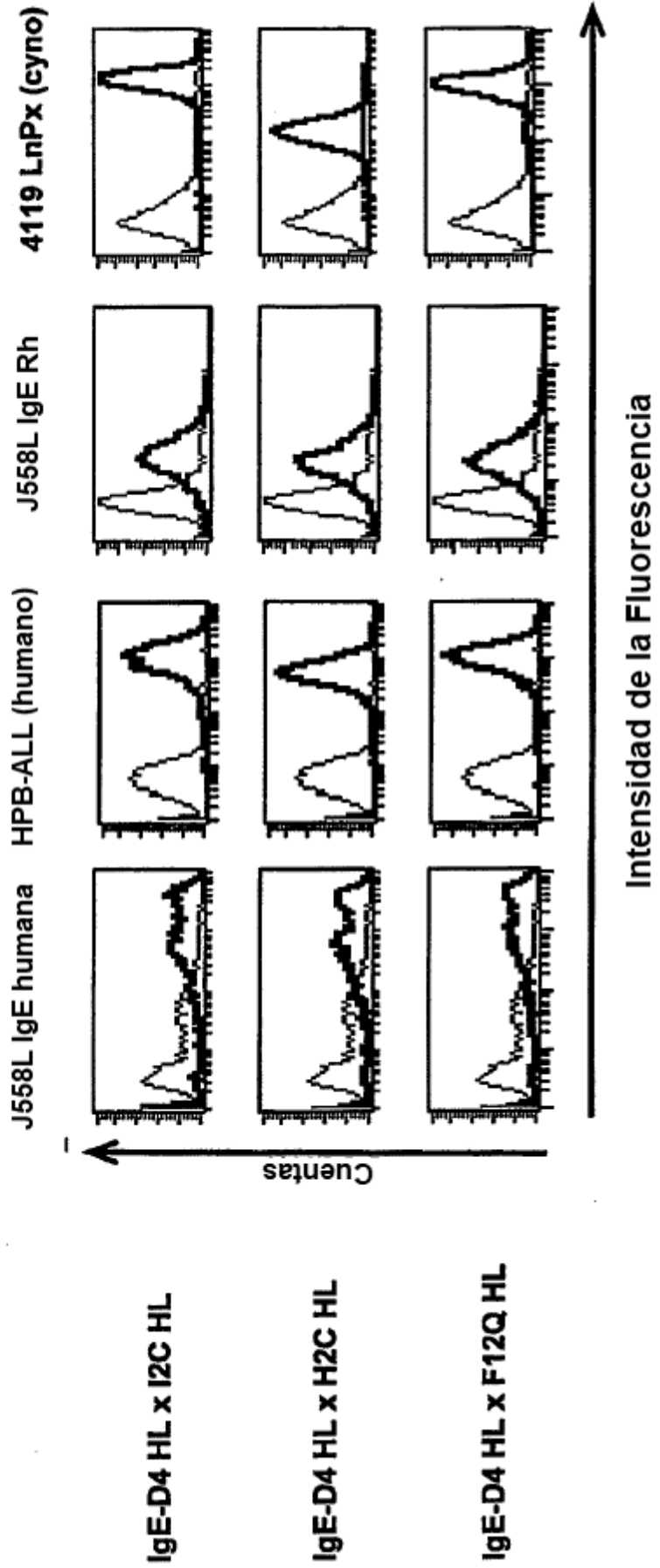


Figura: 41b

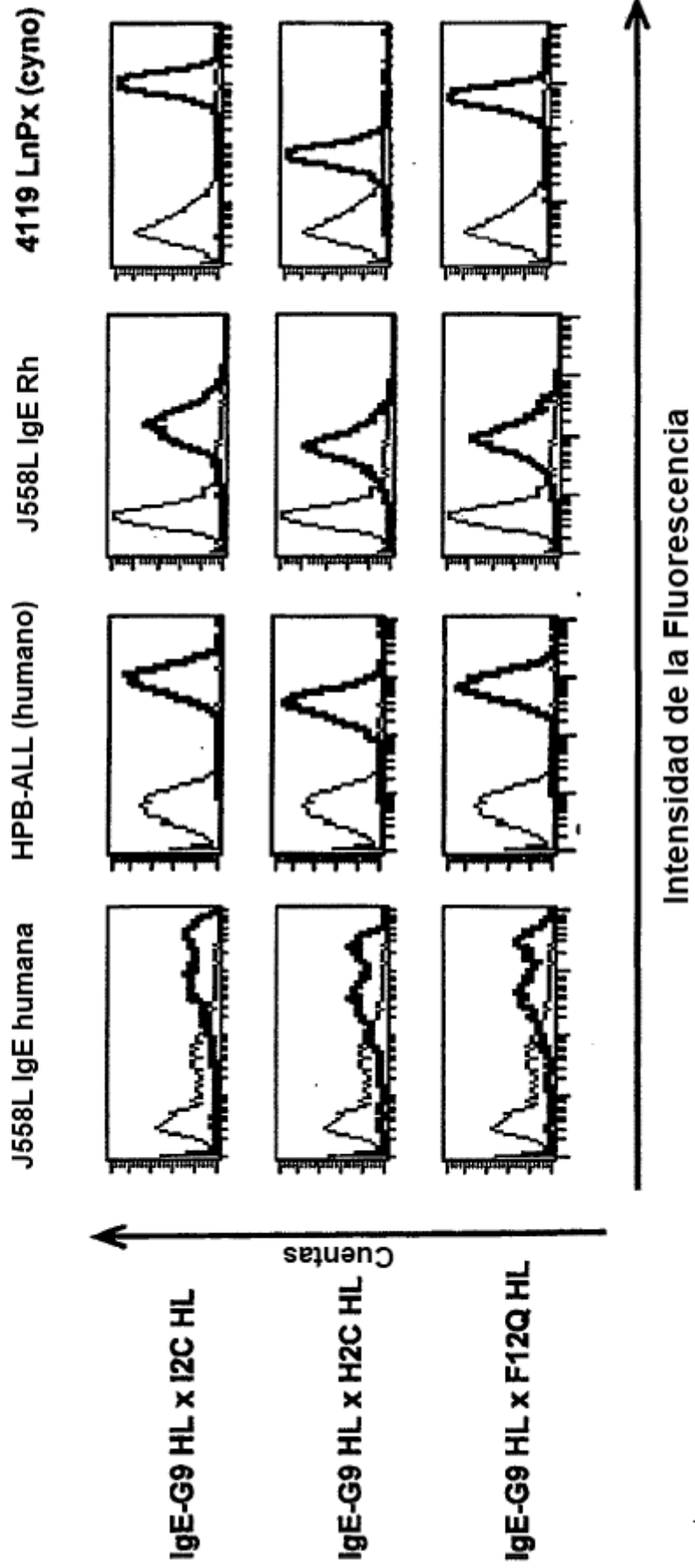


Figura: 41c

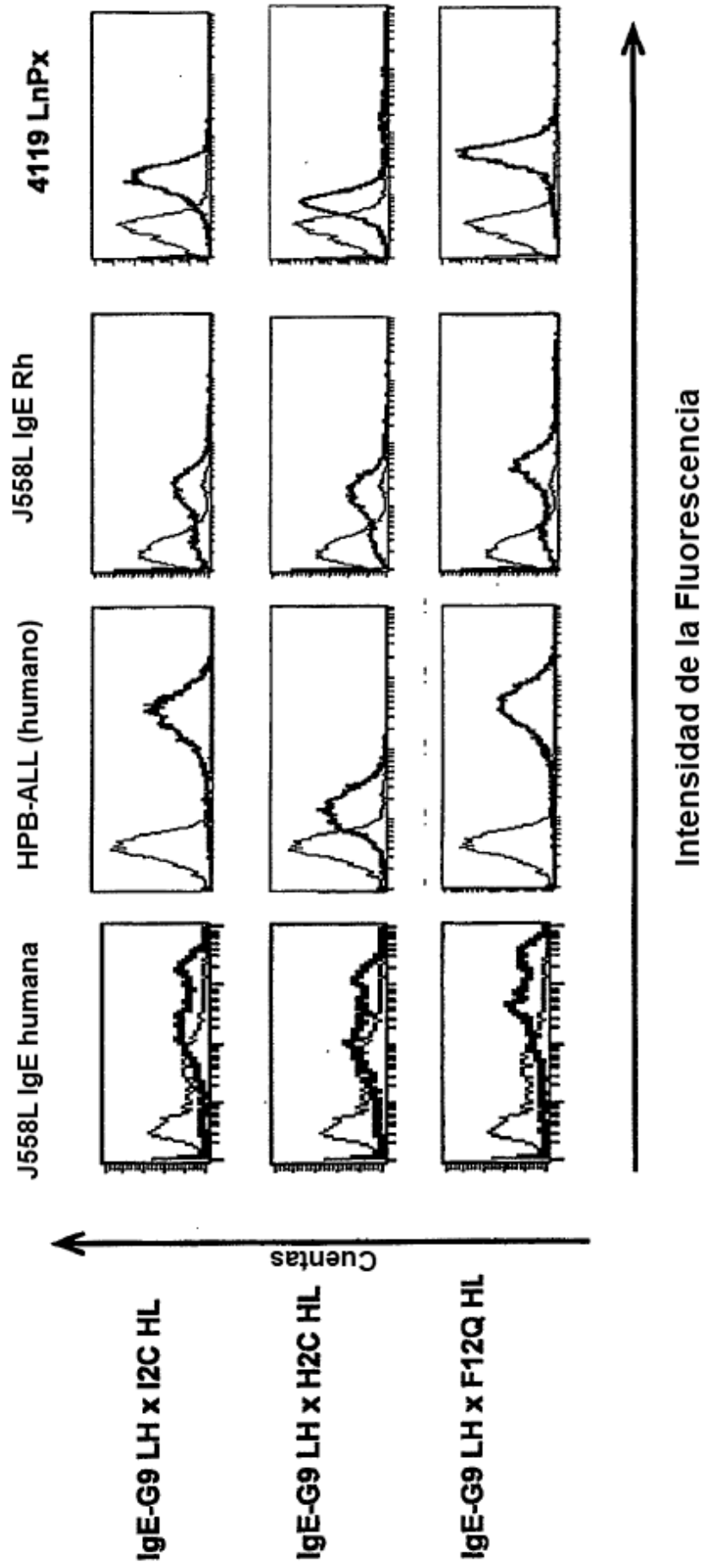
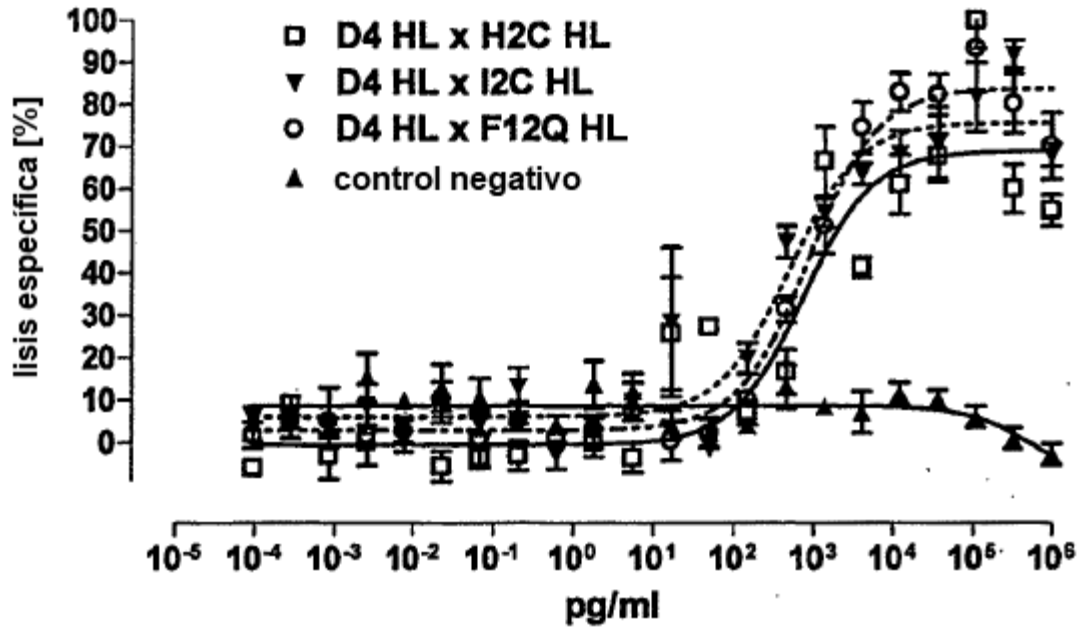


Figura 42a

A)

Células efectoras: PBMC humanas deplecionadas de CD4/CD56 estimuladas

Células diana: células J558L transfectadas con IgE humana



B)

Células efectoras: 4119LnPx

Células diana: células J558L transfectadas con IgE de macaco

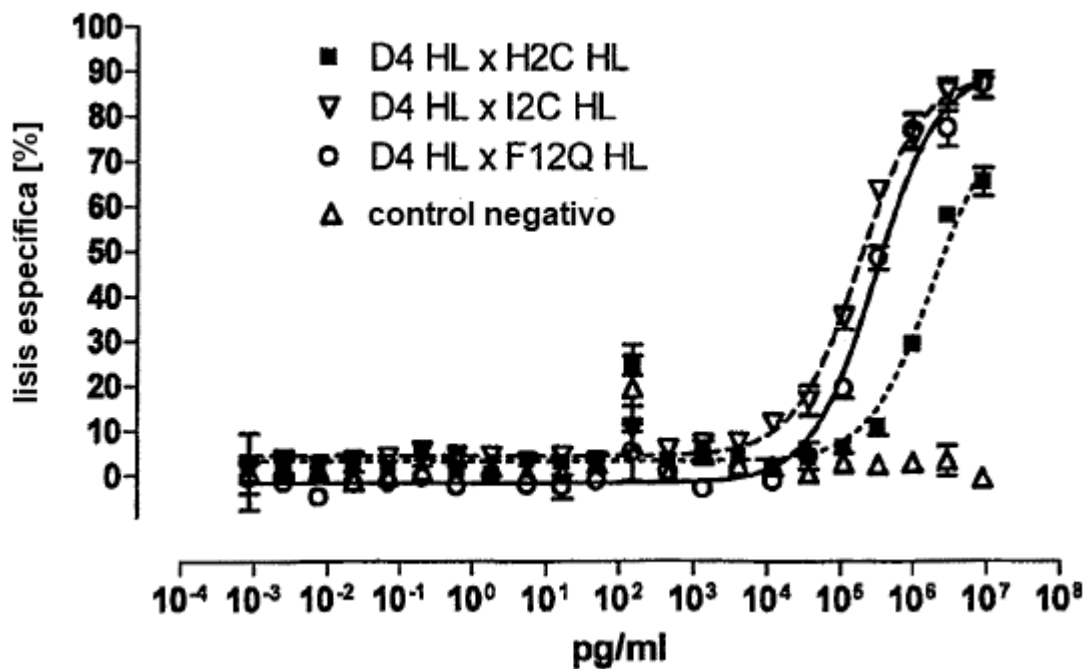
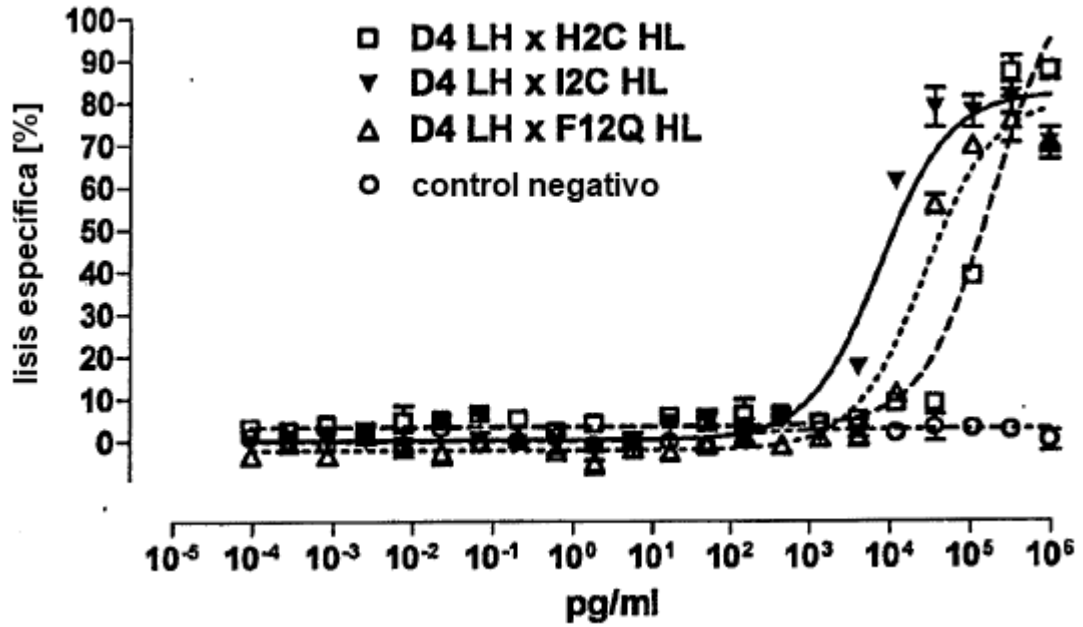


Figura 42b

A)

Células efectoras: PBMC humanas deplecionadas de CD4/CD56 estimuladas

Células diana: células J558L transfectadas con IgE humana



B)

Células efectoras: 4119LnPx

Células diana: células J558L transfectadas con IgE de macaco

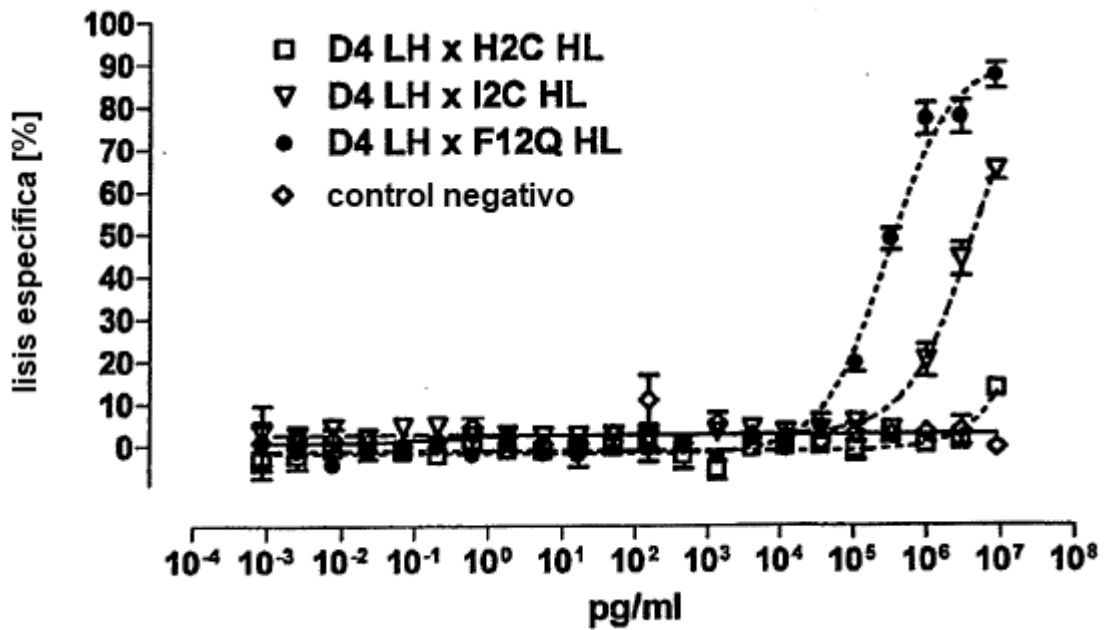
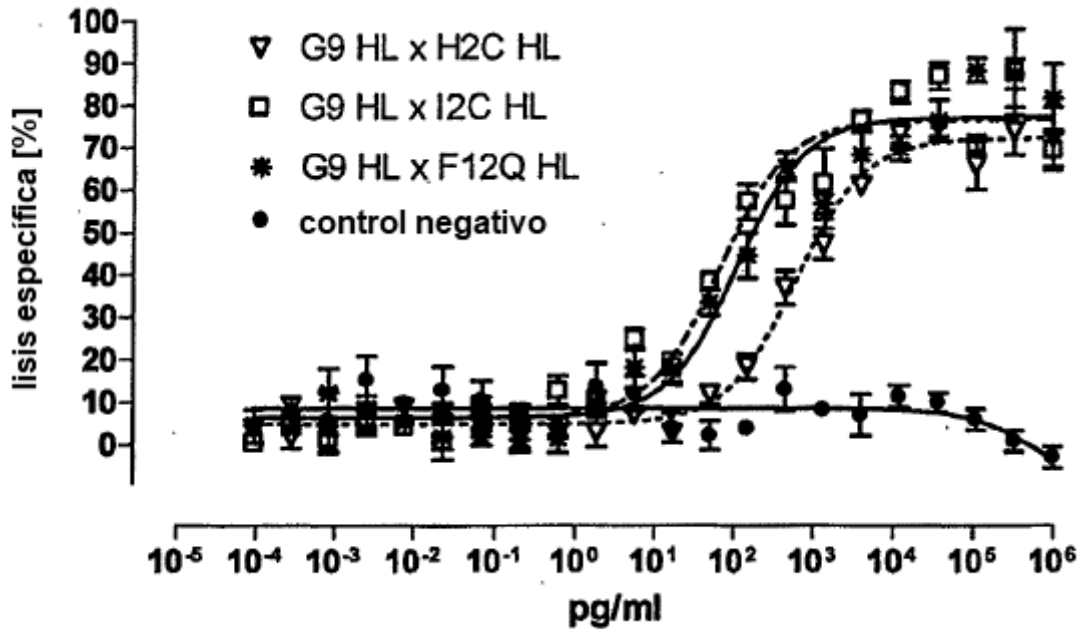


Figura 42c

A)

Células efectoras: PBMC humanas deplecionadas de CD4/CD56 estimuladas

Células diana: células J558L transfectadas con IgE humana



B)

Células efectoras: 4119LnPx

Células diana: células J558L transfectadas con IgE de macaco

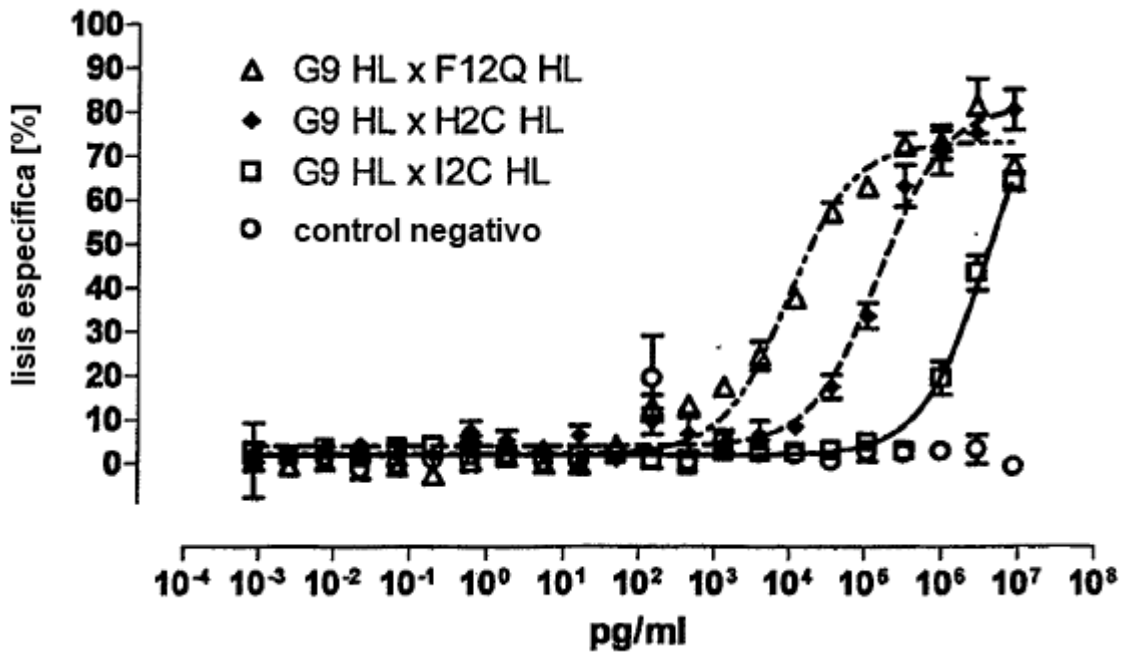
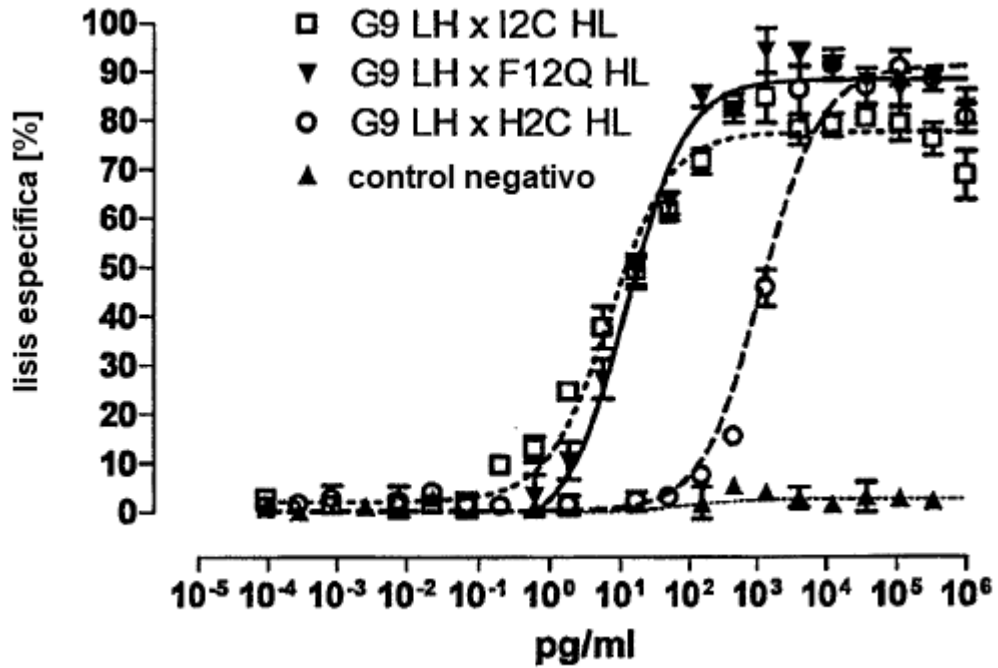


Figura 42d

A)

Células efectoras: PBMC humanas deplecionadas de CD4/CD56 estimuladas

Células diana: células J558L transfectadas con IgE humana



B)

Células efectoras: 4119LnPx

Células diana: células J558L transfectadas con IgE de macaco

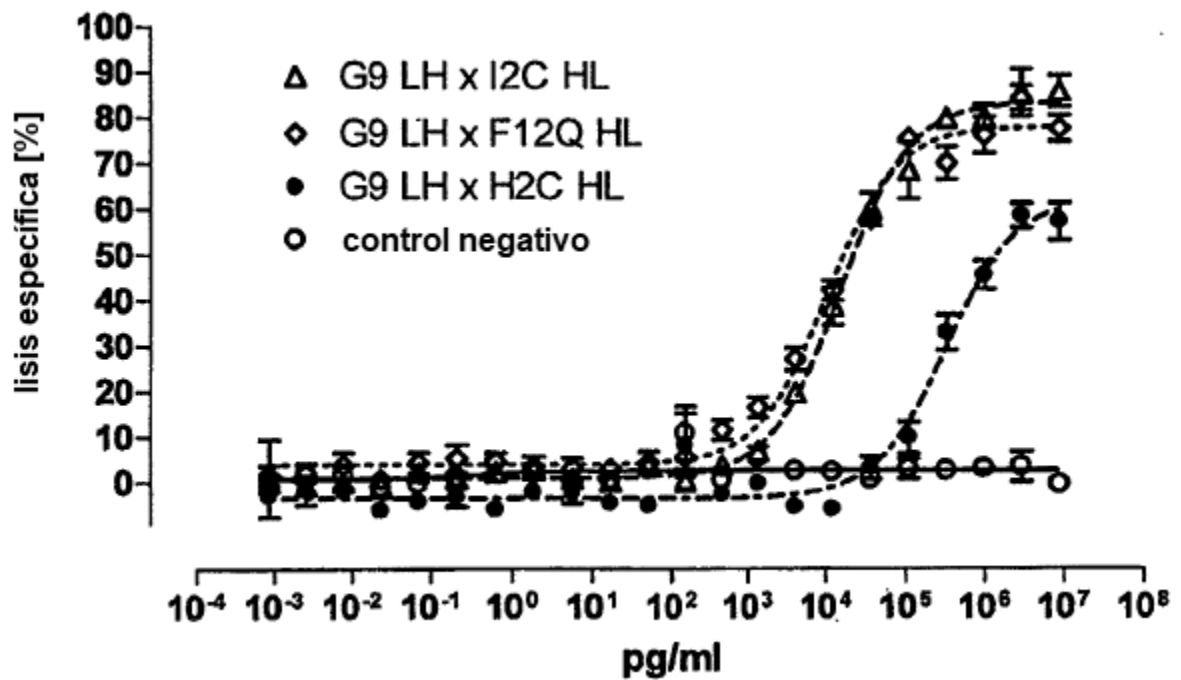
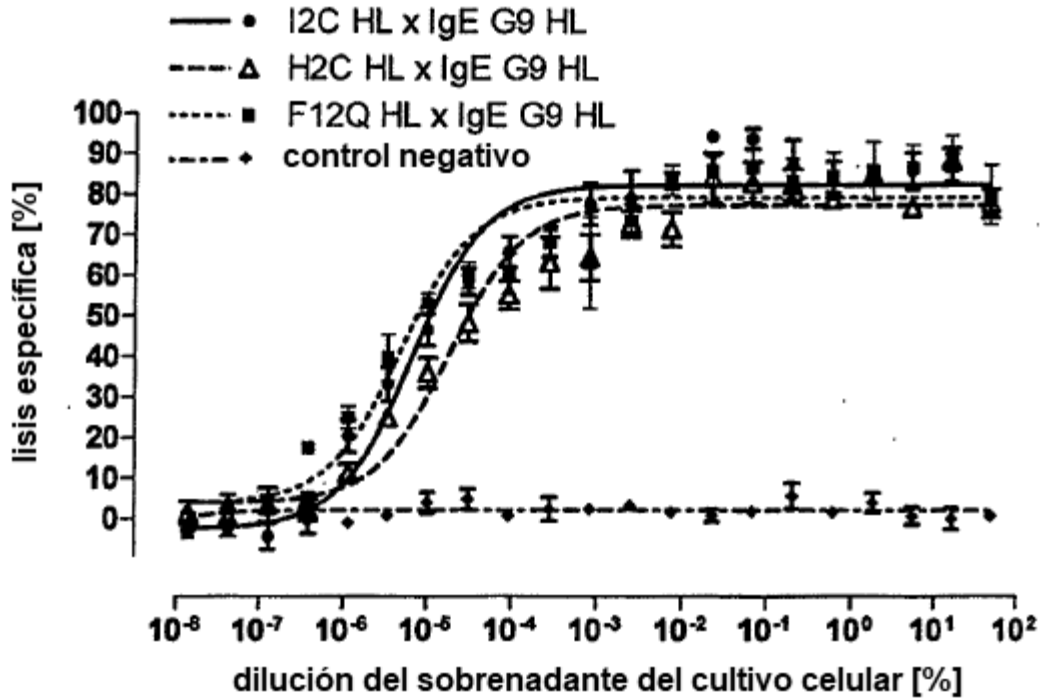


Figura 42e

A)

Células efectoras: PBMC humanas deplecionadas de CD4/CD56 estimuladas

Células diana: células J558L transfectadas con IgE humana



B)

Células efectoras: 4119LnPx

Células diana: células J558L transfectadas con IgE de macaco

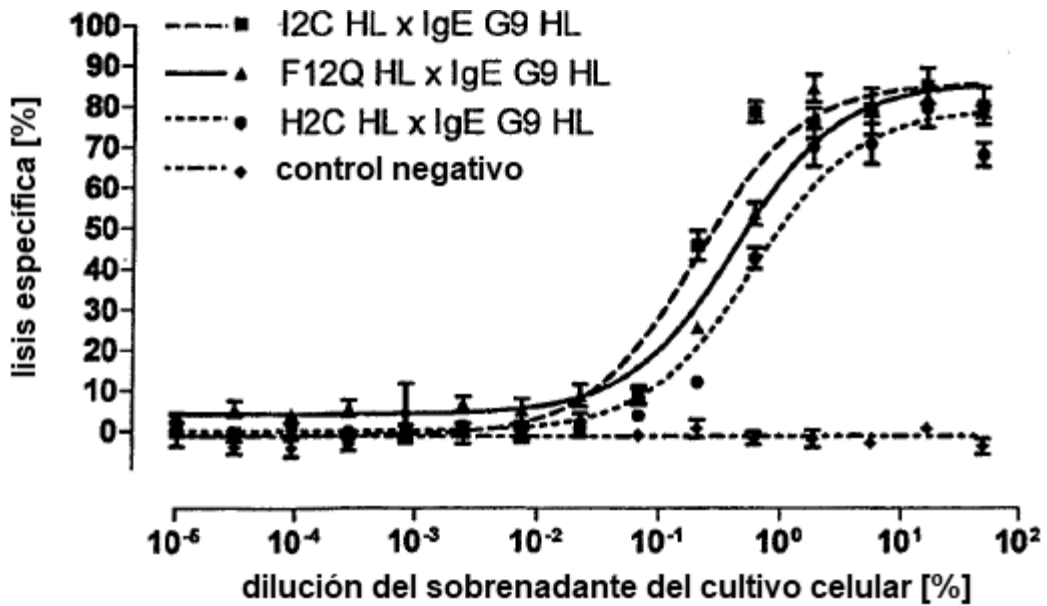
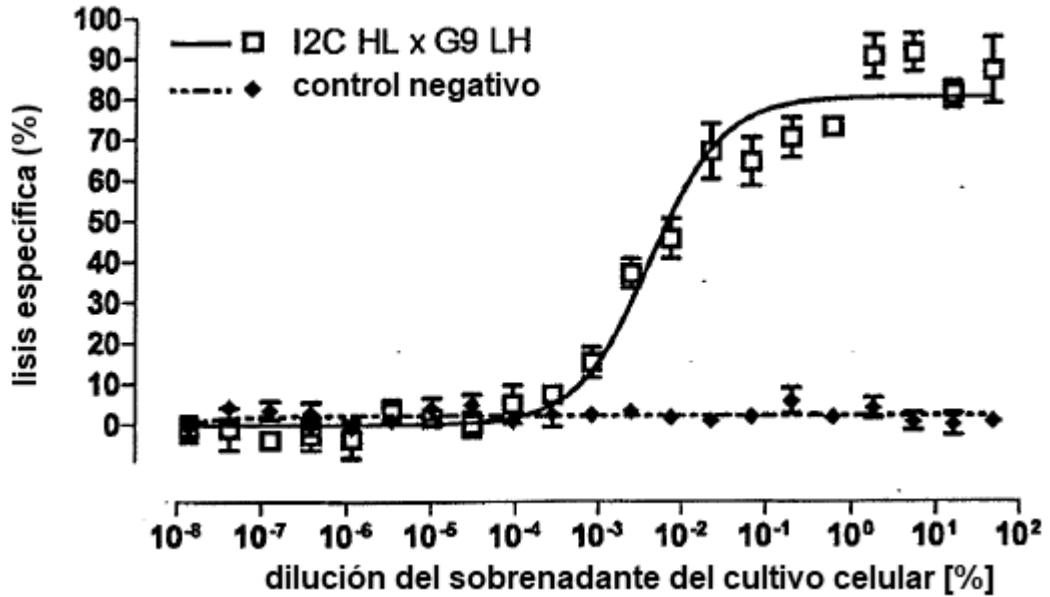


Figura 42f

A)

Células efectoras: PBMC humanas deplecionadas de CD4/CD56 estimuladas

Células diana: células J558L transfectadas con IgE humana



B)

Células efectoras: 4119LnPx

Células diana: células J558L transfectadas con IgE de macaco

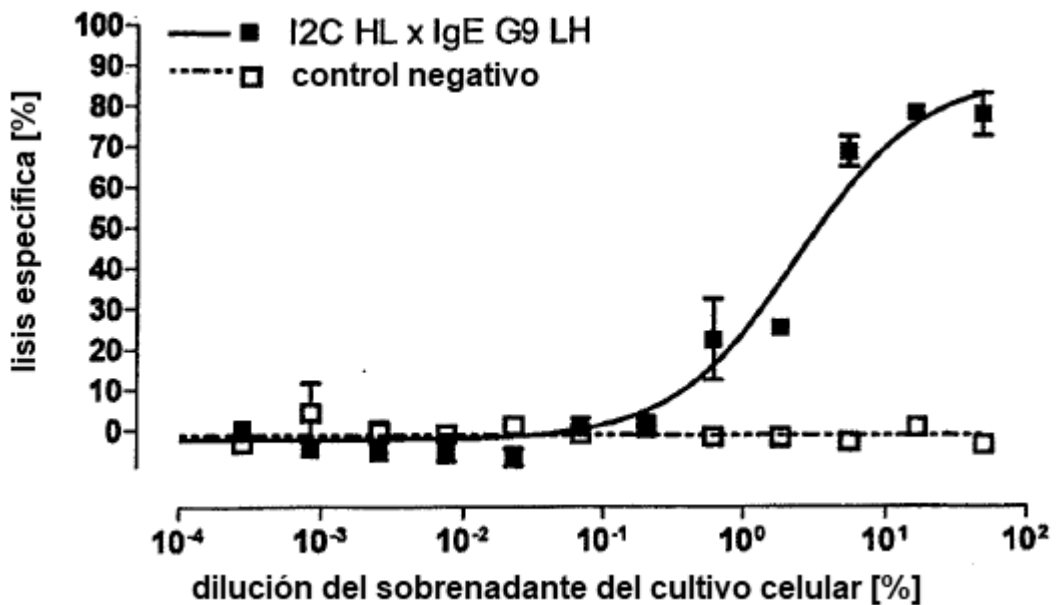
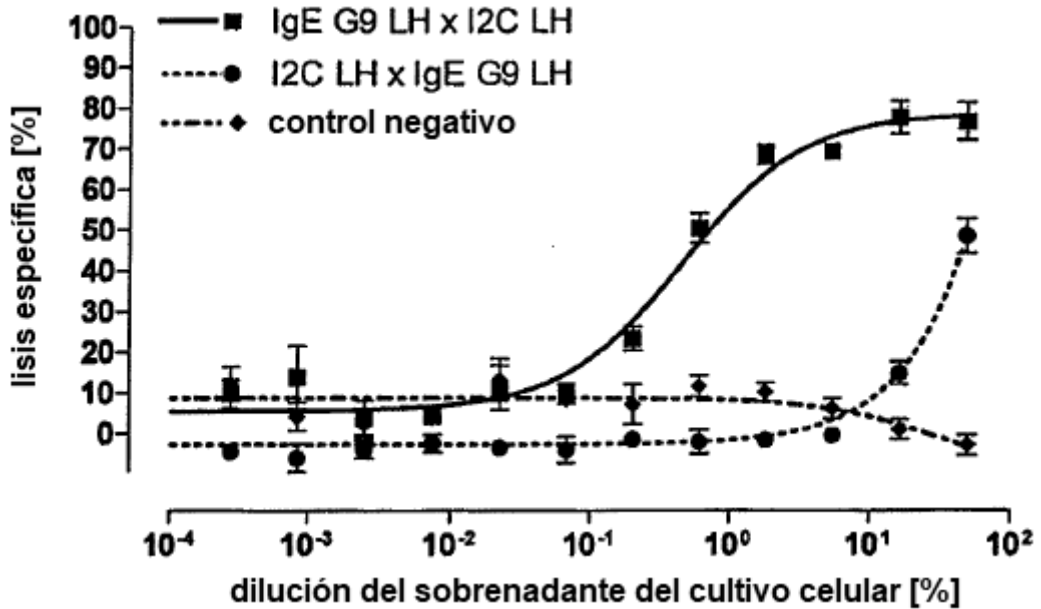


Figura 42g

A)

Células efectoras: PBMC humanas deplecionadas de CD4/CD56 estimuladas

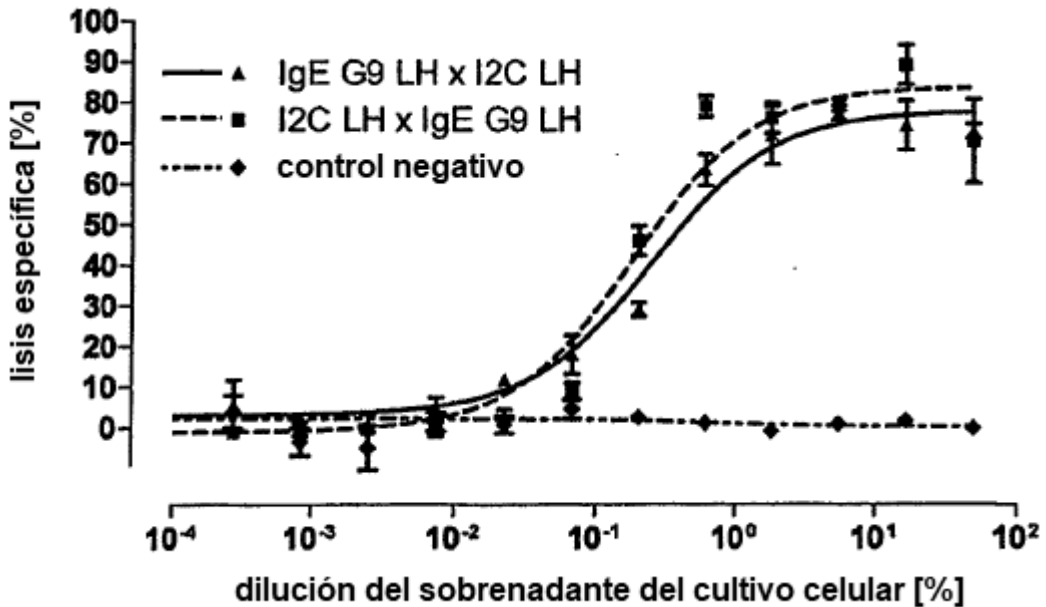
Células diana: células J558L transfectadas con IgE humana



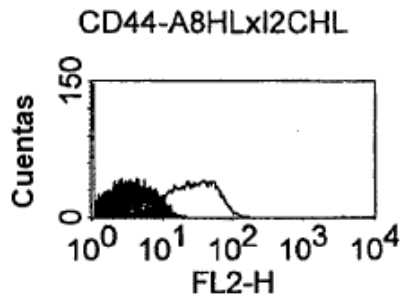
B)

Células efectoras: 4119LnPx

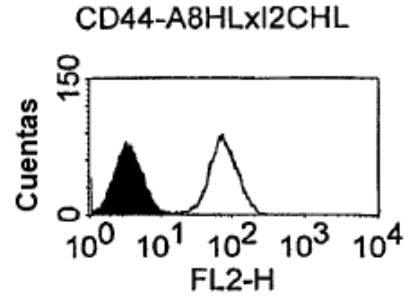
Células diana: células J558L transfectadas con IgE de macaco



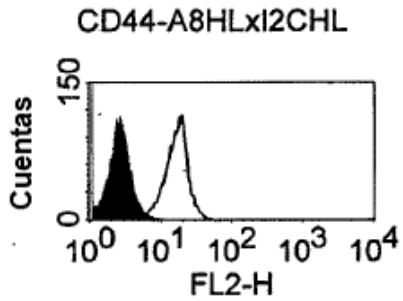
CHO transfectadas con CD44 humano



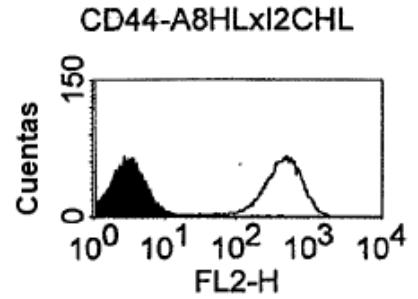
HPB-ALL



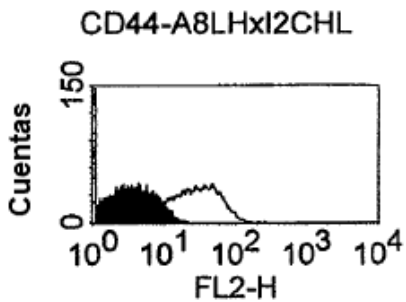
CHO transfectadas con CD44 de macaco



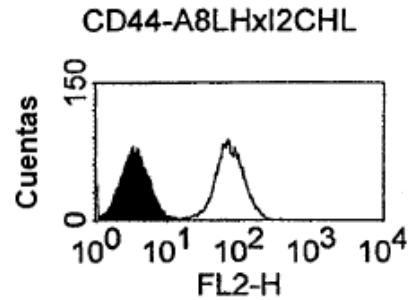
PBMC de macaco



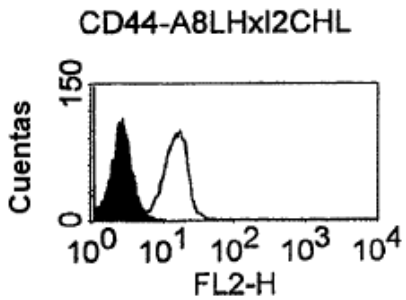
CHO transfectadas con CD44 humano



HPB-ALL



CHO transfectadas con CD44 de macaco



PBMC de macaco

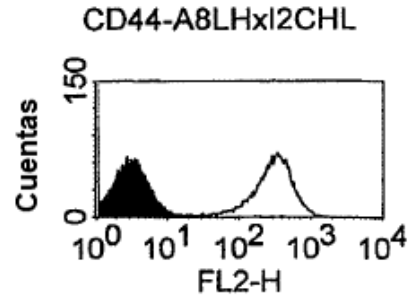
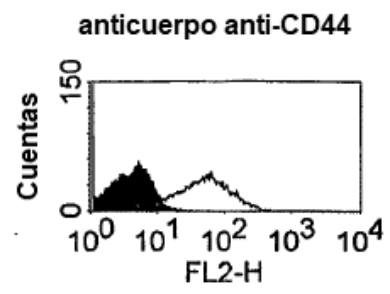
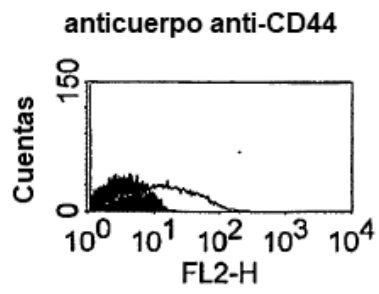


Figura 43

CHO transfectadas con CD44 humano

CHO transfectadas con CD44 sin v6 humano



CHO transfectadas con CD44 sin v6 humano

CHO transfectadas con CD44 sin v6 humano

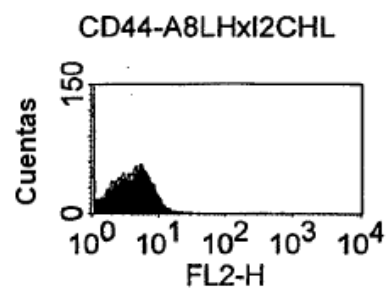
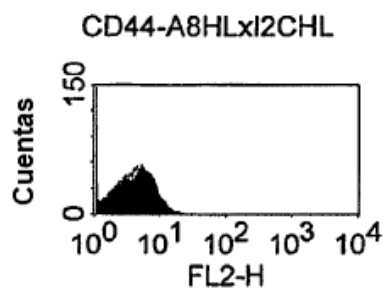


Figura 44

Células efectoras: PBMC humanas deplecionadas de CD4/CD56 estimuladas

Células diana: CHO transfectadas con CD44 humano

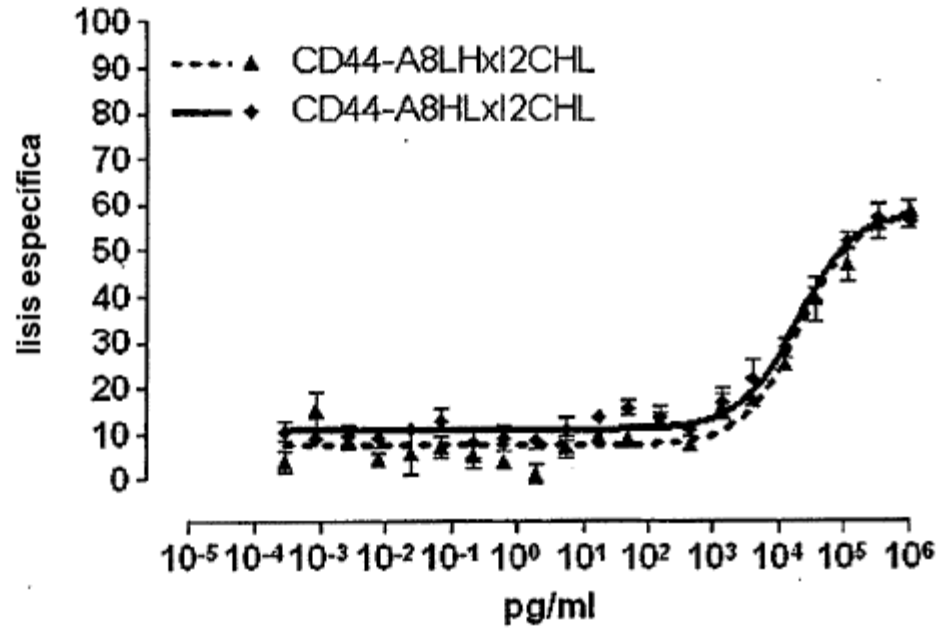
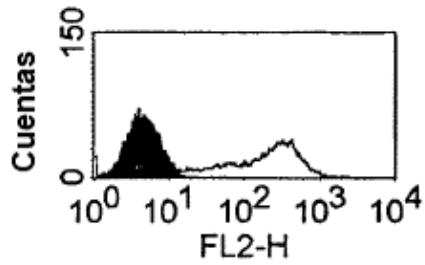


Figura 45

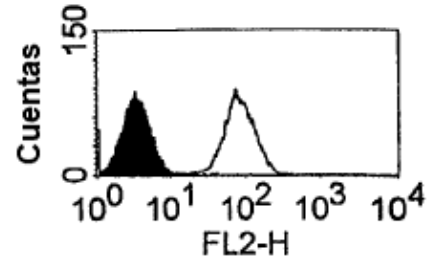
CHO transfectadas con CD30 humano

M9 11HLxI2CHL



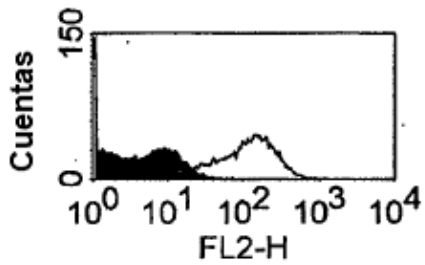
HPB-ALL

M9 11HLxI2CHL



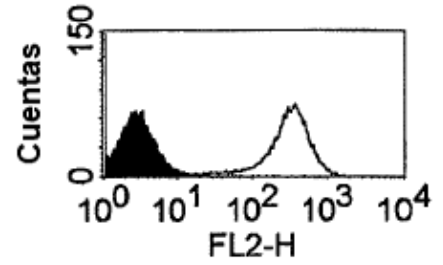
CHO transfectadas con CD30 de macaco

M9 11HLxI2CHL



PBMC de macaco

M9 11HLxI2CHL



MEC-1

M9 11HLxI2CHL

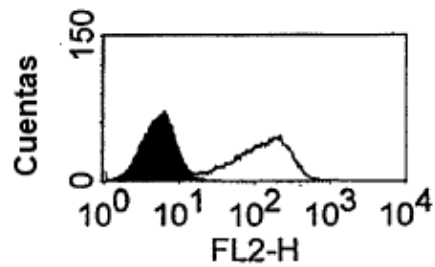
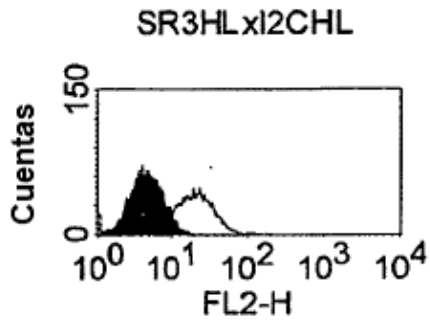
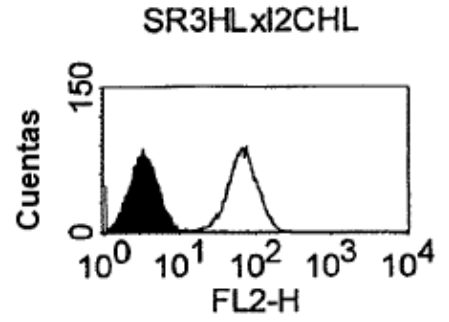


Figura 46 (1)

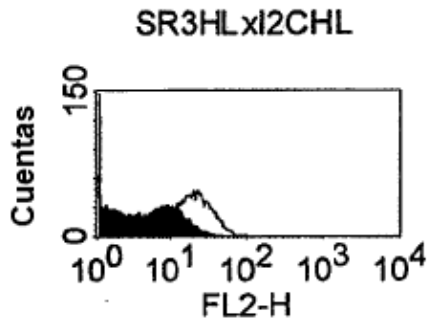
CHO transfectadas con CD30 humano



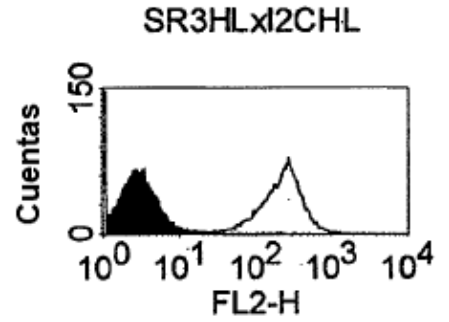
HPB-ALL



CHO transfectadas con CD30 de macaco



PBMC de macaco



MEC-1

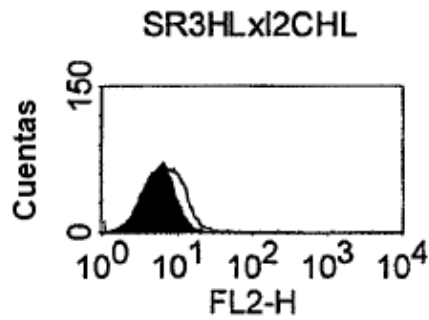
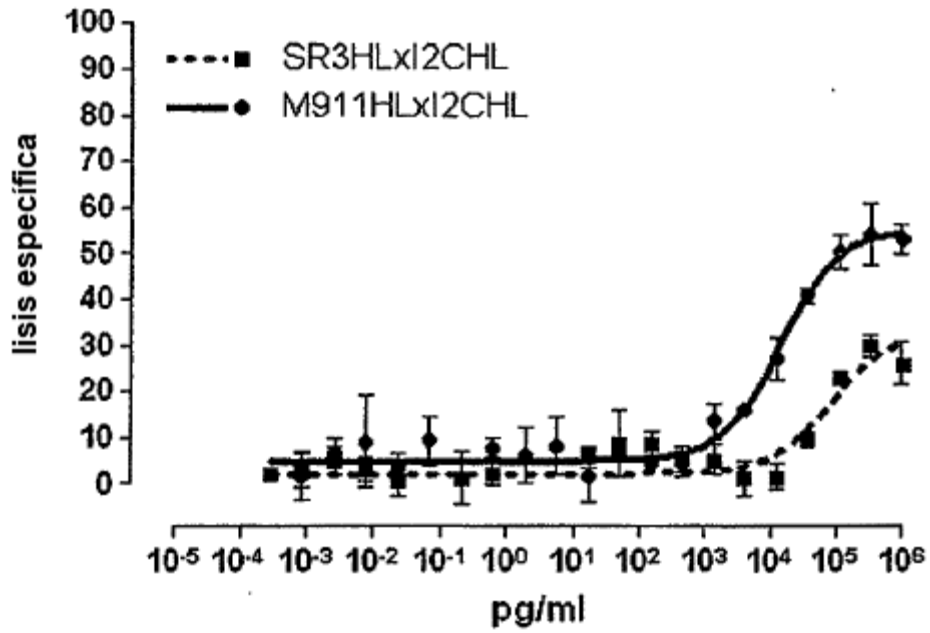


Figura 46 (2)

Células efectoras: PBMC humanas deplecionadas de CD4/CD56 estimuladas

Células diana: MEC-1



Células efectoras: 4119 LnPx de macaco

Células diana: CHO transfectadas con CD30 de macaco

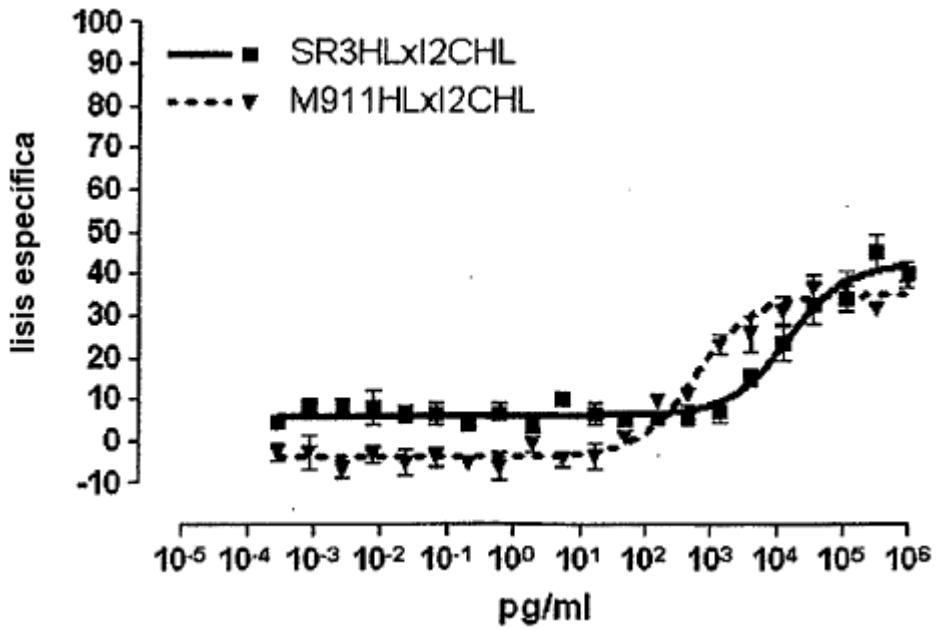


Figura 47

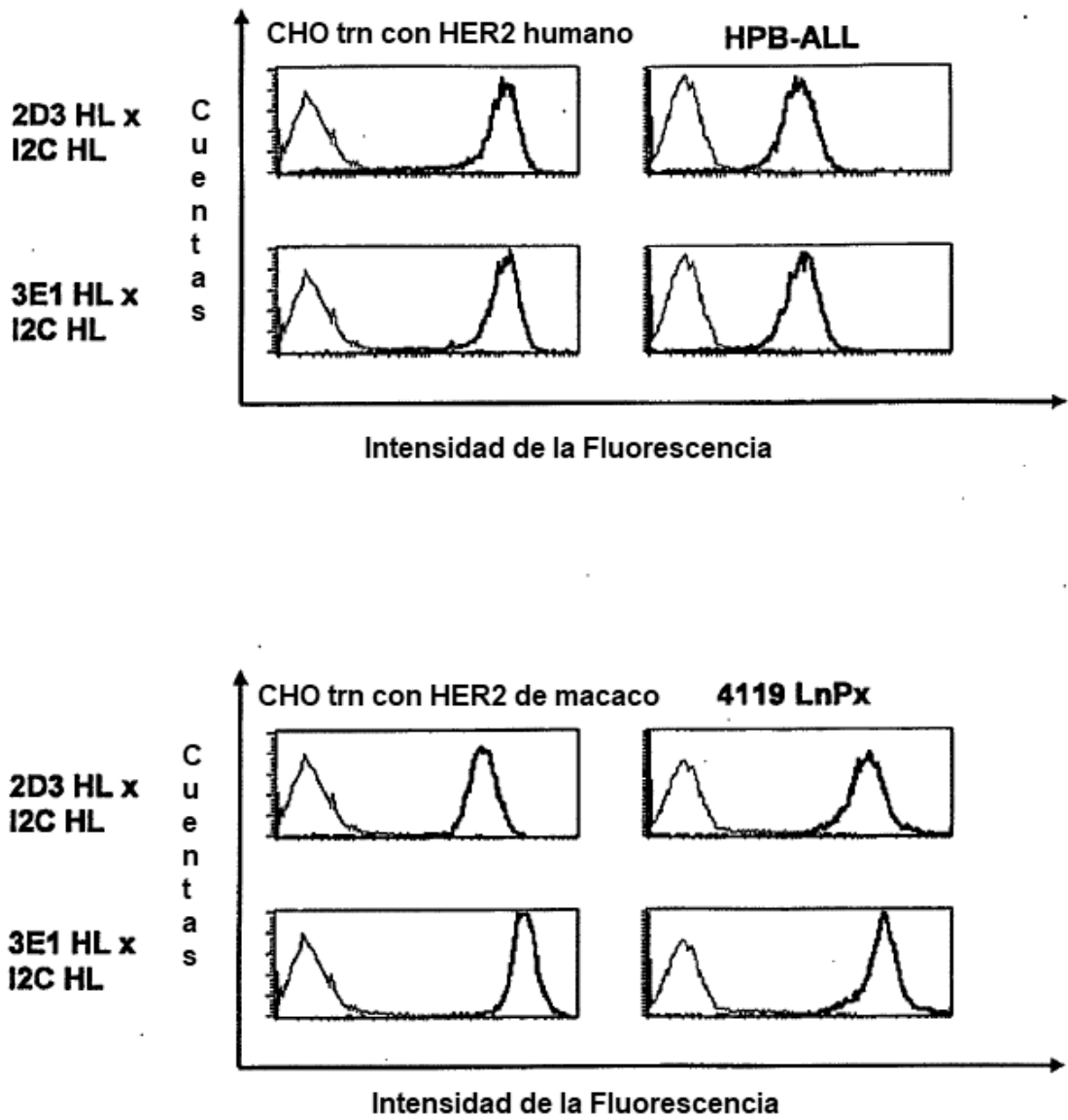


Figura 48

Células efectoras: PBMC humanas deplecionadas de CD56 no estimuladas

Células diana: CHO transfectadas con HER2 humano

Relación E:D: 10:1

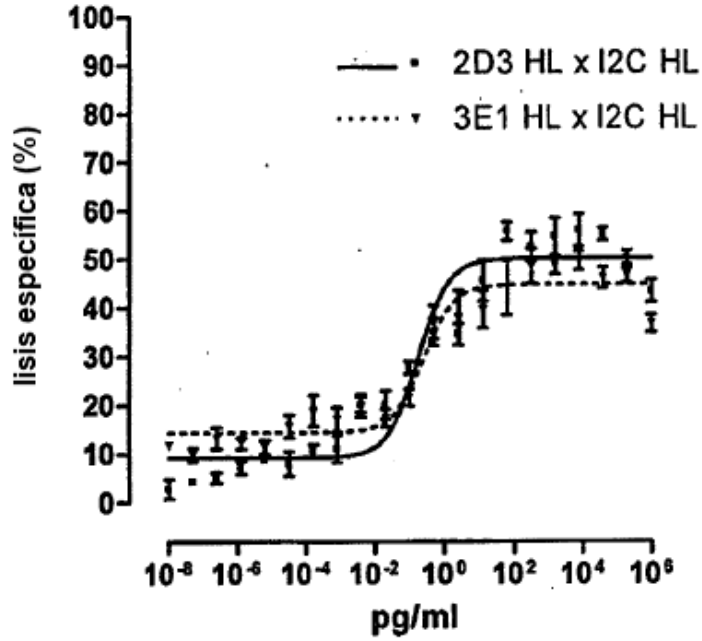


Figura 49a

Células efectoras: 4119 LnPx

Células diana: CHO transfectadas con HER2 de macaco

Relación E:D: 10:1

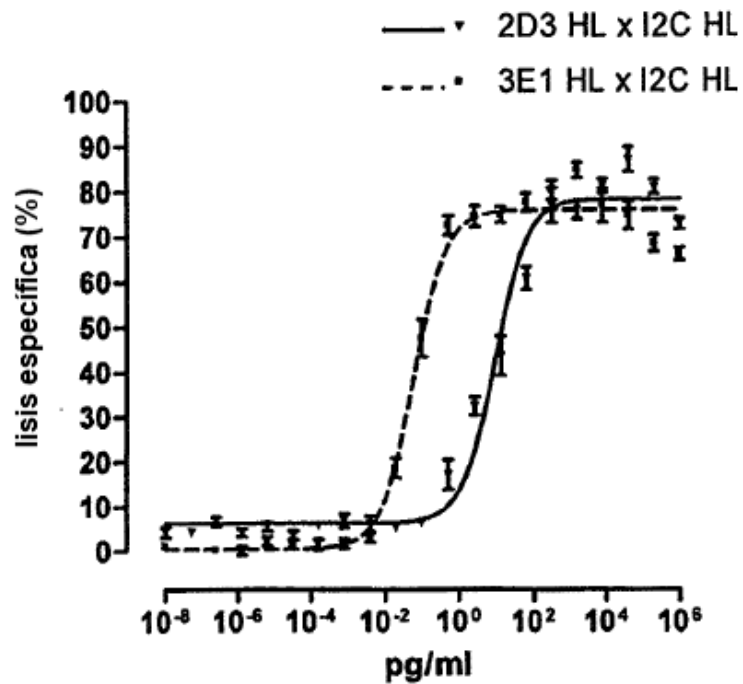


Figura 49b

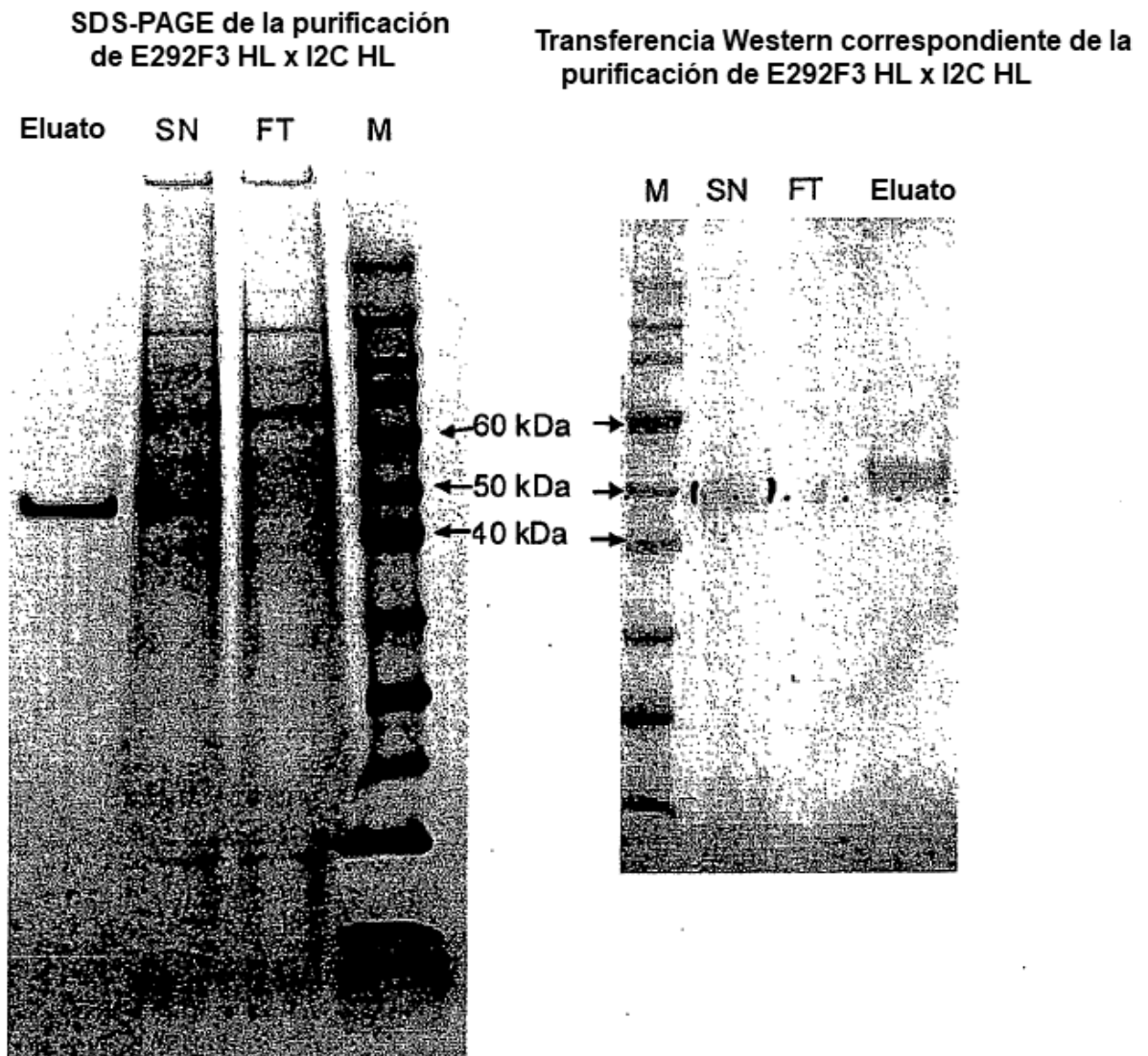


Figura 50

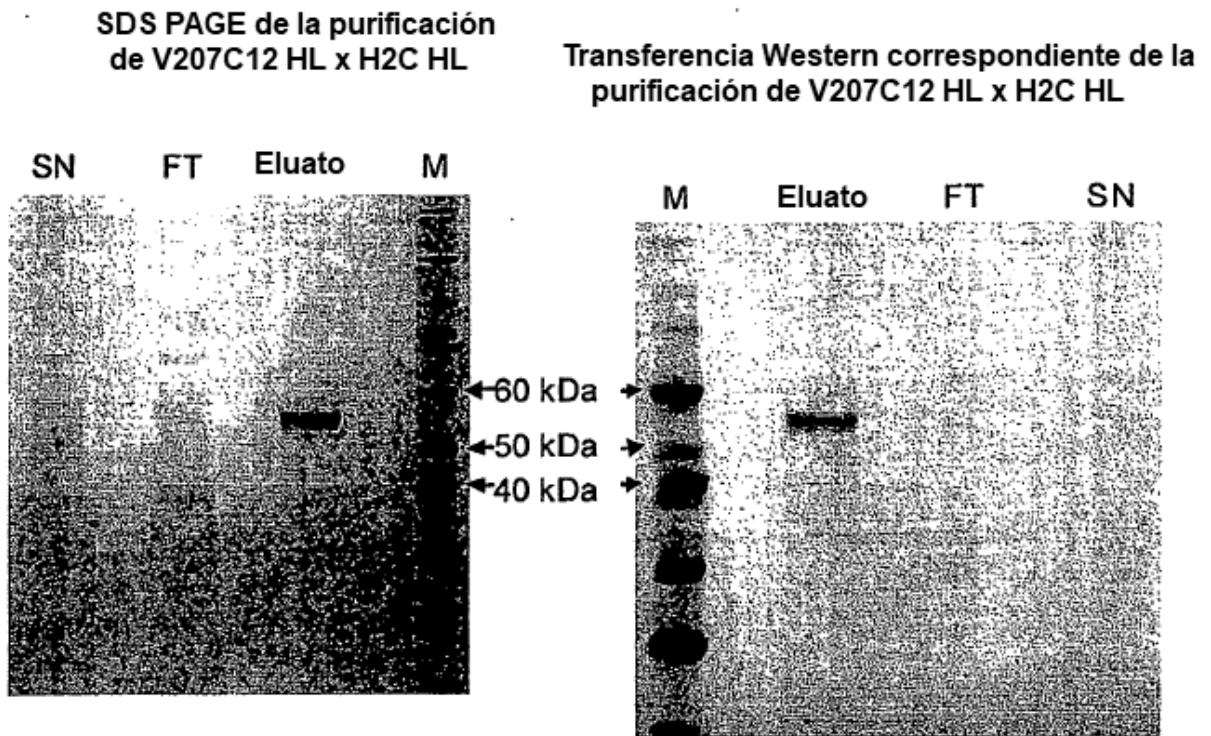


Figura 51

SDS PAGE de la purificación
de AF5HLxF12QHL

Transferencia Western correspondiente de la
purificación de AF5HLxF12QHL

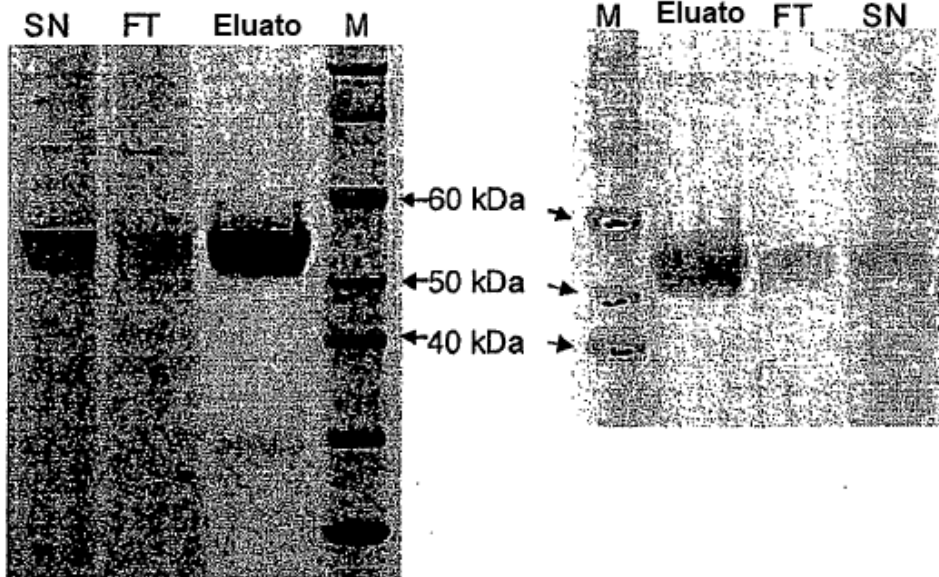


Figura 52

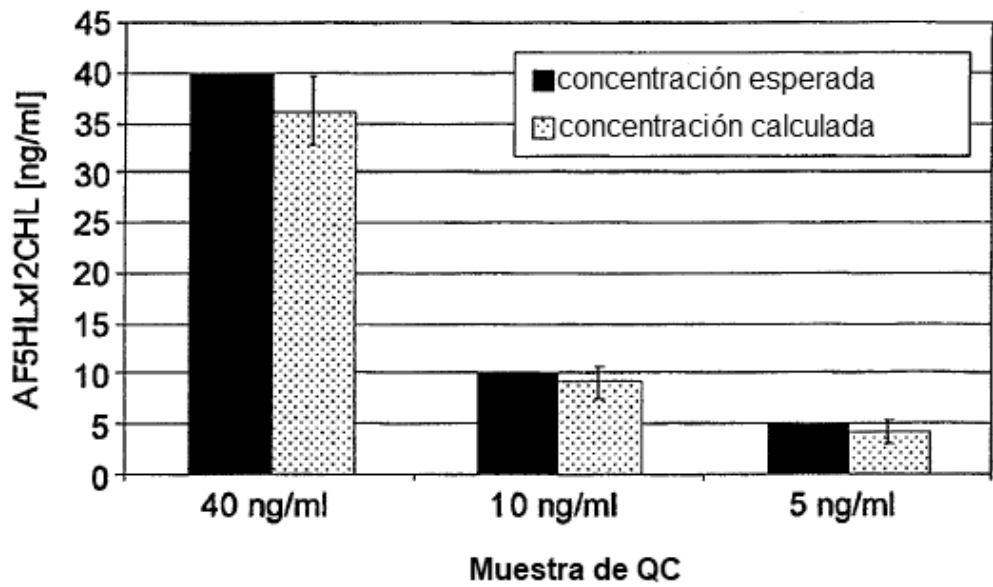
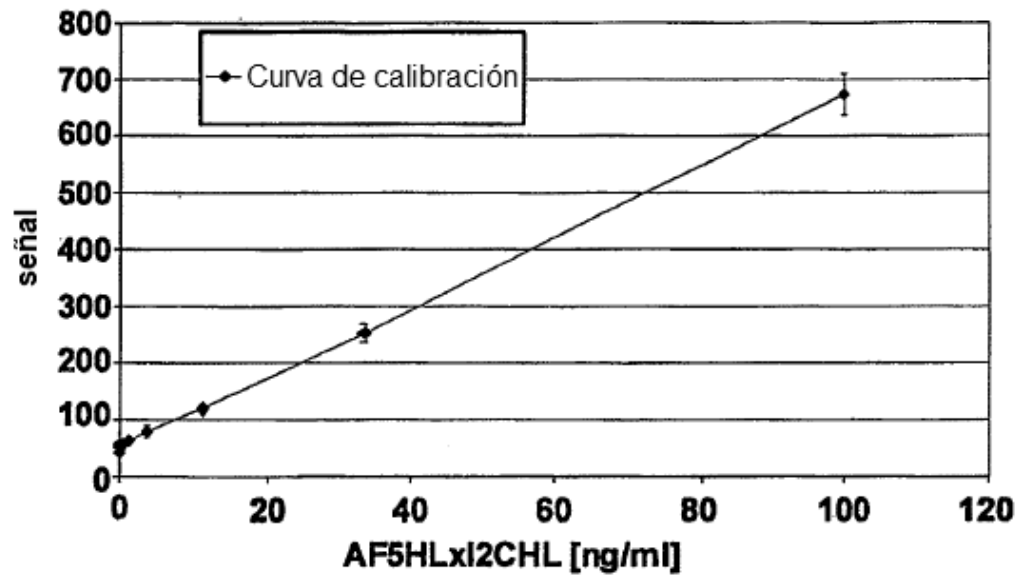


Figura 53

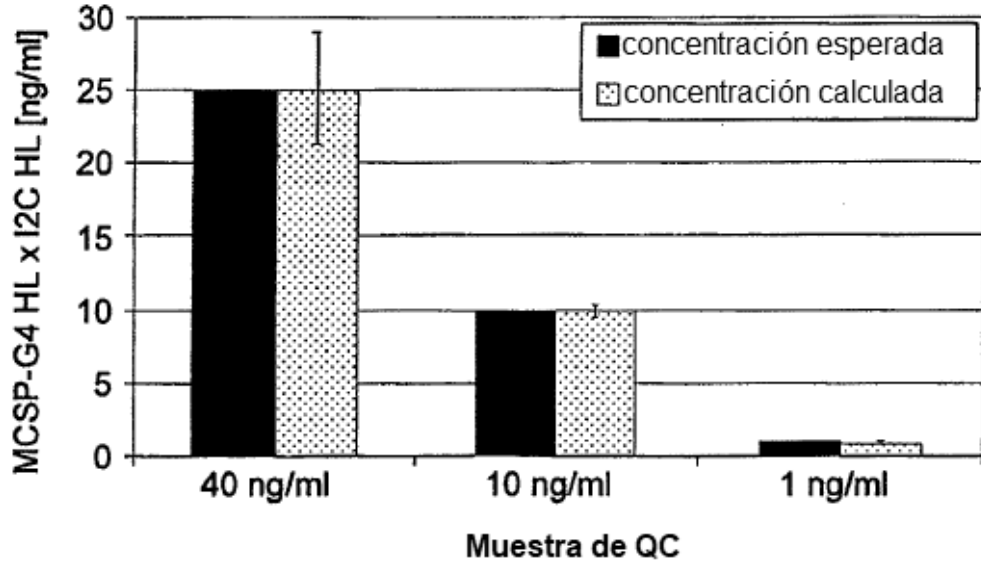
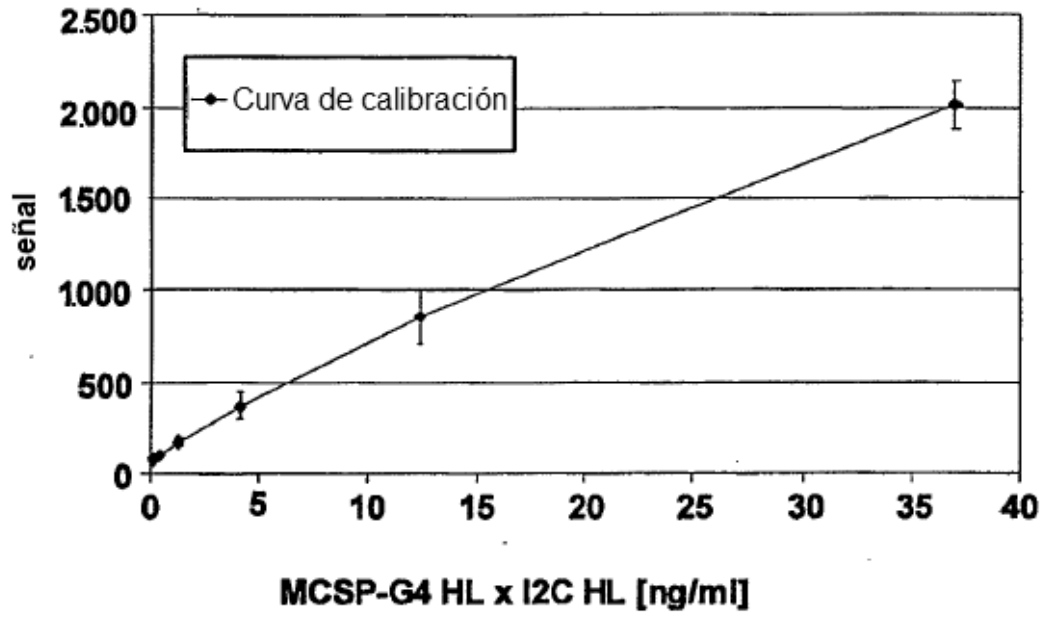


Figura 54

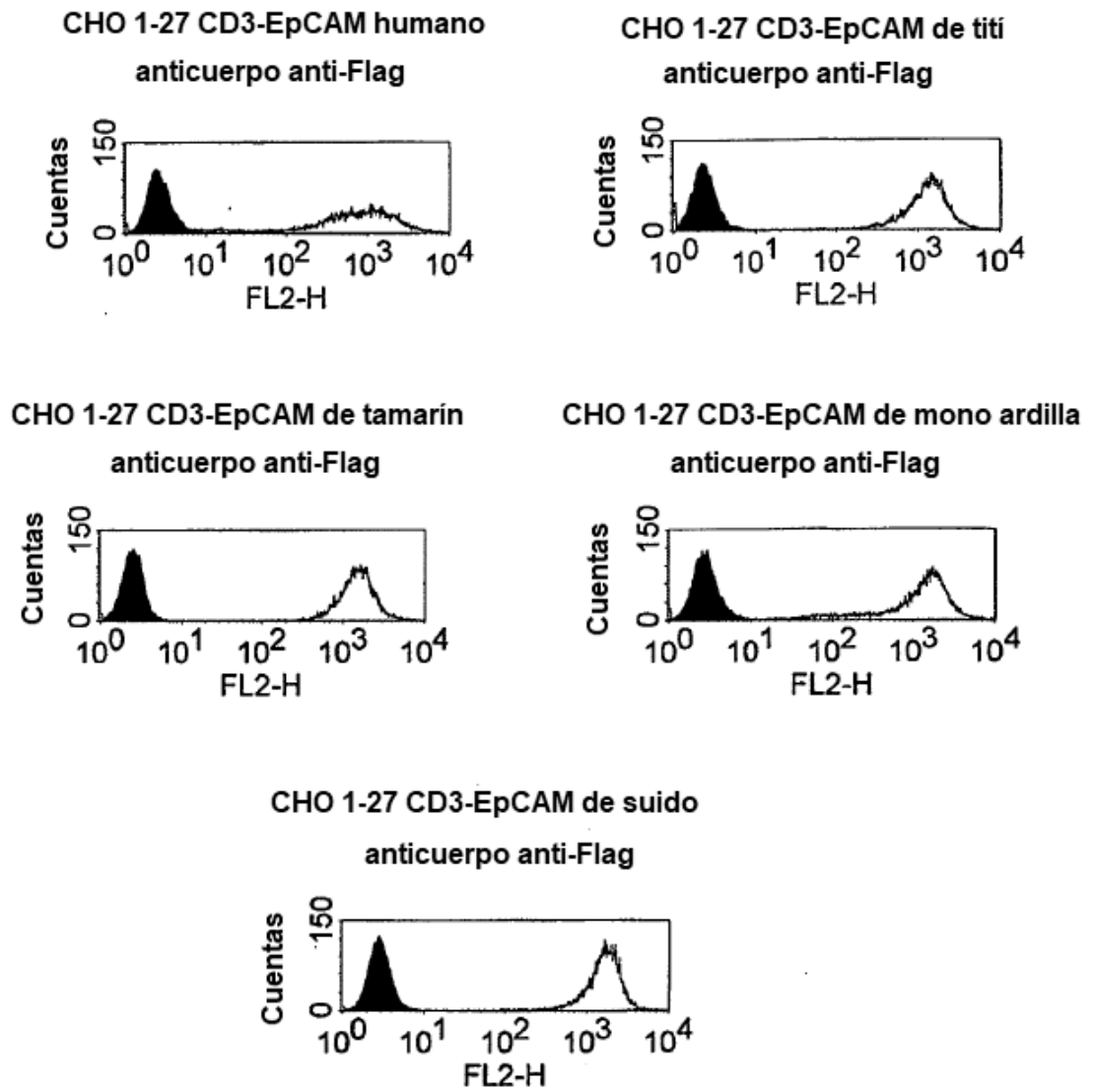


Figura 55

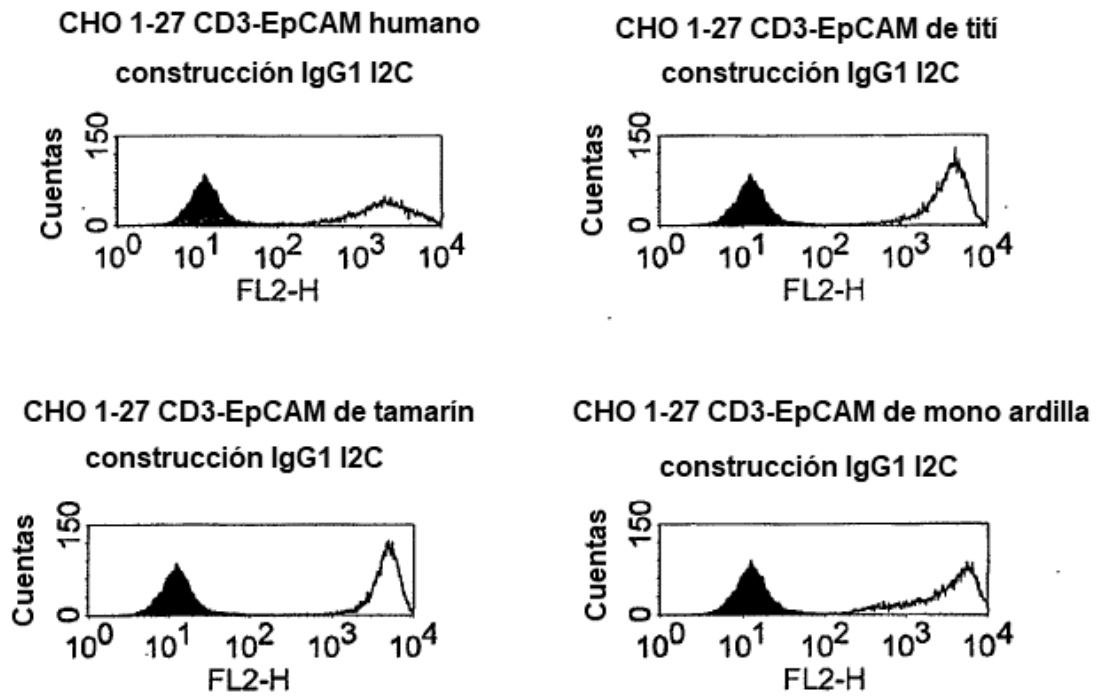


Figura 56

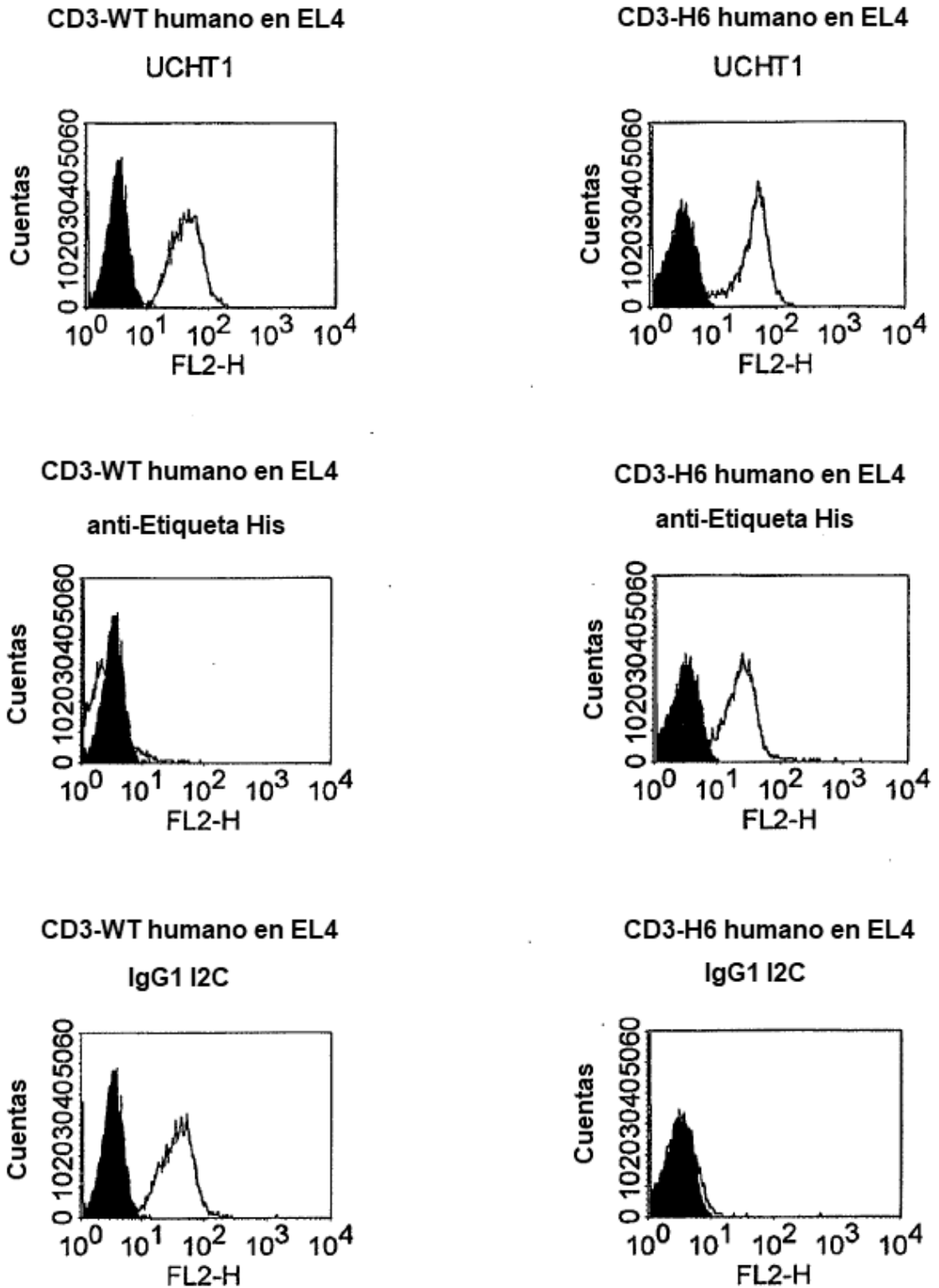
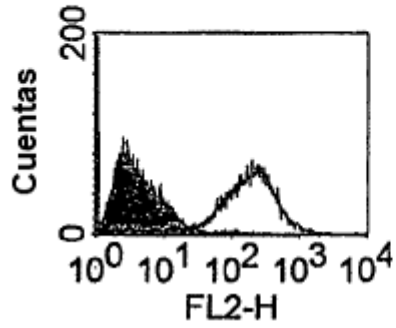
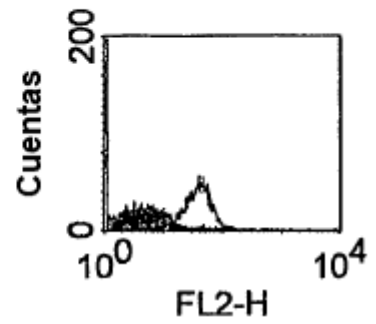


Figura 57

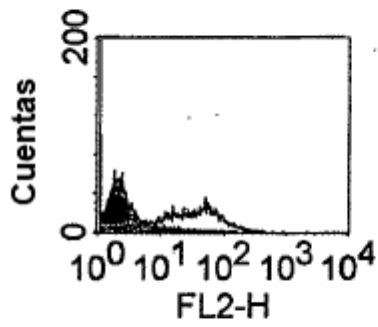
CHO MCSP D3 humano
MCSP-A9 HL x H2C HL



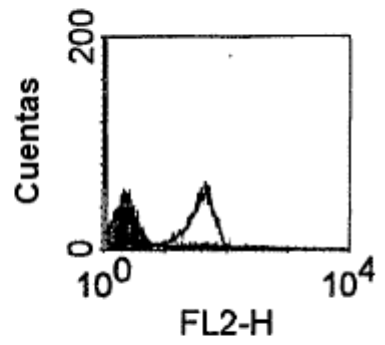
HPBall
MCSP-A9 HL x H2C HL



CHO MCSP D3 de macaco
MCSP-A9 HL x H2C HL



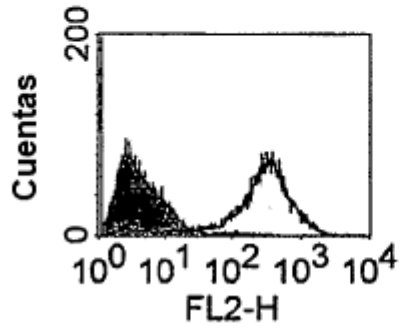
4119LnPx
MCSP-A9 HL x H2C HL



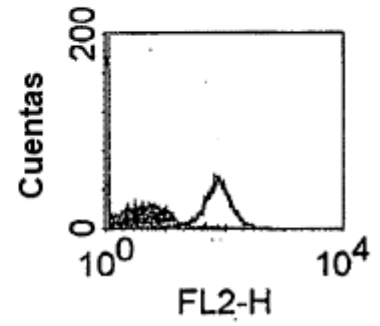
Intensidad de la Fluorescencia

Figura 58a

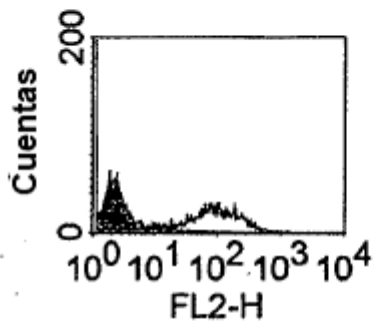
CHO MCSP D3 humano
MCSP-A9 HL x F12Q HL



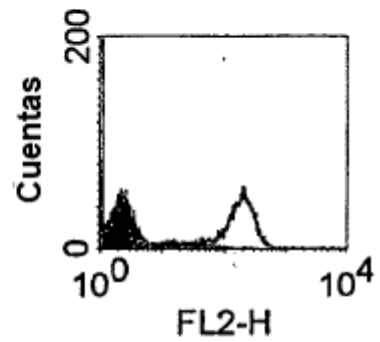
HPBall
MCSP-A9 HL x F12Q HL



CHO MCSP D3 de macaco
MCSP-A9 HL x F12Q HL



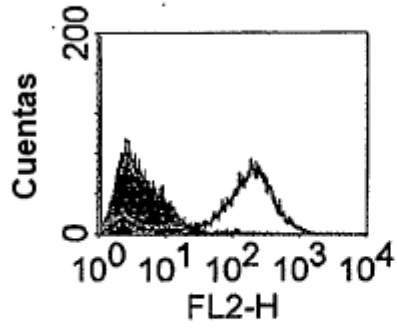
4119LnPx
MCSP-A9 HL x F12Q HL



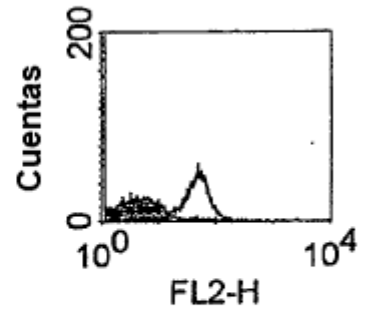
Intensidad de la Fluorescencia

Figura 58b

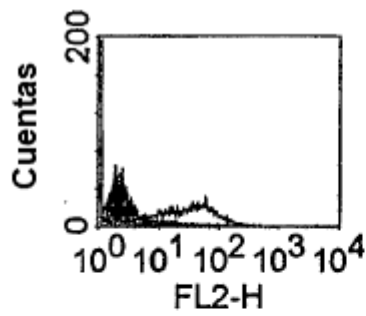
CHO MCSP D3 humano
MCSP-A9 HL x I2C HL



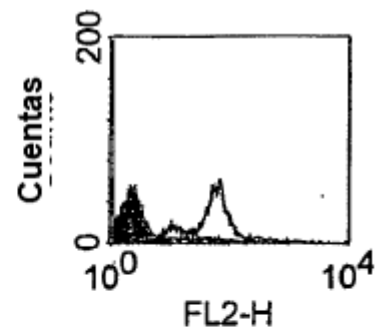
HPBall
MCSP-A9 HL x I2C HL



CHO MCSP D3 de macaco
MCSP-A9 HL x I2C HL



4119LnPx
MCSP-A9 HL x I2C HL



Intensidad de la Fluorescencia

Figura 58c

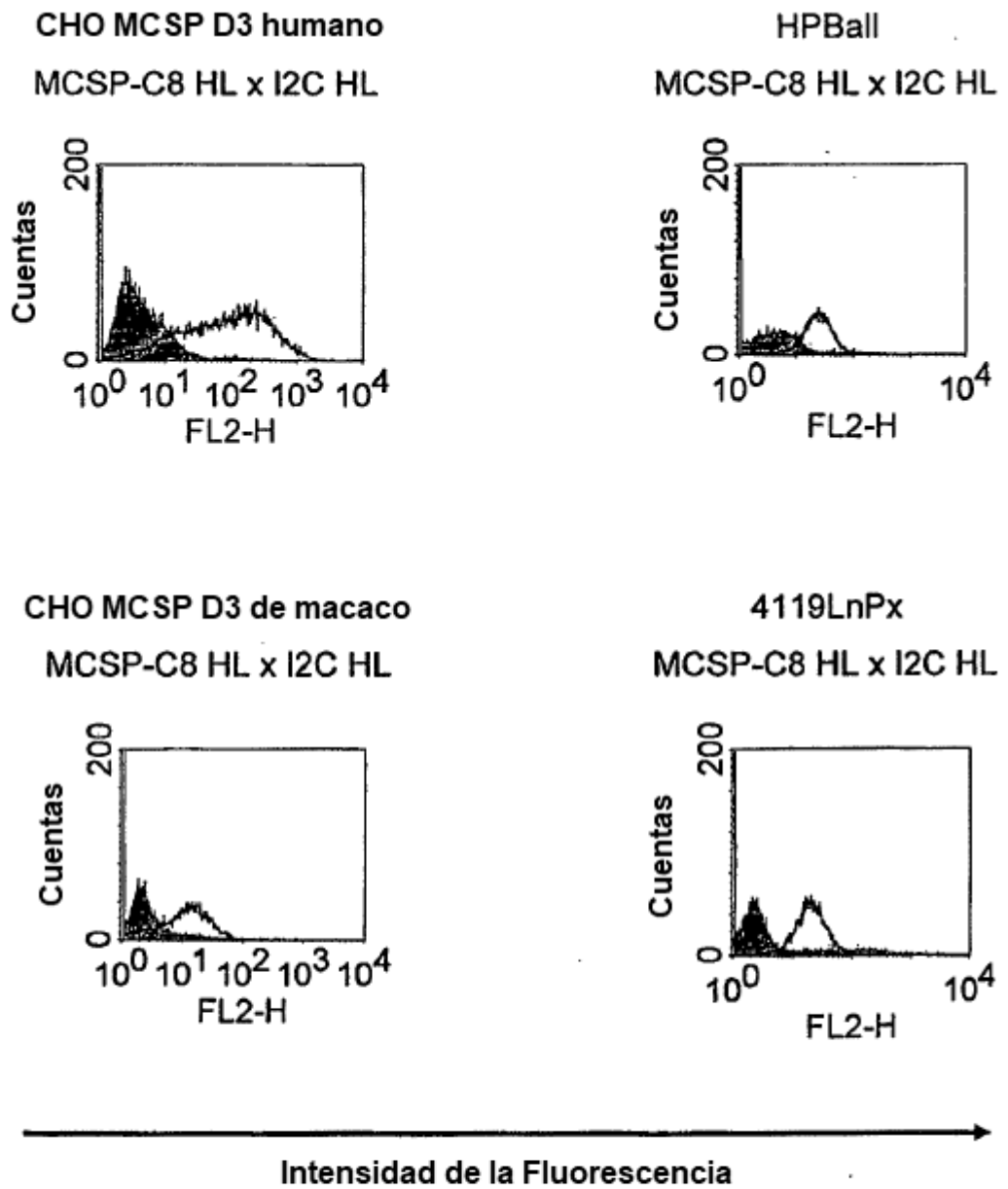


Figura 58d

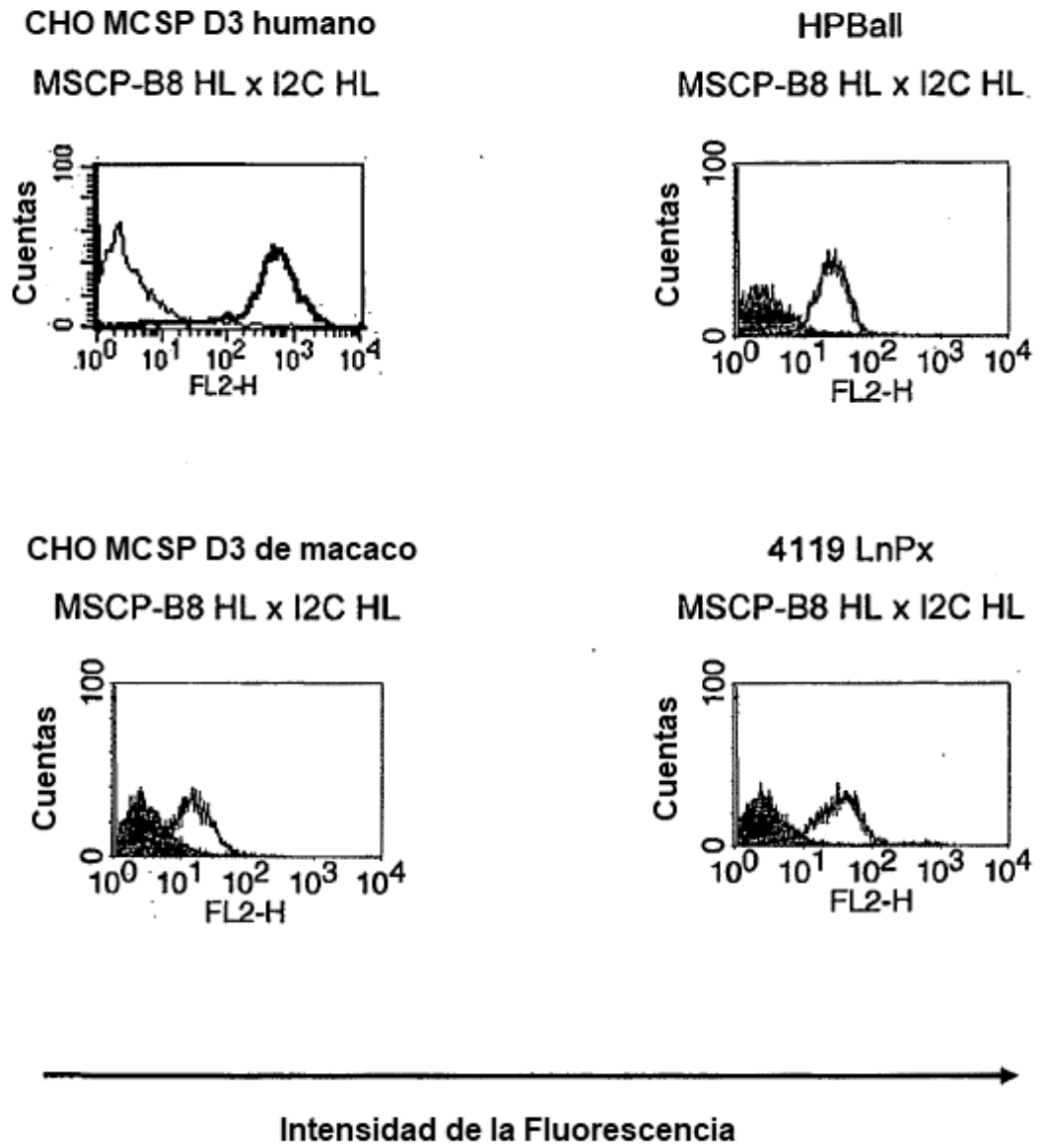


Figura 58e

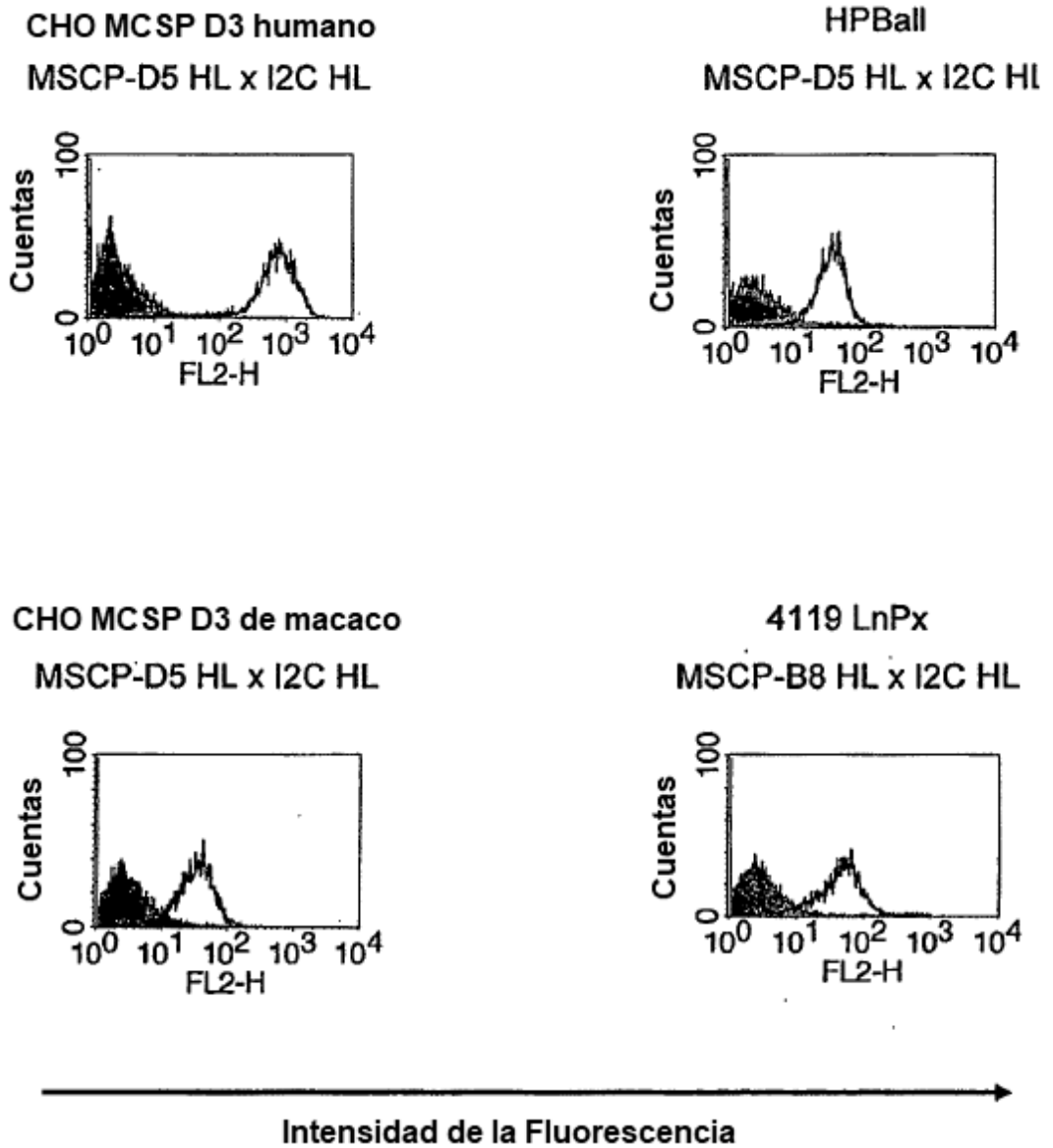


Figura 58f

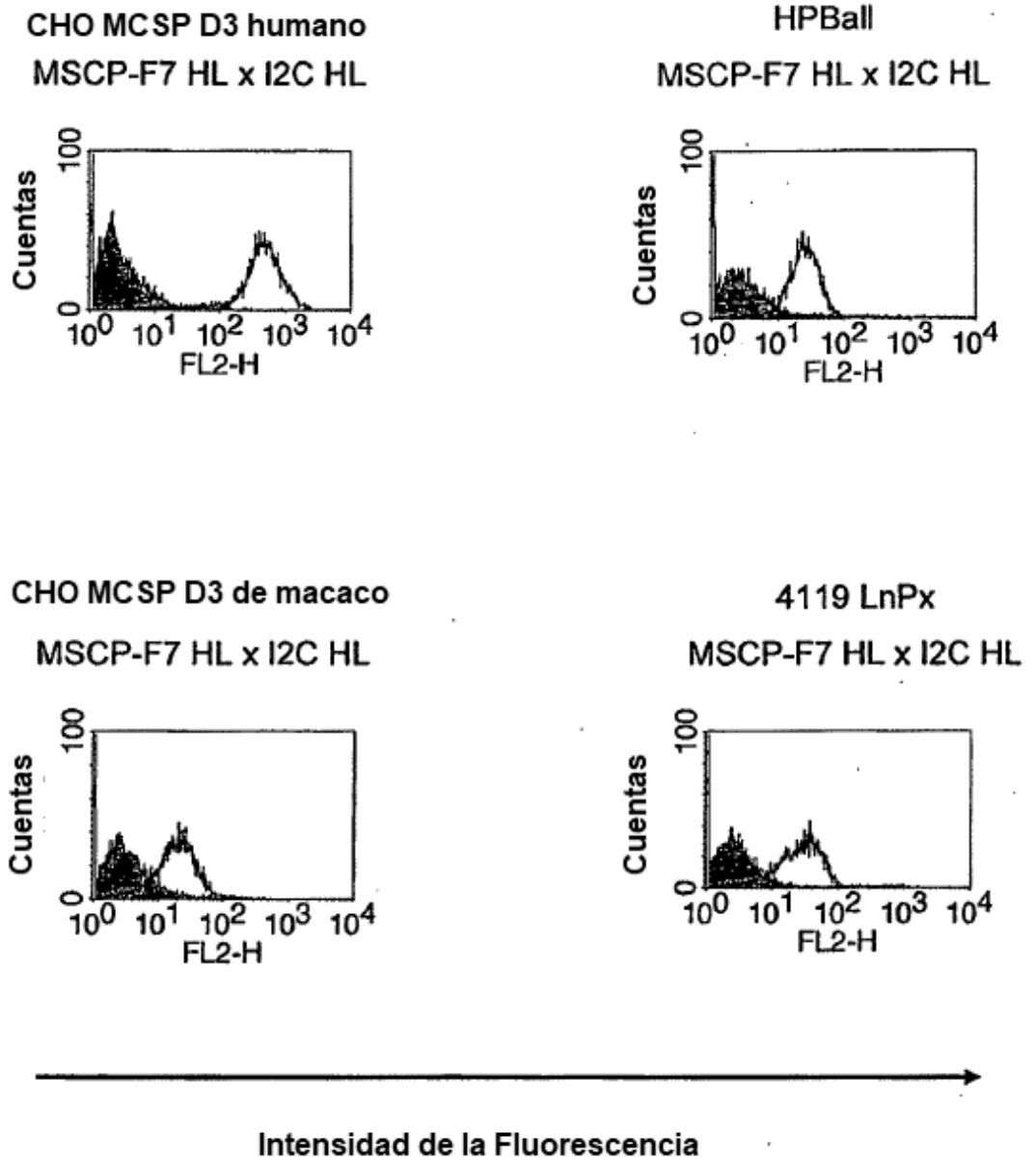
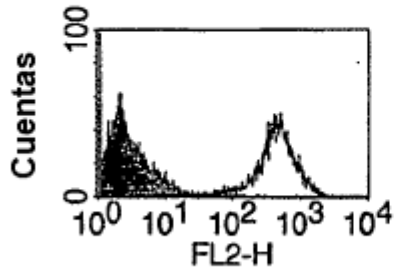
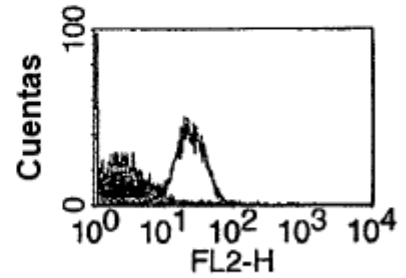


Figura 58g

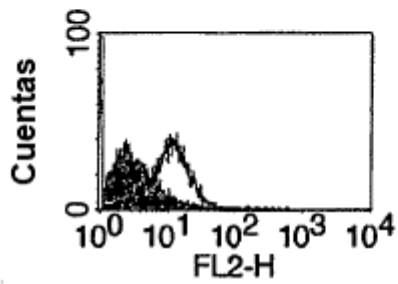
CHO MCSP D3 humano
MSCP-F8 HL x I2C HL



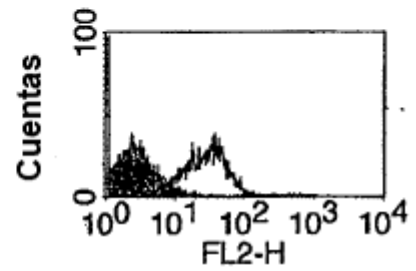
HPBall
MSCP-F8 HL x I2C HL



CHO MCSP D3 de macaco
MSCP-F8 HL x I2C HL



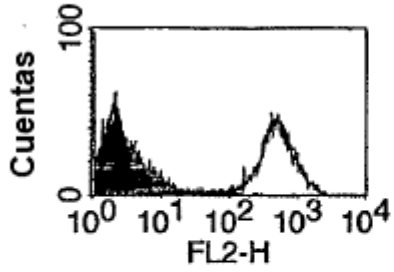
4119 LnPx
MSCP-F8 HL x I2C HL



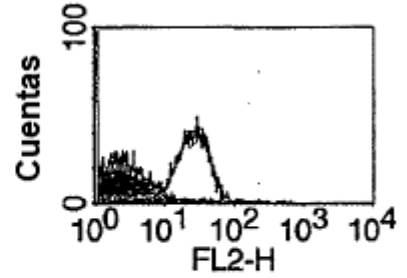
Intensidad de la Fluorescencia

Figura 58h

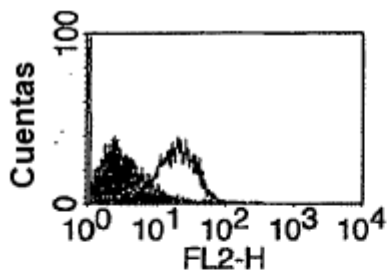
CHO MCSP D3 humano
MSCP-G5 HL x I2C HL



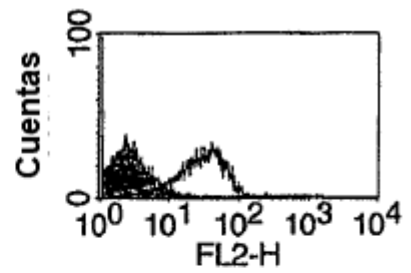
HPBall
MSCP-G5 HL x I2C HL



CHO MCSP D3 de macaco
MSCP-G5 HL x I2C HL



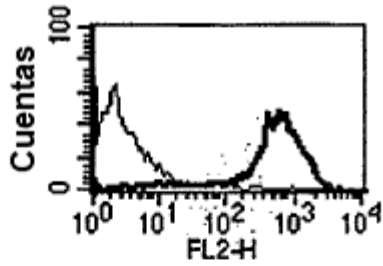
4119 LnPx
MSCP-G5 HL x I2C HL



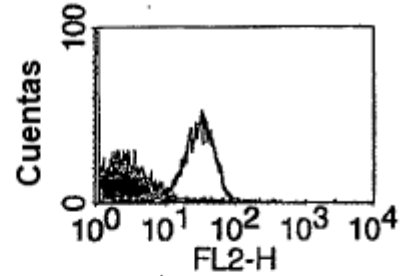
Intensidad de la Fluorescencia

Figura 58i

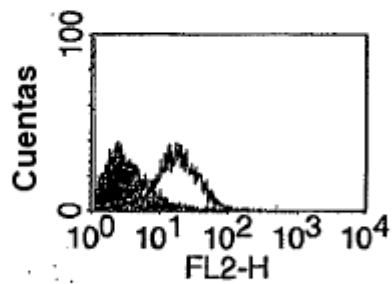
CHO MCSP D3 humano
MSCP-G8 HL x I2C HL



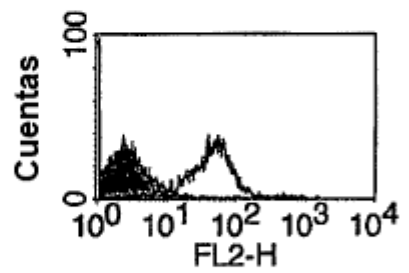
HPBall
MSCP-G8 HL x I2C HL



CHO MCSP D3 de macaco
MSCP-G8 HL x I2C HL



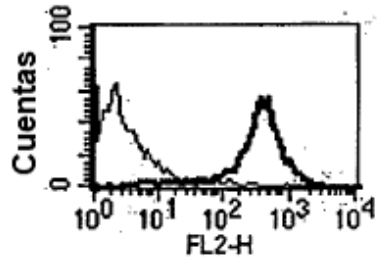
4119 LnPx
MSCP-G8 HL x I2C HL



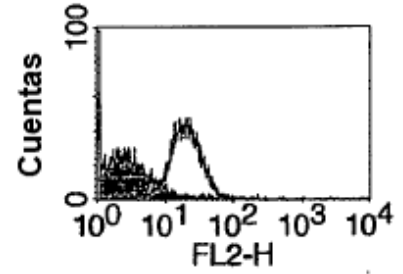
—————→
Intensidad de la Fluorescencia

Figura 58j

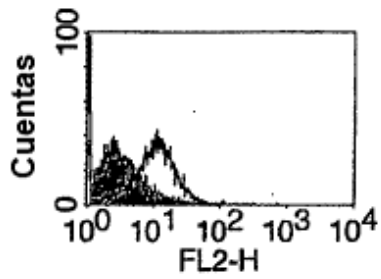
CHO MCSP D3 humano
MSCP-B7 HL x I2C HL



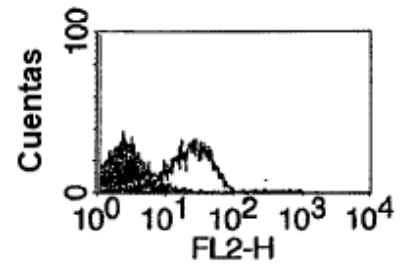
HPBall
MSCP-B7 HL x I2C HL



CHO MCSP D3 de macaco
MSCP-B7 HL x I2C HL



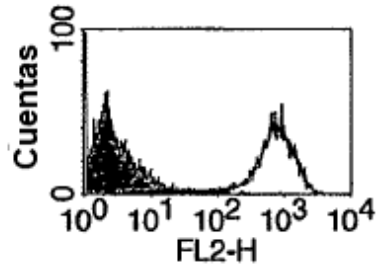
4119 LnPx
MSCP-B7 HL x I2C HL



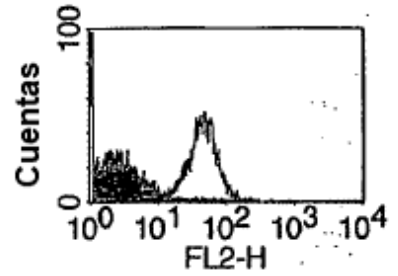
Intensidad de la Fluorescencia

Figura 58k

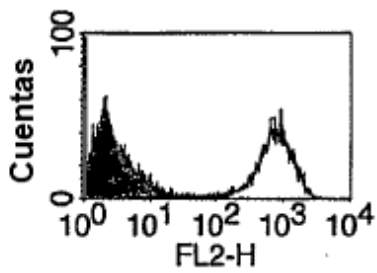
CHO MCSP D3 humano
MSCP-G10 HL x I2C HL



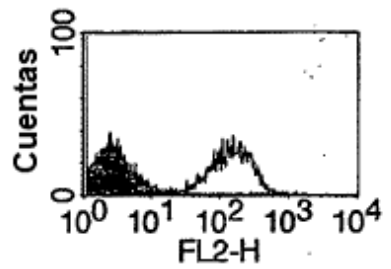
HPBall
MSCP-G10 HL x I2C HL



CHO MCSP D3 humano
MSCP-G10 HL x I2C HL



4119 LnPx
MSCP-G10 HL x I2C HL



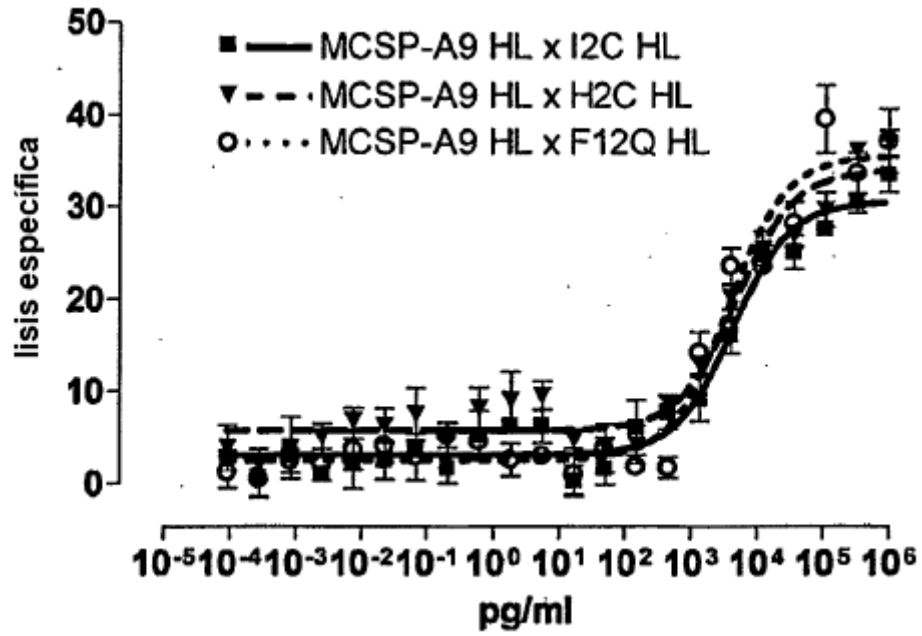
—————→
Intensidad de la Fluorescencia

Figura 58I

Células efectoras: PBMC humanas deplecionadas de CD4/CD56 estimuladas

Células diana: CHO transfectadas con MCSP D3 humano

Relación E:D: 10:1



Células efectoras: 4119 LnPx

Células diana: CHO transfectadas con MCSP D3 de macaco

Relación E:D: 10:1

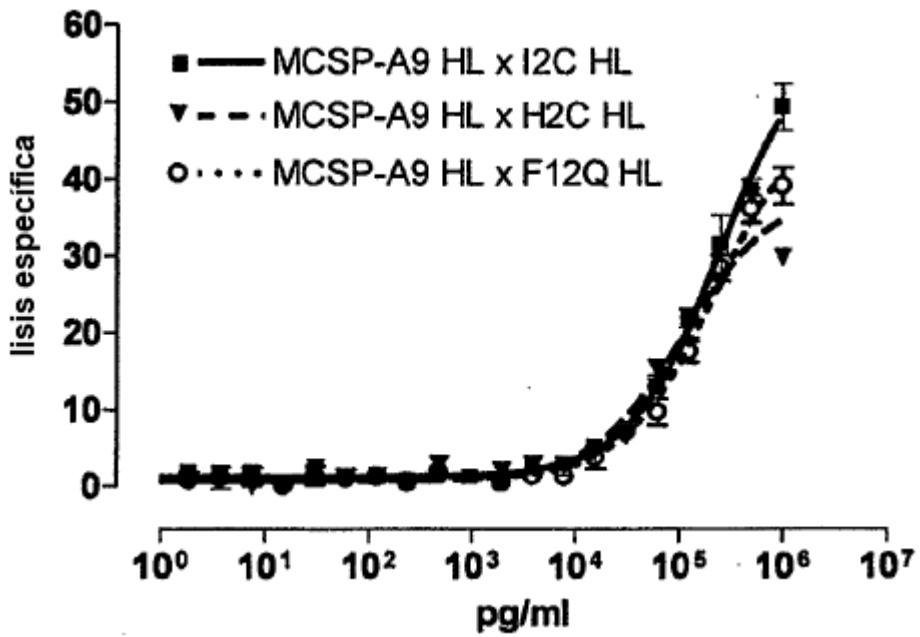
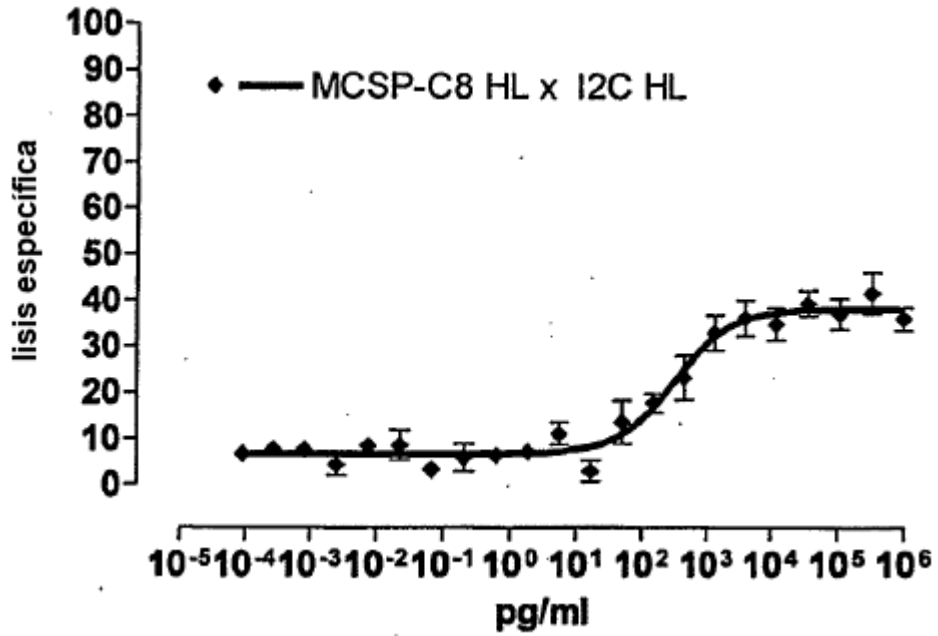


Figura 59a

Células efectoras: PBMC humanas deplecionadas de CD4/CD56 estimuladas

Células diana: CHO transfectadas con MCSP D3 humano

Relación E:D: 10:1



Células efectoras: 4119 LnPx

Células diana: CHO transfectadas con MCSP D3 de macaco

Relación E:D: 10:1

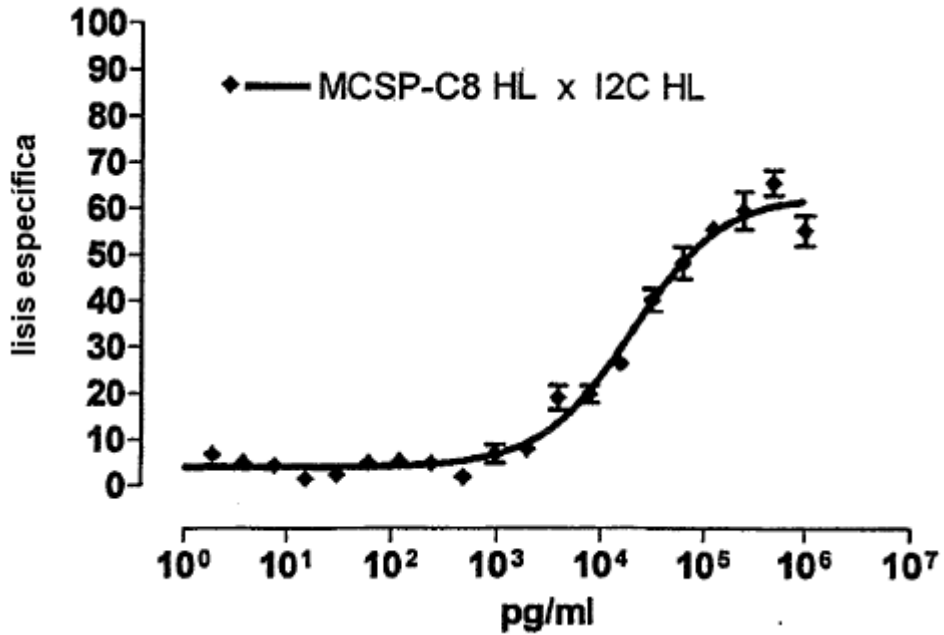
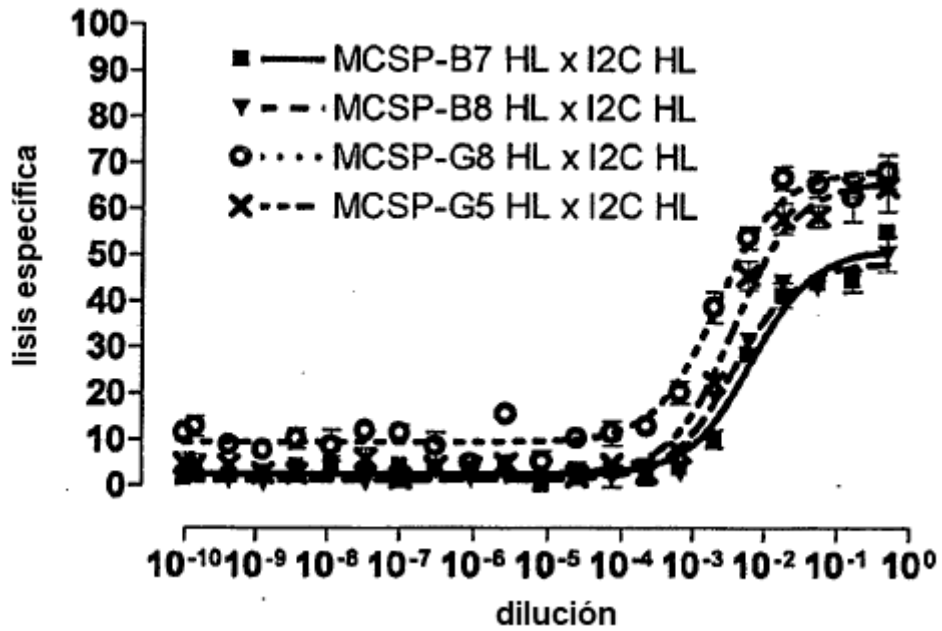


Figura 59b

Células efectoras: PBMC humanas deplecionadas de CD4/CD56 estimuladas

Células diana: CHO transfectadas con MCSP D3 humano

Relación E:D: 10:1



Células efectoras: 4119 LnPx

Células diana: CHO transfectadas con MCSP D3 de macaco

Relación E:D: 10:1

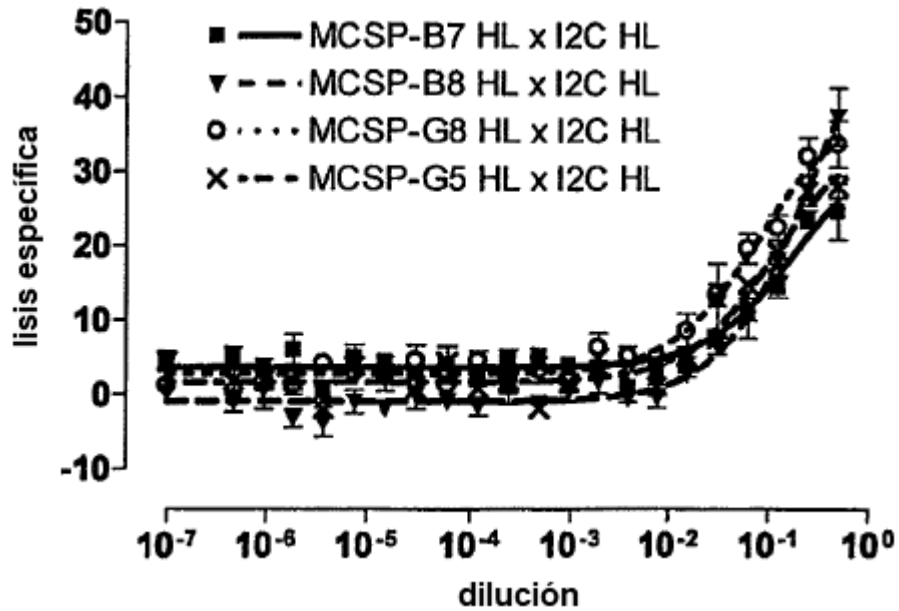
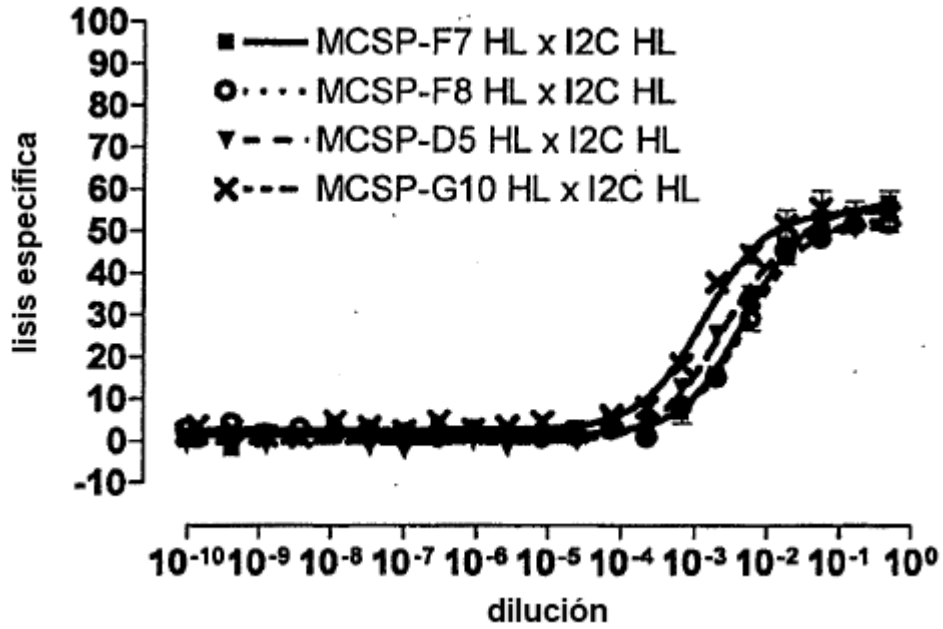


Figura 59c

Células efectoras: PBMC humanas deplecionadas de CD4/CD56 estimuladas

Células diana: CHO transfectadas con MCSP D3 humano

Relación E:D: 10:1



Células efectoras: 4119 LnPx

Células diana: CHO transfectadas con MCSP D3 de macaco

Relación E:D: 10:1

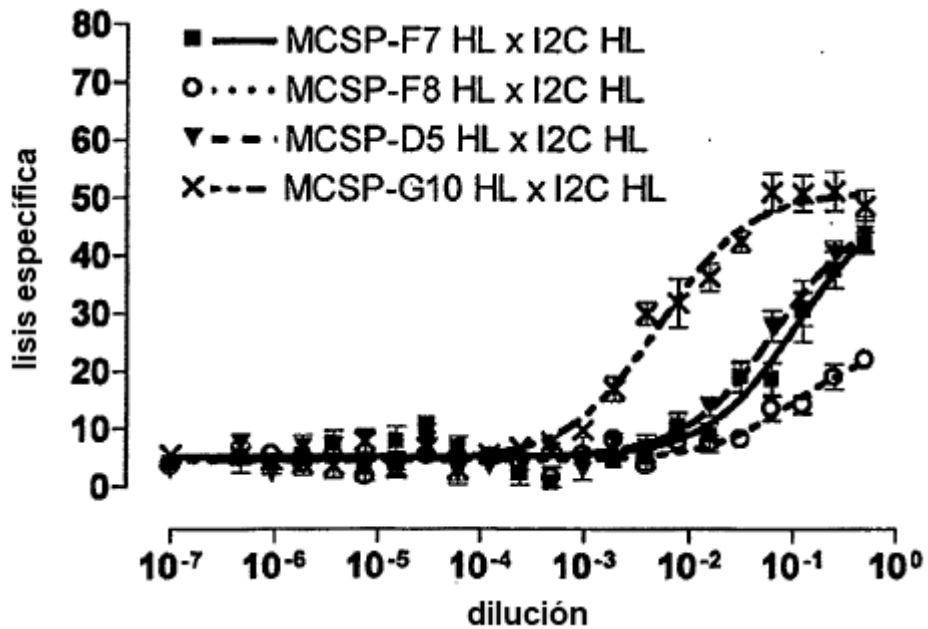
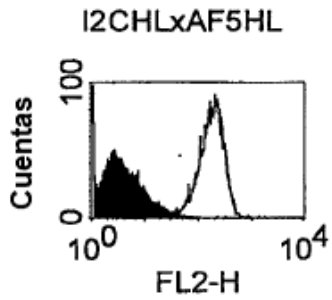
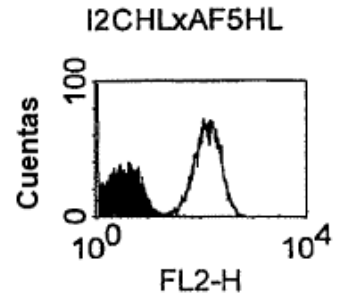


Figura 59d

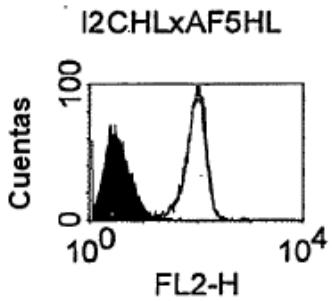
CHO transfectadas con CD33 humano



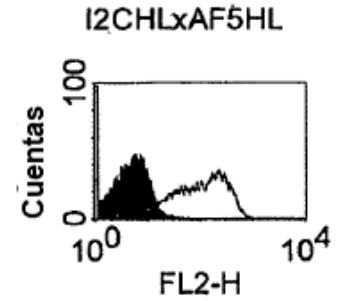
HPB-ALL



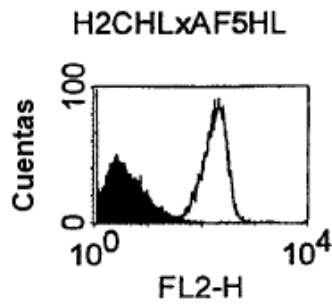
CHO transfectadas con CD33 de macaco



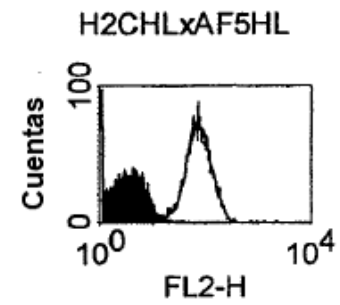
PBMC de macaco



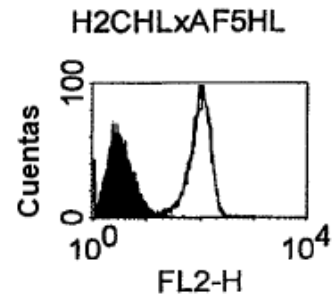
CHO transfectadas con CD33 humano



HPB-ALL



CHO transfectadas con CD33 de macaco



PBMC de macaco

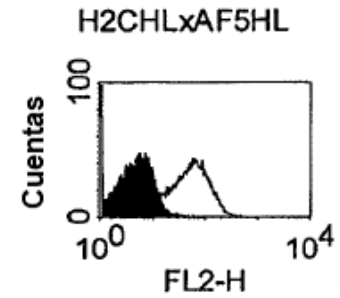
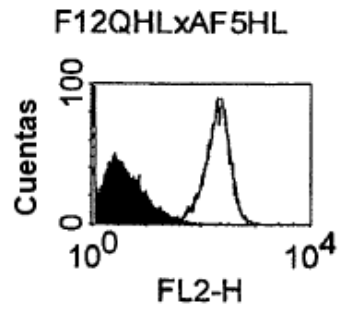
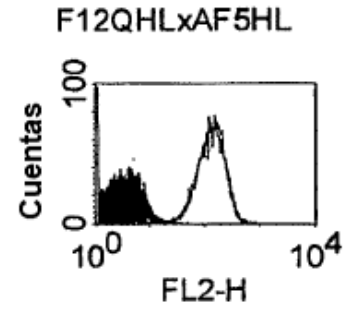


Figura 60a

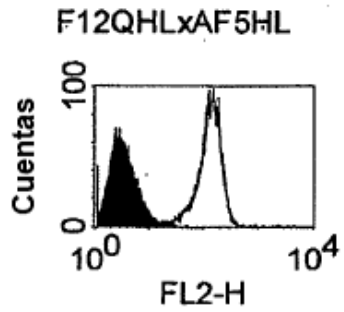
CHO transfectadas con CD33 humano



HPB-ALL



CHO transfectadas con CD33 de macaco



PBMC de macaco

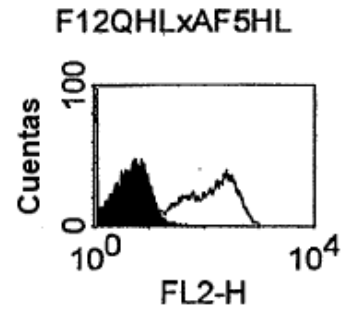
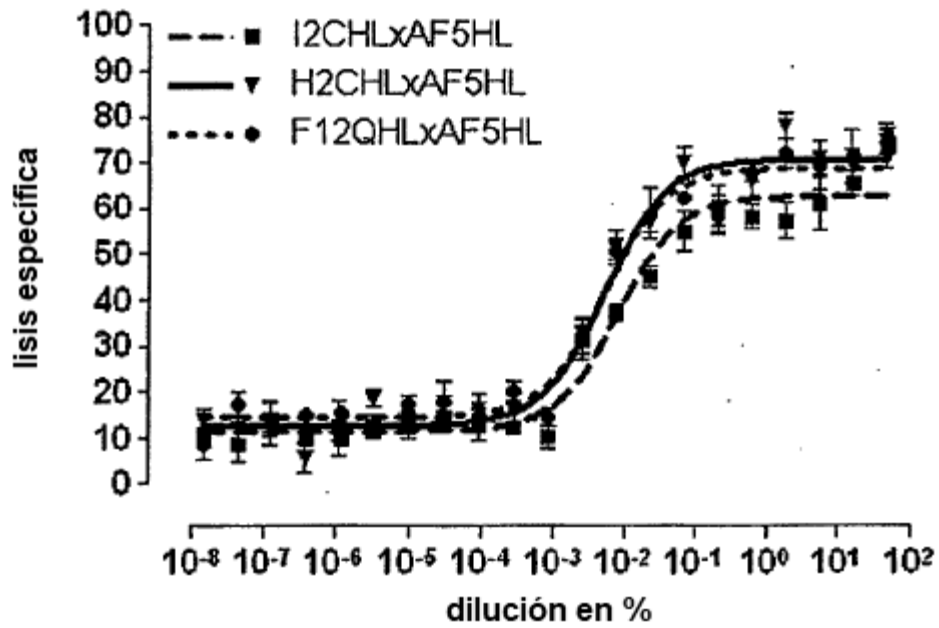


Figura 60b

Células efectoras: PBMC humanas deplecionadas de CD4/CD56 estimuladas

Células diana: CHO transfectadas con CD33 humano



Células efectoras: 4119 LnPx de macaco

Células diana: CHO transfectadas con CD33 de macaco

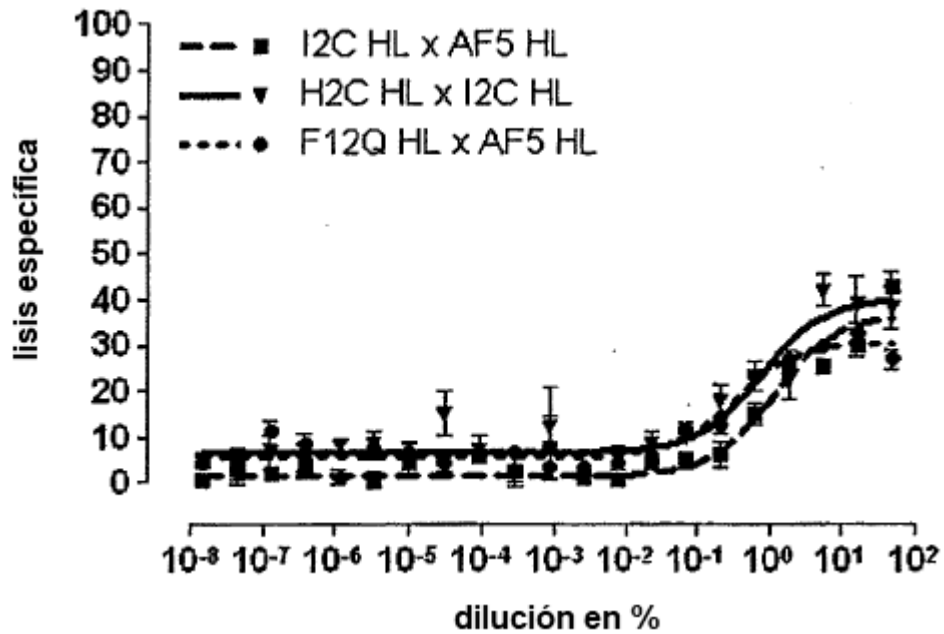


Figura 61

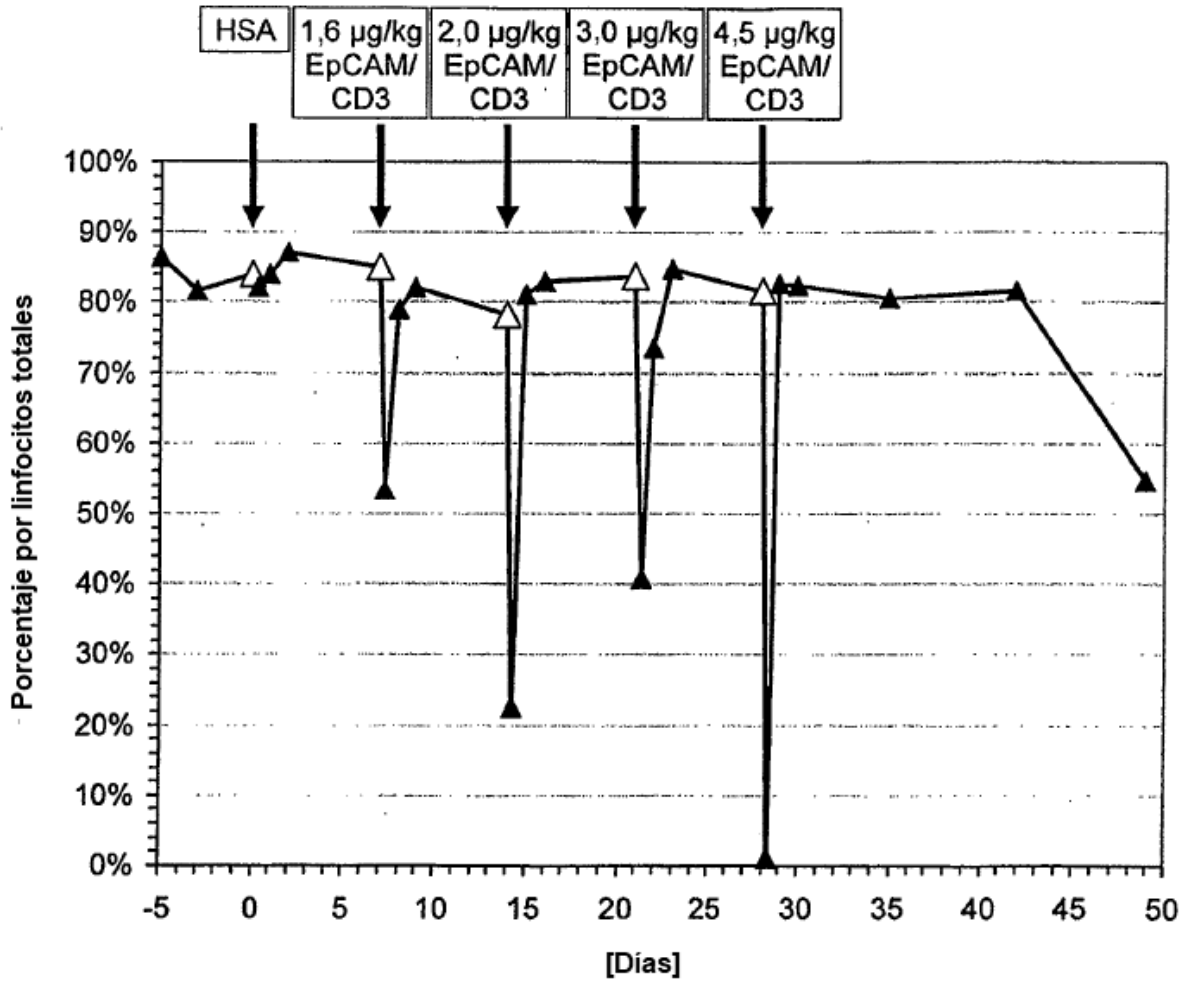


Figura 62

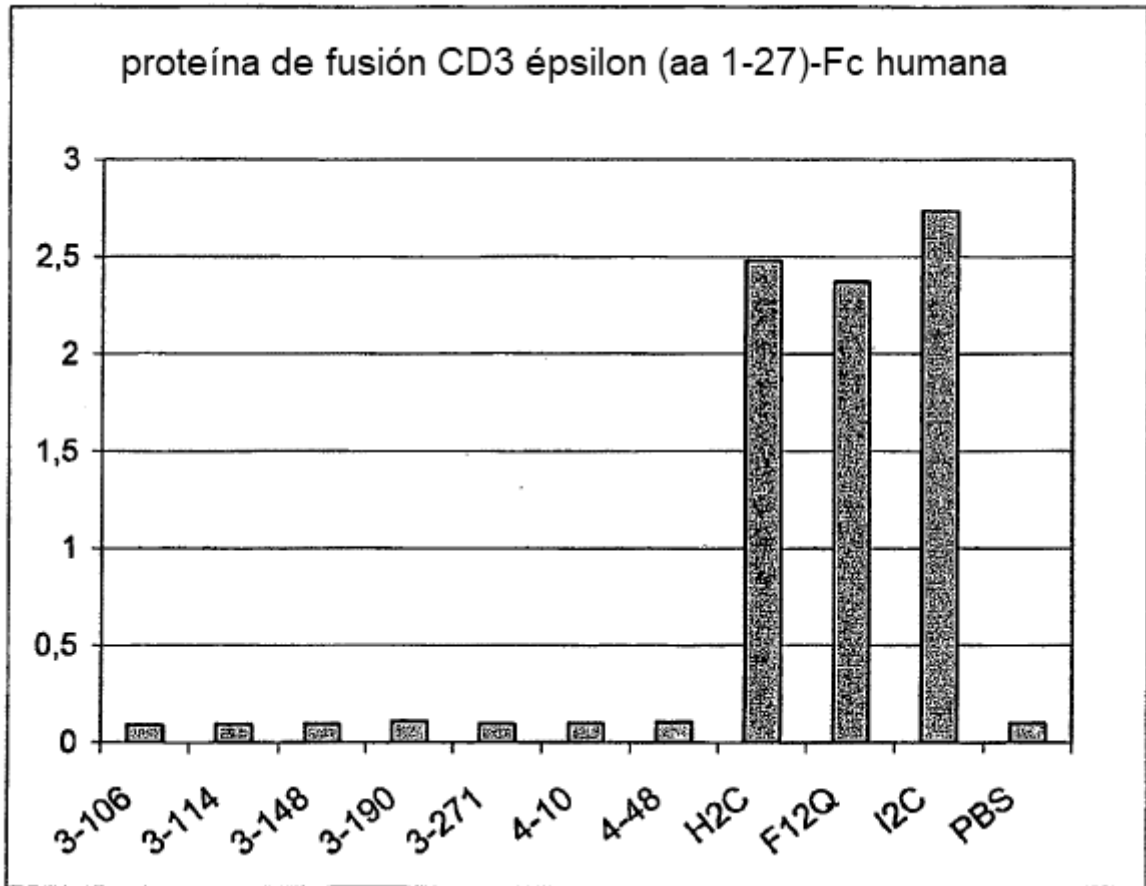


Figura 63

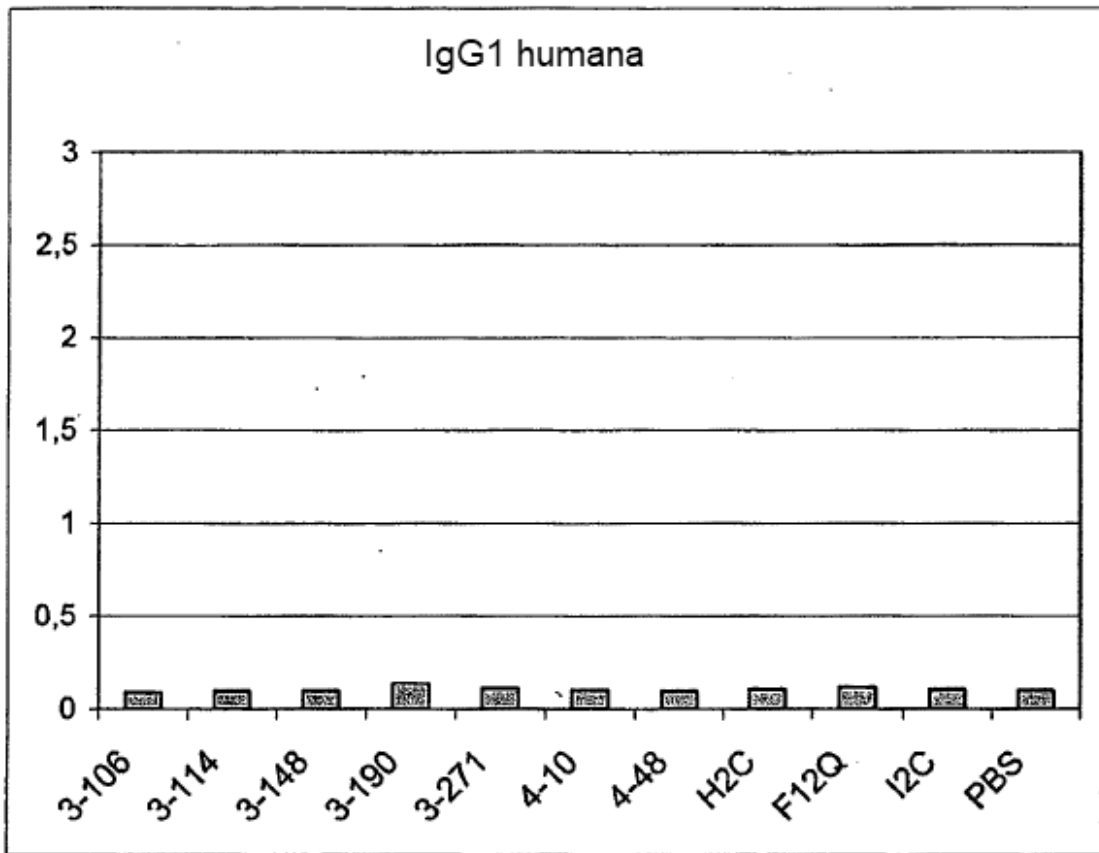


Figura 64

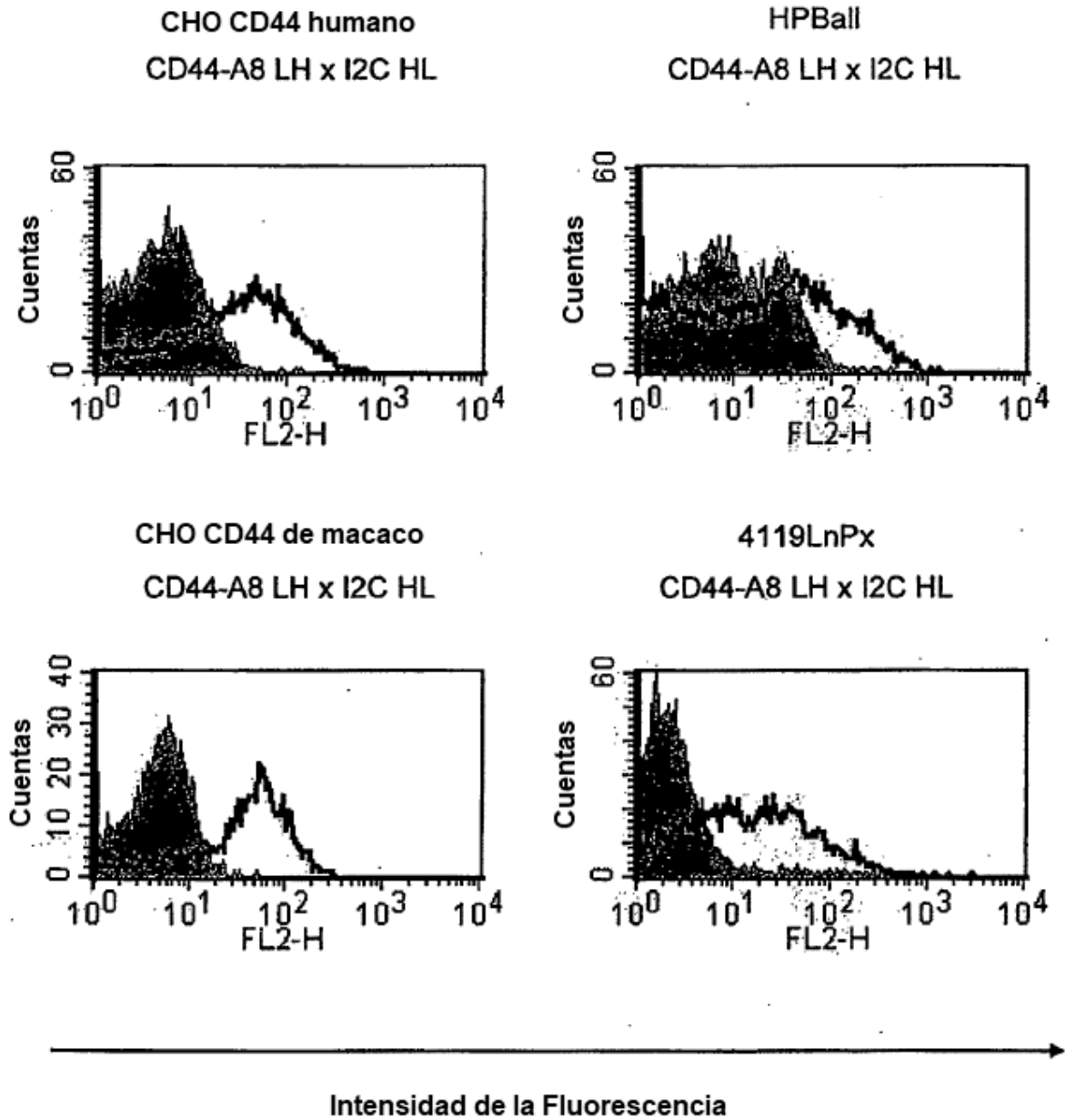


Figura 65a

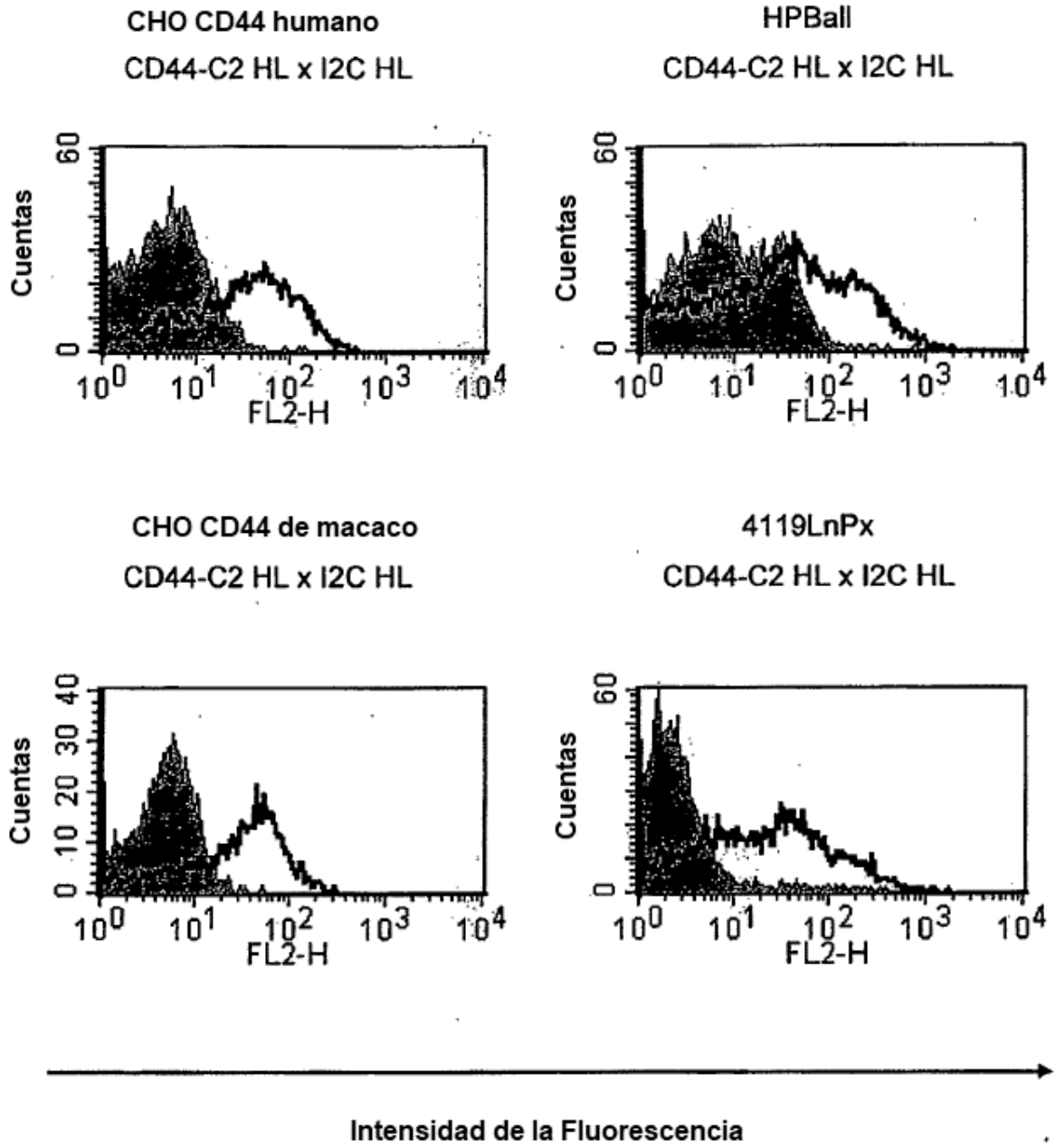


Figura 65b

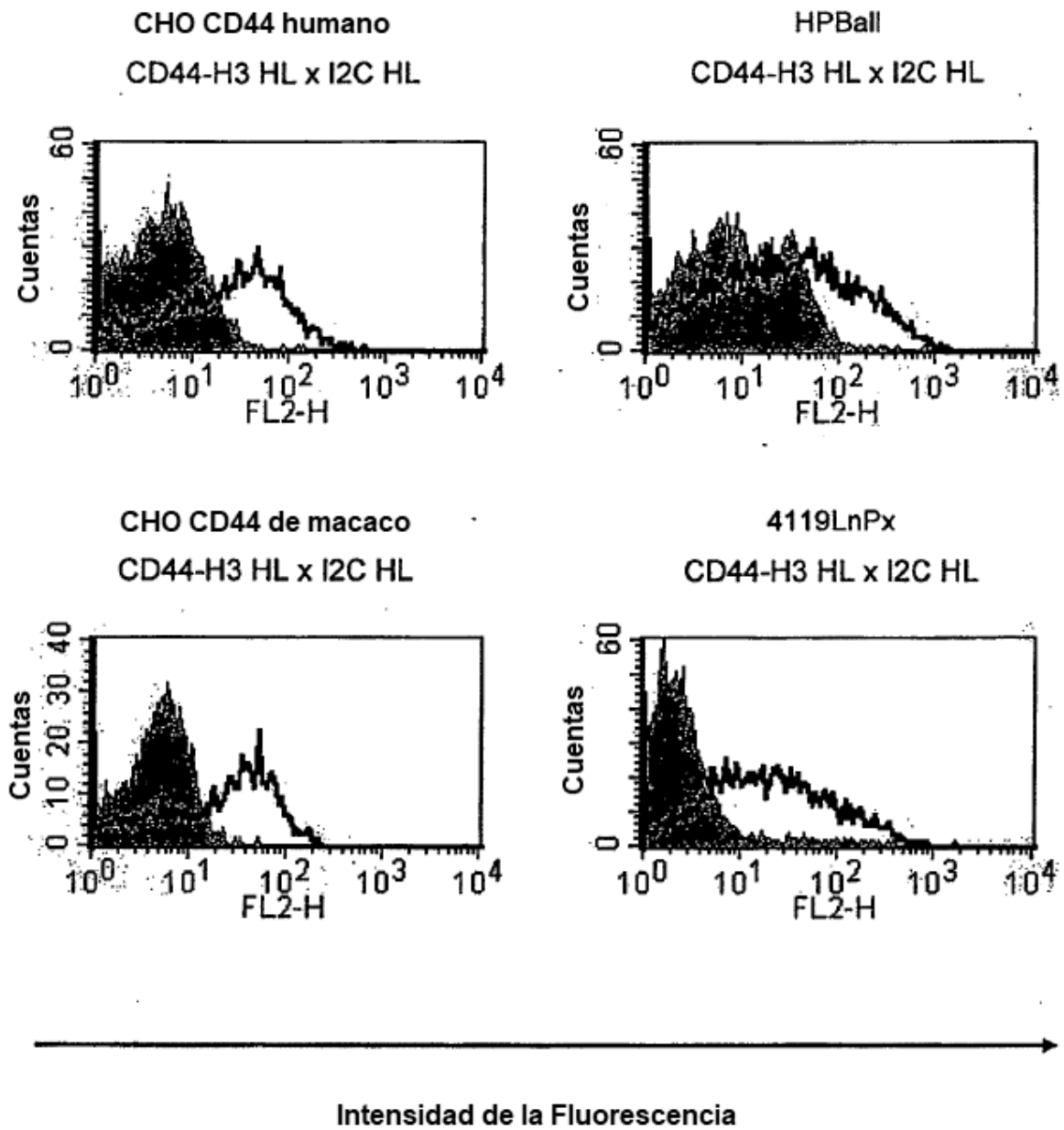


Figura 65c

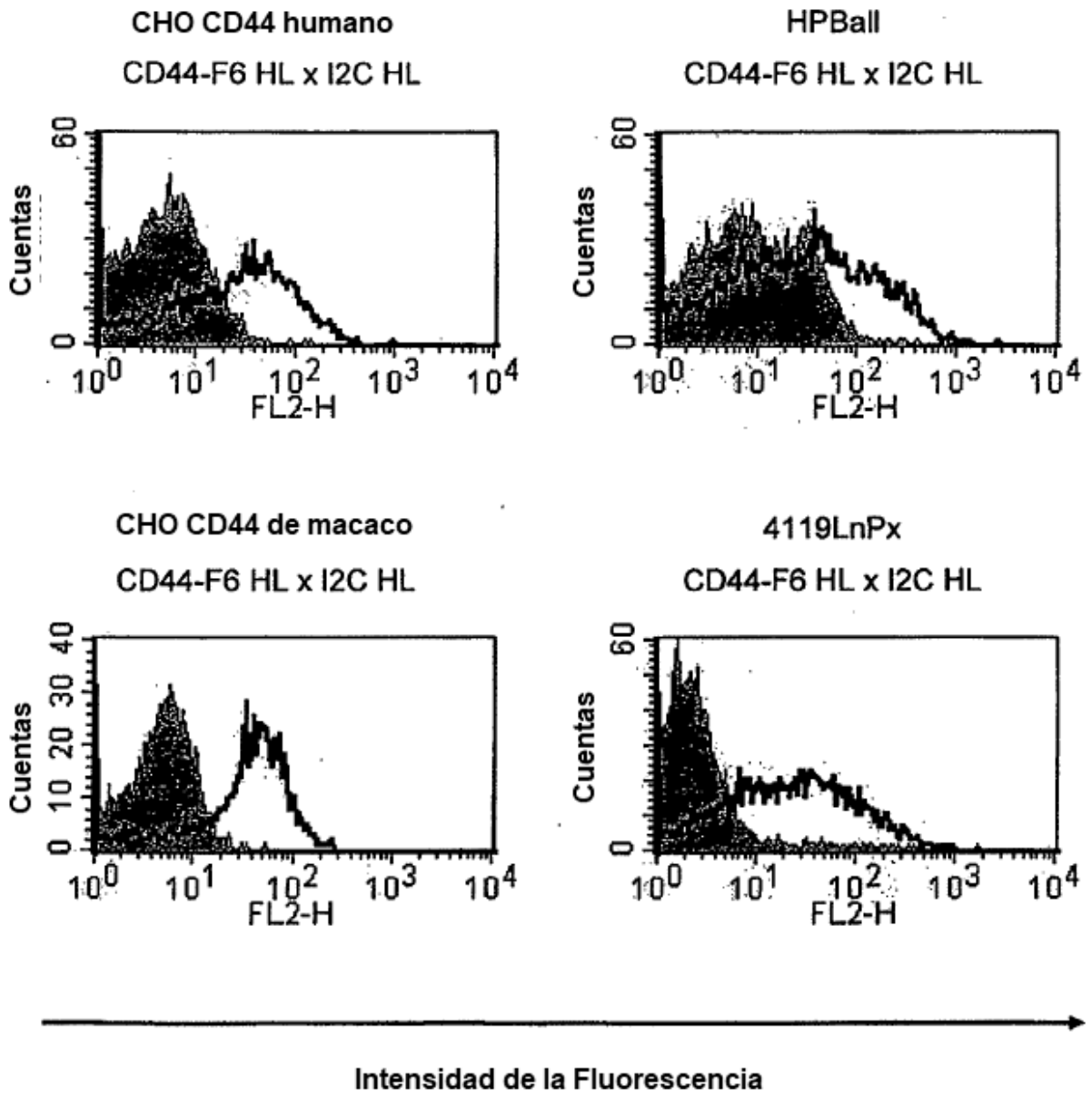


Figura 65d

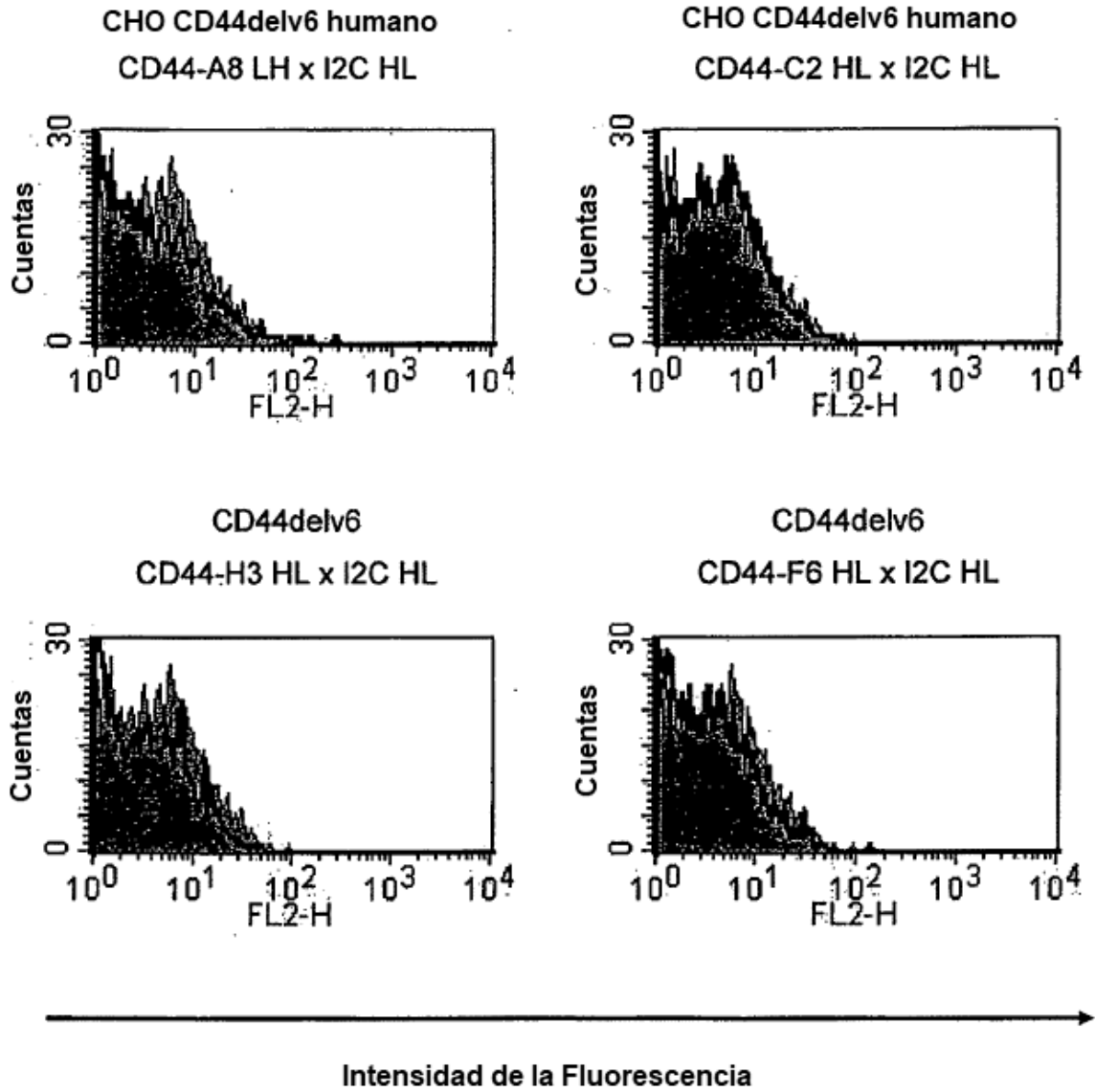


Figura 65e

Células efectoras: PBMC humanas deplecionadas de CD4/CD56 estimuladas

Células diana: CHO transfectadas con CD44 humano

Relación E:D: 10:1

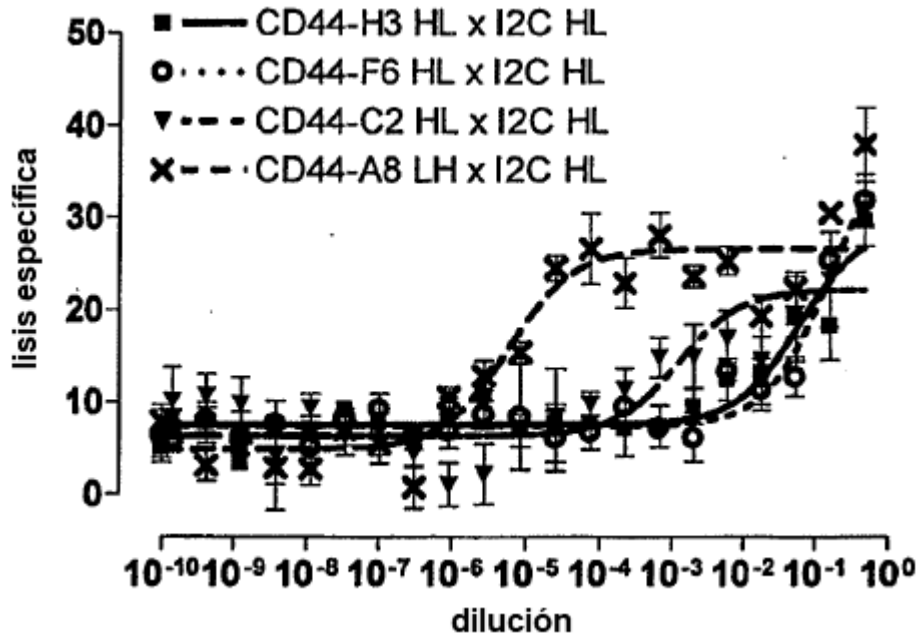
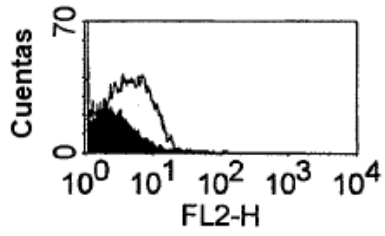


Figura 66

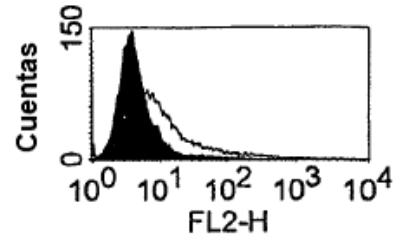
CHO transfectadas con E2 de VHC 1a

HC1LHxI2CHL



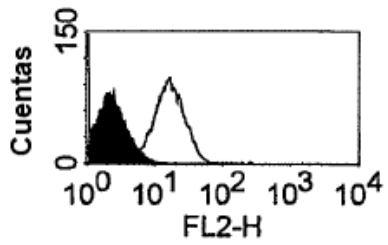
CHO transfectadas con E2 de VHC 1b

HC1LHxI2CHL



HPB-ALL

HC1LHxI2CHL



4119LnPx

HC1LHxI2CHL

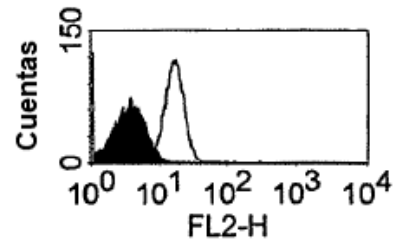
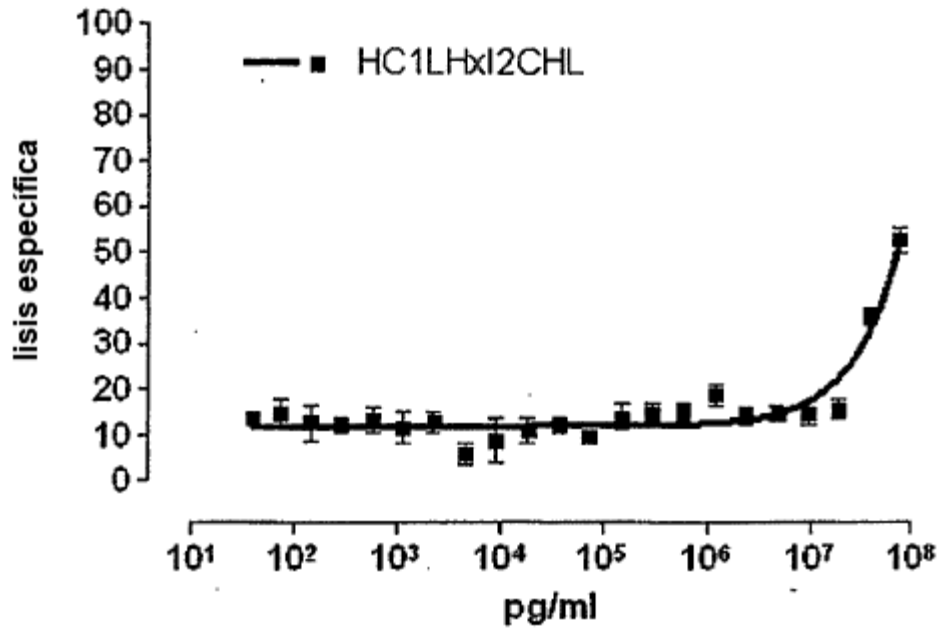


Figura 67

Células efectoras: PBMC humanas deplecionadas de CD4/CD56 estimuladas

Células diana: CHO transfectadas con E2 de VHC 1b



Células efectoras: PBMC humanas deplecionadas de CD4/CD56 estimuladas

Células diana: CHO transfectadas con E2 de VHC 1b

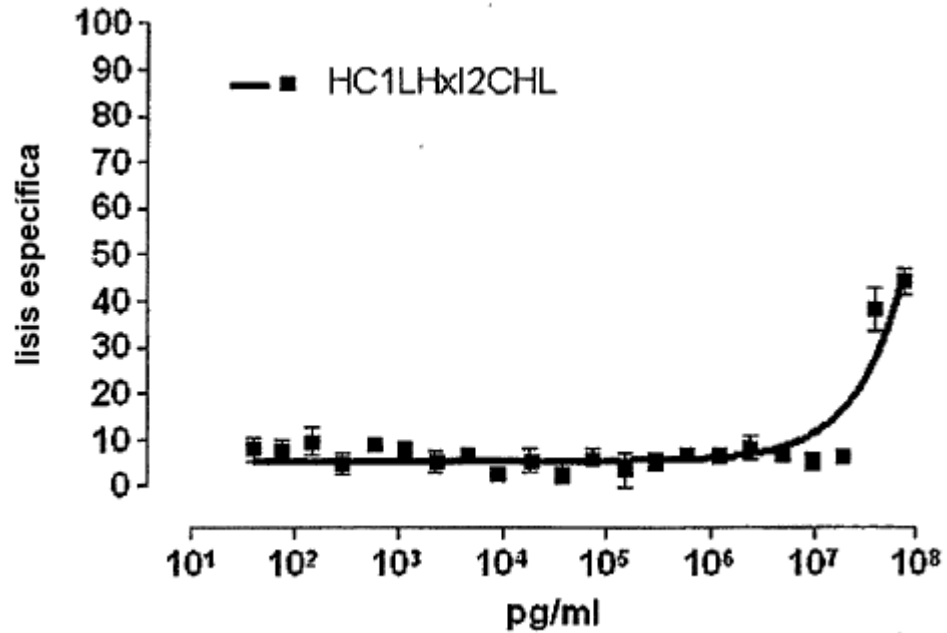


Figura 68