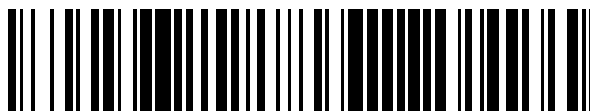


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 711 377**

51 Int. Cl.:

C07K 16/46 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.02.2011** **E 11156113 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2018** **EP 2371866**

54 Título: **Molécula Fv de unión a antígenos multivalente**

30 Prioridad:

25.02.2010 US 308205 P
25.02.2010 EP 10154751

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
03.05.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

LITTLE, MELVYN y
LE GALL, FABRICE

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones:

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

ES 2 711 377 T3

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

DESCRIPCIÓN

Molécula Fv de unión a antígenos multivalente

La invención se refiere a un nuevos diacuerpos Fv en tándem y usos de los mismos.

Antecedentes de la invención

- 5 Se han diseñado diversos formatos de fragmentos de anticuerpos recombinantes multivalentes como alternativas a anticuerpos derivados de cuádrimas.

El documento US 7.129.330, Kipriyanov y col. J. Mol. Biol. (1999) 293, 41-56 y Kipriyanov Meth. Mol. Biol. (2009) 562, 177-193 describe la construcción y producción de un formato particular de fragmentos de anticuerpos multivalentes que se denominan "diacuerpos en tándem" (TandAb®), puesto que su diseño se basa en un emparejamiento intramolecular de dominios variables V_H y V_L de dos polipéptidos distintos tal como se describe para los diacuerpos (Holliger y col., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448). Los anticuerpos descritos son biespecíficos de CD19 y CD3. En contraste a los tándems de scFv-scFv (scFv)₂ bivalentes los diacuerpos en tándem son tetravalentes, puesto que tienen cuatro sitios de unión a antígenos. Se describen polipéptidos con el orden de dominio $V_{HA}-V_{LB}-V_{HB}-V_{LA}$ desde el extremo N terminal al extremo C terminal de los polipéptidos que forman los diacuerpos en tándem. Los órdenes de los dominios variables y los péptidos de enlace entre ellos se diseñaron de modo que cada dominio se socia con un dominio complementario y otra molécula idéntica que forma, de este modo, los diacuerpos en tándem tetravalentes dimerizados. Los diacuerpos en tándem están desprovistos de dominios constantes de inmunoglobulina. Se informó que los diacuerpos en tándem tienen ventajas tales como alta afinidad, una avidéz superior, tasas de aclaramiento inferiores y muestran una eficacia *in vitro* e *in vivo* favorable.

- 20 Le Gall y col. Protein Engineering (2004) 17(4):357-366 desvela el efecto de secuencias de enlace entre los dominios variables de anticuerpos en la formación, estabilidad y actividad biológica de diacuerpos en tándem con el orden de dominio $V_{HA}-V_{LB}-V_{HB}-V_{LA}$ desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal.

Se conocen varios diacuerpos en tándem adicionales que comprenden especificidades de anticuerpo tales como, por ejemplo, anti-CD16, anti-EpCAM y anti-CD30. En todos los casos, sin embargo, el orden de los cuatro dominios junto con las cadenas de polipéptidos del diacuerpo en tándem desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal fue siempre $V_{HA}-V_{LB}-V_{HB}-V_{LA}$, en el que V_H y V_L representan los dominios de variable de cadena pesada y cadena ligera de anticuerpo de anticuerpos con especificidades para los antígenos A y B, respectivamente.

- 25 Tales diacuerpos en tándem biespecíficos pueden crear un puente entre una célula tumoral (por ejemplo, célula B-CLL) y una célula efectora de un sistema inmunitario humano (célula NK, linfocitos T, monocitos, macrófagos o granulocitos) permitiendo, de este modo, la exterminación de la célula tumoral. La estrecha unión de la célula tumoral y la célula citotóxica induce la destrucción de la célula tumoral. Mientras que tales diacuerpos en tándem han demostrado ser favorables para aplicaciones terapéuticas, por ejemplo, para conceptos terapéuticos para el tratamiento de tumores, permanece la necesidad de moléculas de unión a antígenos mejoradas.

Sumario de la invención

- 35 En un aspecto, la presente invención proporciona una molécula de unión a antígenos dimérica que comprende una primera y una segunda cadena de polipéptidos, cada una de la primera y la segunda cadenas de polipéptidos comprendiendo (a) un primer dominio V_{LA} que es un dominio variable de cadena ligera específico para un primer antígeno A; (b) un segundo dominio V_{HB} que es un dominio variable de cadena pesada específico para un segundo antígeno B; (c) un tercer dominio V_{LB} que es un dominio variable de cadena ligera específico para el segundo antígeno B; y (d) un cuarto dominio V_{HA} que es un dominio variable de cadena pesada específico para el primer antígeno A, en el que dichos dominios se disponen en cada primera y segunda cadenas de polipéptidos en el orden $V_{LA}-V_{HB}-V_{LB}-V_{HA}$ desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal de dichas cadenas de polipéptidos y el primer dominio V_{LA} de la primera cadena de polipéptidos está asociada con el cuarto dominio V_{HA} de la segunda cadena de polipéptidos para formar un sitio de unión a antígenos para el primer antígeno A; y el segundo dominio V_{HB} de la primera cadena de polipéptidos está asociada con el tercer dominio V_{LB} de la segunda cadena de polipéptidos para formar un sitio de unión a antígenos para el segundo antígeno B; y el tercer dominio V_{LB} de la primera cadena de polipéptidos está asociada con el segundo dominio V_{HB} de la segunda cadena de polipéptidos para formar un sitio de unión a antígenos para el segundo antígeno B; y el cuarto dominio V_{HA} de la primera cadena de polipéptidos está asociada con el primer dominio V_{LA} de la segunda cadena de polipéptidos para formar un sitio de unión a antígenos para el primer antígeno A.

- La molécula de unión a antígenos tal como se describe en el presente documento es un homodímero y la primera y la segunda cadenas de polipéptidos tiene la misma secuencia de aminoácidos. En algunas realizaciones, la primera y la segunda cadenas de polipéptidos no están covalentemente asociadas. La molécula de unión a antígenos es tetravalente. La molécula de unión a antígenos es biespecífica. En algunas realizaciones, los dominios son dominios humanos o dominios humanizados. En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígenos comprende al menos una unidad funcional adicional. La molécula de unión a antígenos es específica de CD3 y específico de una célula tumoral.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica una cadena de polipéptidos de la molécula de unión a antígenos dimérica tal como se describe en el presente documento. En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende la molécula de unión a antígenos tal como se desvela en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 5 En otro aspecto más, la presente invención proporciona un uso médico de la molécula de unión a antígenos como un medicamento para el tratamiento de cáncer.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 ilustra la organización genética de una construcción que codifica una molécula de antígeno de acuerdo con la invención, en la que V_LA representa un dominio de inmunoglobulina variable de cadena ligera específico para un antígeno A, V_HB representa un dominio de inmunoglobulina variable de cadena pesada específico para un antígeno B, V_LB representa un dominio de inmunoglobulina variable de cadena ligera específico para el antígeno B, V_HA representa un dominio de inmunoglobulina variable de cadena pesada específico para el antígeno A, L1 un conector peptídico o un enlace peptídico que conecta V_LA y V_HB, L2 un conector peptídico o un enlace peptídico que conecta V_HB y V_LB, y L3 un enlazador peptídico o un enlace de péptido que conecta V_LB y V_HA.

La Fig. 2 ilustra la formación de una molécula de unión a antígenos dimérica de acuerdo con la invención a partir de cadena polipeptídicas monoméricas no funcionales (A) mediante emparejamiento intramolecular de dominios variables de una primera cadena de polipéptidos 1 y una segunda cadena de polipéptidos 2 entre sí (B) a una molécula de unión a antígenos funcional de acuerdo con las invenciones en el formado de un diacuerpo en tándem, en el que "1" representa la primera cadena de polipéptidos, "2" representa la segunda cadena de polipéptidos, V_LA representa un dominio de inmunoglobulina variable de cadena ligera específico para un antígeno A, V_HB representa un dominio de inmunoglobulina variable de cadena pesada específico para un antígeno B, V_LB representa un dominio de inmunoglobulina variable de cadena ligera específico para el antígeno B, V_HA representa un dominio de inmunoglobulina variable de cadena pesada específico para el antígeno A, L1 un conector peptídico o un enlace peptídico que conecta V_LA y V_HB, L2 un conector peptídico o un enlace peptídico que conecta V_HB y V_LB, y L3 un enlazador peptídico o un enlace de péptido que conecta V_LB y V_HA.

La Fig. 3 muestra una comparación de diacuerpos en tándem de CD19xCD3 en un ensayo de citotoxicidad. Opción 0 = anticuerpo A1 con el orden de dominio de V_HA-V_LB-V_HB-V_LA. Opción 2 = anticuerpo B con el orden de dominio de V_LA-V_HB-V_LB-V_HA de acuerdo con la invención. Se incubaron células Raji marcadas con calceína 1x10⁴ con CMSP 5x10⁵ en presencia de concentraciones en aumento de los diacuerpos en tándem de CD19xCD3 indicados. Se cultivaron las CMSP durante la noche en presencia de 25 U/ml de IL-2 humana antes de que se usaran como células efectoras en el ensayo. Después de 4 h de incubación se midió la calceína fluorescente en el medio de cultivo celular liberado a partir de células diana apoptóticas a 520 nm y se calculó el % de lisis específico. Los valores EC₅₀ se analizaron mediante regresión no lineal usando el software GraphPad.

Se trazaron desviaciones de mediana y estándar de los duplicados. La Fig. 4 muestra una comparación de diacuerpos en tándem de CD19xCD3 en un ensayo de citotoxicidad. Opción 0 = anticuerpo A2 con el orden de dominio de V_HA-V_LB-V_HB-V_LA. Opción 2 = anticuerpo C con el orden de dominio de V_LA-V_HB-V_LB-V_HA de acuerdo con la invención. Se incubaron células Raji marcadas con calceína 1x10⁴ con CMSP recién aisladas 5x10⁵ en presencia de concentraciones en aumento de los diacuerpos en tándem de CD19xCD3 indicados. Después de 4 h de incubación se midió la calceína fluorescente en el medio de cultivo celular liberado a partir de células diana apoptóticas a 520 nm y se calculó el % de lisis específico. Los valores EC₅₀ se analizaron mediante regresión no lineal usando el software GraphPad. Se trazaron desviaciones de mediana y estándar de los duplicados.

La Fig. 5 muestra el mapa de vectores con los sitios de restricción de pCDNA5FRT que codifica el anticuerpo B. V_H y V_L: dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras.

Descripción detallada de la invención

En un aspecto, la presente invención proporciona una molécula de unión a antígenos dimérica y tetravalente recombinante con cuatro dominios de inmunoglobulina (dos dominios variables de cadena pesada y dos dominios variables de cadena ligera) unidos entre sí en una cadena de polipéptidos y dispuestos en el orden V_LA-V_HB-V_LB-V_HA desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal de la cadena de polipéptidos. Tal molécula de unión a antígenos de la presente invención desencadena una actividad biológica potenciada, tal como, por ejemplo, una respuesta inmune potenciada.

En una realización, ilustra que una molécula de unión a antígenos biespecífica dimérica del formato de diacuerpo en tándem específico para CD3 y CD19 y que tiene cadenas de polipéptidos con el orden de dominio V_LA-V_HB-V_LB-V_HA es 60 veces más activa *in vitro*, es decir, citotóxica, que una molécula de diacuerpo en tándem correspondiente con los mismo dominios pero en el orden de dominio inverso de V_HA-V_LB-V_HB-V_LA.

Por tanto, los diacuerpos en tándem con el orden de dominio V_LA-V_HB-V_LB-V_HA desde el extremo N terminal al extremo C terminal de las cadenas de polipéptidos tienen un potencial aumentado de inmunoterapia. Una ventaja adicional de la actividad biológica potenciada es que pueden reducirse las dosificaciones terapéuticas efectivas para tales diacuerpos en tándem. Además, los efectos secundarios causados por las moléculas de unión a antígenos

administradas también pueden reducirse debido a las menores dosificaciones. Sin pretender quedar vinculados a teoría alguna, el nuevo orden de dominio permite una reticulación modificada de la molécula de unión a antígenos entre el antígeno A, es decir, CD3, y el antígeno B, es decir, antígeno específico a tumor, en comparación con los diacuerpos en tándem de la técnica y, en determinados aspectos de la invención, esto permitirá a la molécula unirse a los antígenos diana, por ejemplo, receptores, más eficazmente que las moléculas de unión a antígenos diméricas de la técnica.

Por lo tanto, puede potenciarse la actividad biológica de la molécula de unión a antígeno dimérica tal como un anticuerpo en tándem, cuando los cuatro dominios variables de cada cadena de polipéptidos que forman la molécula de unión a antígenos dimérica se disponen en el orden $V_LA-V_{HB}-V_{LB}-V_{HA}$ desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal de cada cadena de polipéptidos. La "actividad biológica" desencadenada depende de las especificidades de la molécula de unión a diana y puede comprender citotoxicidad, fagocitosis, presentación de antígenos, liberación de citoquinas, por ejemplo, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (CCDA), fagocitosis mediada por células dependiente de anticuerpos (FCDA) y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).

La presente invención proporciona una molécula de unión a antígenos dimérica que comprende una primera y una segunda cadena de polipéptidos, en la que cada una de la primera y la segunda cadenas de polipéptidos comprende un primer dominio V_LA que es un dominio variable de cadena ligera específico para un primer antígeno A, un segundo dominio V_{HB} que es un dominio variable de cadena pesada específico para un segundo antígeno B, un tercer dominio V_{LB} que es un dominio variable de cadena ligera específico para el segundo antígeno B, un cuarto dominio V_{HA} que es un dominio variable de cadena pesada específico para el primer antígeno A y dichos dominios están dispuestos en cada una de dicha primera y segunda cadenas de polipéptidos en el orden $V_{La}-V_{HB}-V_{LB}-V_{HA}$ desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal de dichas cadenas de polipéptidos.

El primer, segundo, tercer y cuarto dominios variables se disponen en una orientación que evita el emparejamiento intramolecular dentro de la misma cadena de polipéptidos y la primera cadena de polipéptidos se asocia, es decir, dimeriza, con la segunda cadena de polipéptidos de modo que el primer dominio V_LA de la primera cadena de polipéptidos está asociada con el cuarto dominio V_{HA} de la segunda cadena de polipéptidos para formar un sitio de unión a antígenos para el primer antígeno A, el segundo dominio V_{HB} de la primera cadena de polipéptidos está asociada con el tercer dominio V_{LB} de la segunda cadena de polipéptidos para formar un sitio de unión a antígenos para el segundo antígeno B, el tercer dominio V_{LB} de la primera cadena de polipéptidos está asociada con el segundo dominio V_{HB} de la segunda cadena de polipéptidos para formar un sitio de unión a antígenos para el segundo antígeno B y el cuarto dominio V_{HA} de la primera cadena de polipéptidos está asociada con el primer dominio V_LA de la segunda cadena de polipéptidos para formar un sitio de unión a antígenos para el primer antígeno A.

El término "molécula de unión a antígenos" se refiere a un derivado de inmunoglobulina con propiedades de unión a antígenos multivalente, que tiene al menos cuatro sitios de unión a antígenos. Cada sitio de unión a antígenos está formado por un dominio variable de cadena pesada V_H y un dominio variable de cadena ligera V_L del mismo antígeno, es decir, epítipo, especificidad. Preferentemente la molécula de unión a antígenos de acuerdo con la invención está desprovista de dominios constantes de inmunoglobulina o fragmentos de dominios constantes de inmunoglobulina, pero en determinados casos que se describen a continuación un dominio constante o partes del mismo pueden unirse a la molécula de unión a antígenos.

La molécula de unión a antígenos es "dimérica" cuyo término se refiere a un complejo de dos monómeros polipeptídicos. Estos dos monómeros polipeptídicos son la primera y la segunda cadenas de polipéptidos. La molécula de unión a antígenos es un "homodímero" cuyo término significa que la molécula de unión a antígeno está compuesto de monómeros polipeptídicos idénticos. En una molécula de unión a antígenos homodimérica preferente de acuerdo con la invención la primera y la segunda cadena de polipéptidos puede tener la misma secuencia de aminoácidos, es decir, la primera y la segunda cadenas de polipéptidos son idénticas y, por lo tanto, se codifican y expresan mediante el mismo único polinucleótido. Esto es diferente en el caso de los denominados diacuerpos biespecíficos, que son heterodímeros que se codifican mediante dos polinucleótidos distintos. En el anterior caso, cada una de la primera y la segunda cadena de polipéptidos contienen cuatro dominios variables, se forman cuatro sitios de unión y la molécula de unión a antígenos es tetravalente. Tales moléculas de unión a antígenos homodiméricos tetravalentes han recibido algún reconocimiento en la técnica como diacuerpos en tándem.

Preferentemente, en la molécula de unión a antígenos, la primera y la segunda cadenas de polipéptidos no están covalentemente asociadas entre sí, en particular, con la condición de que no hay enlace covalente entre la primera y la segunda cadena de polipéptidos. Sin embargo, si se desea, las dos cadenas de polipéptidos pueden estabilizarse adicionalmente mediante al menos una unión covalente, por ejemplo, mediante un puente de disulfuro entre restos de cisteína de distintas cadenas de polipéptidos.

El término "cadena de polipéptidos" se refiere a un polímero de restos de aminoácidos unidos mediante enlaces amida. La primera y la segunda cadenas de polipéptidos son, preferentemente, proteínas de fusión de cadena única que no están ramificadas. En cada una de las primera y segunda cadenas de polipéptidos los cuatro dominios se disponen de modo que el segundo dominio V_{HB} es C-terminal desde el primer dominio V_LA , el tercer dominio V_{LB} es C-terminal desde el segundo dominio V_{HB} y el cuarto dominio V_{HA} es C-terminal desde el tercer dominio V_{LB} . La

primera y la segunda cadenas de polipéptidos pueden tener restos de aminoácidos contiguo además del extremo N-terminal con respecto al primer dominio V_LA y/o C-terminal con respecto al cuarto dominio V_HA . Por ejemplo, la cadena de polipéptidos puede contener una secuencia Tag, preferentemente en el extremo C-terminal que sería útil para la purificación del polipéptido. Un ejemplo de una secuencia Tag es un His-Tag, por ejemplo, un His-Tag que consiste en seis restos His.

El primer, segundo, tercer y cuarto dominios están covalentemente conectados de modo que los dominios de la misma cadena de polipéptidos no se asocian, es decir, emparejan, entre sí. Los dominios pueden unirse de modo que el primer dominio V_LA está unido con el segundo dominio V_HB mediante un primer conector L1, el segundo dominio V_HB está unido con el tercer dominio V_LB mediante un segundo conector L2 y el tercer dominio V_LB está unido con el cuarto dominio V_HA mediante un tercer conector L3, en el que el primer conector L1 y el tercer conector L3 son distales al conector central L2 sobre cada una de la primera y segunda cadenas de polipéptidos. La longitud de cada uno de los conectores L1, L2 y L3 de modo que los dominios de la primera cadena de polipéptidos pueden asociarse con los dominios de la segunda cadena de polipéptidos para formar la molécula de unión a antígenos dimérica. La longitud de los conectores influye en la flexibilidad de la molécula de unión a antígenos. La flexibilidad deseada de la molécula de unión a antígenos depende de la densidad del antígeno diana y la accesibilidad del antígeno diana, es decir, epítomos. Conectores más largos proporcionan moléculas de unión a antígenos más flexibles con sitio de unión a antígenos más ágiles. El efecto de la longitud del conector sobre la formación de moléculas de unión a antígenos diméricas se describe, por ejemplo, en Todorovska y col., 2001 *Journal of Immunological Methods* 248:47-66; Perisic y col., (1994 *Structure* 2:1217-1226; Le Gall y col., 2004, *Protein Engineering* 17:357-366 y el documento WO 94/13804.

Los conectores L1, L2 y/o L3 son "cortos", es decir, consisten en 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 restos de aminoácidos. Tales conectores cortos favorecen la correcta dimerización de la primera con la segunda cadena de polipéptidos mediante el enlace y formación de sitios de unión a antígenos entre dominios variables de cadena ligera y dominios variables de cadena pesada o distintas cadenas de polipéptidos. En particular, el conector central L2 debe ser corto de modo que evita la formación de una unidad de unión a antígenos monocatenaria Fv (scFv) dentro de la misma cadena de polipéptidos mediante los dos dominios adyacentes V_HB y V_LB . El conector central L2 influye en la flexibilidad de la cadena de polipéptidos. Si el conector central L2 es largo y flexible (en general, que consiste en aproximadamente 12 o más restos de aminoácidos) la cadena de polipéptidos puede plegarse de cabeza a cola y formar una molécula de unión a antígenos monocatenaria conocida en la técnica como un diacuerpo monocatenario. Si el conector central L2 es corto y rígido la cadena de polipéptidos no puede plegarse de cabeza a cola y se dimeriza con otra cadena de polipéptidos. El número de restos de aminoácidos de un conector para evitar un pliegue de cabeza a cola también depende del tipo de dominios variables combinados en el polipéptido. En general, el acortamiento del conector a aproximadamente 12 o menos restos de aminoácidos evita, en general, que los dominios adyacentes de la misma cadena de polipéptidos interactúen entre sí. Por lo tanto, el conector central L2 y los conectores distales L1 y L3 deben consistir preferentemente en aproximadamente 12 o menos restos de aminoácidos para evitar el emparejamiento de dominios adyacentes de la misma cadena de polipéptidos. En realizaciones de la invención, los conectores L1, L2 y/o L3 consisten en de 4 a 10 restos de aminoácidos contiguos. Los conectores pueden consistir en distintos números de restos de aminoácidos, pero se prefiere que los conectores distales L1 y L3 tengan el mismo número de restos de aminoácidos o no difieran en longitud por más de uno o dos restos de aminoácidos. En determinado aspecto de la invención, al menos uno de los conectores L1, L2 y/o L3 consiste en nueve restos de aminoácidos. En una realización particular de la invención todos los tres conectores L1, L2 y L3 consisten en nueve restos de aminoácidos.

Con respecto a la composición de aminoácidos de los conectores, en algunas realizaciones, se seleccionan péptidos que no interfieren con la dimerización de la primera y segunda cadenas de polipéptidos. Por ejemplo, los conectores que comprenden restos de glicina y serina generalmente proporcionan flexibilidad y resistencia a la proteasa. La secuencia de aminoácidos de los conectores puede optimizarse, por ejemplo, mediante procedimientos de expresión de fagos para mejorar la unión a antígenos y rendimiento de producción de las moléculas. En realizaciones particulares de la invención, el conector puede comprender la secuencia de aminoácidos GSGSGSGS.

El primer dominio V_LA , el segundo dominio V_HB , el tercer dominio V_LB y el cuarto dominio V_HA son dominios variables de cadena ligera y cadena pesada de una inmunoglobulina. Los dominios variables comprenden los bucles hipervariables o regiones de unión de complementariedad (CDR) que contienen los restos en contacto con el antígeno y los segmentos que contribuyen al correcto pliegue y expresión de las CDR. Cada uno de los dominios variables de cadena pesada y cadena ligera comprende las respectivas tres CDR. Los dominios pueden derivar de cualquier clase de inmunoglobulina, por ejemplo, IgA, IgD, IgE y IgM o una subclase de las mismas. La inmunoglobulina puede ser de un animal, en particular de origen mamífero. Cada dominio puede ser un dominio variable de cadena pesada o ligera de inmunoglobulina completa, un mutante, fragmento o derivado de un dominio variable de origen natural o sintético, por ejemplo, un dominio recombinante que está diseñado por ingeniería genética. Un derivado es un dominio variable que difiere mediante la delección, sustitución, adición o inserción de al menos un aminoácido a partir de la secuencia de aminoácidos de un dominio variable de origen natural. Se pueden obtener dominios sintéticos, por ejemplo, recombinantes, por ejemplo, mediante procedimiento reproducibles bien conocidos a partir de anticuerpos derivados de hibridomas o bibliotecas de inmunoglobulina de expresión de fagos. Por ejemplo, se pueden usar procedimientos de expresión de fagos para obtener dominios variables de anticuerpos humanos con respecto a un antígeno cribando bibliotecas a partir de secuencias de inmunoglobulina humana. La

afinidad de los anticuerpos inicialmente seleccionados se puede aumentar adicionalmente mediante maduración por afinidad, por ejemplo, barajado de cadenas o mutagénesis aleatoria. Un experto en la técnica es familiar con los procedimientos para obtener dominios a partir de anticuerpos naturales o recombinantes (para manuales de laboratorio, véase, por ejemplo, *Antibody engineering: methods and protocols* / editado por Benny K.C. Lo; Benny K.C. II Series: *Methods in molecular biology* (Totowa, N.J.)). En general, cualquier anticuerpo conocido en la técnica se puede usar como fuente de dominios variables de la invención.

En un determinado aspecto de la invención, al menos uno, preferentemente todos, del primer dominio V_LA , el segundo dominio V_HB , el tercer dominio V_LB y el cuarto dominio V_HA son completamente humanos, humanizados o dominios quiméricos. Un dominio variable humanizado comprende una región estructural que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana y una CDR de una inmunoglobulina no humana. Se pueden producir anticuerpos humanizados mediante procedimientos bien establecidos como, por ejemplo, injerto de CDR (véase, por ejemplo, *Antibody engineering: methods and protocols* / editado por Benny K.C. Lo; Benny K.C. II Series: *Methods in molecular biology* (Totowa, N.J.)). Por tanto, un experto en la técnica está capacitado para realizar una versión humanizada o completamente humana de moléculas de unión a antígenos y dominios variables a partir de fuentes no humana, por ejemplo, murinas, con las técnicas biológicas moleculares estándar conocidas en la técnica para reducir la inmunogenicidad y mejorar la eficacia de la molécula de unión a antígenos en un sistema inmunitario humano. En una realización preferente de la invención todos los dominios (por ejemplo, V_LA , V_HB , V_LB y V_HA) son humanizados o completamente humanos; lo más preferente, la molécula de unión a antígenos dimérica de acuerdo con la invención es humanizada o completamente humana. El término "completamente humano" tal como se usa en el presente documento se refiere a que las secuencias de aminoácidos de los dominios variables y los péptidos que unen los dominios variables en la primera y segunda cadenas de polipéptidos se originan o pueden encontrarse en seres humanos. En determinadas realizaciones de la invención, los dominios variables pueden ser humanos o humanizados pero no los péptidos que unen los dominios variables.

El primer dominio V_LA , el segundo dominio V_HB , el tercer dominio V_LB y el cuarto dominio V_HA son específicos para distintos antígenos de modo que V_LA y V_HA forman un sitio de unión a antígenos para un antígeno A de una primera especificidad y V_HB y V_LB forman un sitio de unión a antígenos para un antígeno B de una segunda especificidad. Tales moléculas de unión a antígenos de acuerdo con la invención son bispecíficas.

La molécula de unión a antígenos es bispecífica para una célula tumoral y un linfocito T. Especificidades adecuadas para células tumorales pueden ser antígenos tumorales y antígenos de superficie celular sobre las respectivas células tumorales, por ejemplo, marcadores tumorales específicos. Tal molécula de unión a antígenos dimérica bispecífica se une tanto a la célula tumoral como al linfocito T desencadenando, de este modo, la respuesta citotóxica inducida por el linfocito T. El término "antígeno tumoral" tal como se usa en el presente documento comprende antígeno asociado a tumor (AAT) y antígeno específico a tumor (AET). Un "antígeno asociado a tumor" (AAT) tal como se usa en el presente documento se refiere a una proteína que está presente sobre células tumorales y sobre células normales durante la vida fetal (antígenos de una vez fetal) y después del nacimiento en órganos seleccionados, pero a una concentración mucho inferior sobre células tumorales. Un AAT también puede estar en el estroma en las proximidades de la célula tumoral pero expresado en cantidades inferiores en el estroma de otro lugar del organismo. En cambio, el término "antígeno específico a tumor" (AET) se refiere a una proteína expresada por células tumorales. El término "antígeno de superficie celular" se refiere a cualquier antígeno o fragmento del mismo capaz de ser reconocido por un anticuerpo sobre la superficie de una célula.

Ejemplos de especificidades de células tumorales incluyen aunque no de forma limitada a CD19, CD20, CD30, la proteína precursora del receptor de la laminina, EGFR1, EGFR2, EGFR3, Ep-CAM, PLAP, antígeno de Thomsen-Friedenreich (TF), MUC-1 (mucina), IGFR, CD5, IL4-R alfa, IL13-R, FcεRI e IgE tal como se describe en la técnica.

La especificidad para un linfocito T es CD3 y la especificidad para una célula tumoral puede seleccionarse entre CD19, CD20, CD30, el precursor del receptor de la laminina, Ep-CAM, EGFR1, EGFR2, EGFR3, PLAP, antígeno de Thomsen-Friedenreich (TF), MUC-1 (mucina), IGFR, CD5, IL4-R alfa, IL13-R, FcεRI e IgE. Ejemplos particulares de tales moléculas de unión a antígenos son bispecíficas para CD3 y CD19.

El primer dominio V_LA y el cuarto dominio V_HA tienen la especificidad para un CD3 y los otros dos dominios, a saber el segundo dominio V_HB y el tercer dominio V_LB , tiene la especificidad para una célula tumoral. En una realización particularmente preferente el primer dominio V_LA y el cuarto dominio V_HA tienen la especificidad para un CD3 y los otros dos dominios, a saber el segundo dominio V_HB y el tercer dominio V_LB , tiene la especificidad para una célula tumoral seleccionada entre el grupo que consiste en CD19, CD20, CD30, el precursor del receptor de la laminina, Ep-CAM, EGFR1, EGFR2, EGFR3, PLAP, antígeno de Thomsen-Friedenreich (TF), MUC-1 (mucina), IGFR, CD5, IL4-R alfa, IL13-R, FcεRI e IgE.

El antígeno de CD3 está asociado con el complejo del receptor de linfocitos T sobre los linfocitos T. En el caso en el que la especificidad para una célula efectora sea CD3, la unión de la molécula de unión a antígenos dimérica de acuerdo con la invención con respecto a CD3 puede desencadenar la actividad citotóxica de linfocitos T sobre células diana. Concretamente, mediante la unión bispecífica de la molécula de unión a antígenos dimérica a CD3 y a una célula diana, por ejemplo, célula tumoral, se puede inducir la lisis celular de la célula diana. Las moléculas de unión a antígenos diméricas con una especificidad hacia CD3 y su producción son conocidos en la técnica (y

descritas, por ejemplo, en Kipriyanov y col., 1999, Journal of Molecular Biology 293:41-56, Le Gall y col., 2004, Protein Engineering, Design & Selection, 17/4:357-366).

5 Las moléculas de unión a antígenos de acuerdo con la invención, en las que la especificidad tumoral es hacia el antígeno CD19 pueden usarse para la inmunoterapia de malignidades de linfocitos B, puesto que el antígeno CD19 se expresa sobre prácticamente todas las malignidades del linaje B desde leucemia linfoblástica (ALL) hasta linfoma no hodgkiniano (NHL). En particular, para el tratamiento del linfoma no hodgkiniano se pueden usar moléculas de unión a antígenos diméricas que tienen especificidad hacia CD19 o CD20. Las moléculas de unión a antígenos diméricas que tienen una especificidad hacia CD19 y su producción son conocidos en la técnica (y descritas, por ejemplo, en Cochlovius y col., 2000, Cancer Research 60:4336-4341).

10 Las moléculas de unión a antígenos de acuerdo con la invención, en las que la especificidad tumoral es hacia el receptor de la laminina o se puede usar el precursor del receptor de la laminina, por ejemplo, pero no de forma limitante, para el tratamiento de leucemia de linfocitos crónica de linfocitos B (B-CLL), linfoma no hodgkiniano, linfoma de Hodgkin, cáncer broncopulmonar, carcinoma de colon, carcinoma mamario, carcino pancreático, cáncer de próstata, en particular, en la condición de cáncer metastásico o cáncer residual mínimo. Las moléculas de unión a antígenos que tienen especificidad hacia el precursor del receptor de la laminina se describen, por ejemplo, en Zuber y col., 2008, J. Mol. Biol., 378:530-539.

20 Moléculas de unión a antígenos de acuerdo con la invención en las que la especificidad tumoral es hacia EGFR1 pueden resultar de uso particular en el tratamiento de cánceres en los que la expresión de EGFR1 se regula positivamente o altera, por ejemplo, en cánceres de mama, vejiga, cabeza y cuello, próstata, riñón, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer colorrectal y glioma.

Las moléculas de unión a antígenos de acuerdo con la invención en las que la especificidad tumoral es hacia el antígeno TF pueden resultar particularmente útiles en el tratamiento de cáncer de mama o de colon y/o metástasis hepáticas.

25 Las moléculas de unión a antígeno diméricas en las que la especificidad tumoral es hacia CD30 pueden resultar particularmente útiles en el tratamiento de la enfermedad de Hodgkin. Las moléculas de unión a antígenos que tienen la especificidad hacia CD30 se describen, por ejemplo, en Arndt y col., 1999, Blood, 94:2562-2568.

30 Las moléculas de unión a antígenos diméricas en las que la especificidad tumoral es hacia la cadena alfa del receptor IL4 (IL4R alfa) pueden resultar particularmente útiles en el tratamiento de tumores sólidos, en particular, carcinomas de la mama, ovarios, sistema renal, cabeza y cuello, melanoma maligno y sarcoma de Kaposi relacionado con el SIDA. Las moléculas de unión a antígenos diméricas en las que al menos una especificidad adicional es hacia EGFR3/HER3 y/o EGFR2/neu pueden resultar particularmente útiles en el tratamiento de cáncer de mama. Las moléculas de unión a antígeno diméricas en las que la especificidad tumoral es hacia IGFR pueden resultar particularmente útiles en el tratamiento de cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer de ovarios o cáncer de mama.

35 Las moléculas de unión a antígeno diméricas en las que la especificidad tumoral es hacia CD5 pueden resultar particularmente útiles en el tratamiento de leucemia linfocítica crónica.

Las moléculas de unión a antígeno diméricas en las que la especificidad tumoral es hacia MUC-I pueden resultar particularmente útiles en el tratamiento de cáncer gástrico y cáncer de ovarios.

40 Las moléculas de unión a antígeno diméricas en las que la especificidad tumoral es hacia EpCAM pueden resultar particularmente útiles en el tratamiento de carcinomas del colon, riñón y mama.

Las moléculas de unión a antígeno diméricas en las que la especificidad tumoral es hacia PLAP pueden resultar de uso particular en el tratamiento de cáncer de ovarios o de testículos.

Las moléculas de unión a antígeno diméricas en las que la especificidad tumoral es hacia OFA-iLR pueden resultar particularmente útiles en el tratamiento de tumores metastásicos.

45 En un aspecto determinado de la invención la molécula de unión a antígenos tal como se describe en el presente documento es dimérica y biespecífica para CD3 y CD19. El primer dominio V_LA y el cuarto dominio V_{HB} son específicos para CD3, mientras que el segundo dominio V_{LB} y el tercer dominio V_{LB} son específicos para CD19. La primera y segunda cadenas de polipéptidos tiene el orden de dominio $L^{CD3-V_H^{CD19}}-V_L^{CD19-V_H^{CD3}}$ desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal de las cadenas de polipéptidos. En una realización preferente, el primer, segundo, tercer y cuarto dominios son humanizados o completamente humanos. En una realización más preferente la primera y segunda cadena de polipéptidos tal como se ha definido anteriormente es humanizada o completamente humana. En otro aspecto de la invención, la molécula de unión a antígenos dimérica puede ser biespecífica, por ejemplo, a EpCAM y CD3; o EGFR y CD3.

55 Un aspecto adicional de la invención proporciona una molécula de unión a antígenos dimérica de acuerdo con cualquiera una de las realizaciones descritas anteriormente que está unida con una unidad funcional adicional, por ejemplo, un dominio o agente funcional, que media independientemente una función biológica, en un suceso

bioquímico particular. La unidad funcional adicional puede complejarse con o enlazarse covalentemente a al menos una de las dos cadenas de polipéptidos individuales de la molécula de unión a antígenos dimérica. En un aspecto, la unidad funcional adicional puede enlazarse covalentemente a solo una de las cadenas de polipéptidos individuales y, en otro aspecto, la unidad funcional adicional puede enlazarse covalentemente a ambas cadenas de polipéptidos de la molécula de unión a antígenos dimérica uniendo, de este modo, las dos cadenas de polipéptidos. En un aspecto adicional, cada una de las dos cadenas de polipéptidos está covalentemente enlazada individualmente a una unidad funcional adicional. Cuando la unidad funcional adicional está covalentemente enlazada a al menos una de las dos cadenas de polipéptidos, la unidad funcional adicional puede fusionarse en al menos una de las dos cadenas de polipéptidos mediante un enlace peptídico o un conector peptídico. Como alternativa, la unidad funcional adicional puede unirse mediante una conjugación química tal como un puente de bisulfuro, por ejemplo, entre un resto de cisteína de al menos una cadena de polipéptidos y un resto de cisteína de la unidad funcional adicional, unión de ésteres o mediante reticulación química. En determinado aspecto de la invención, la unidad funcional adicional puede unirse a la molécula de unión de antígenos mediante un conector escindible tal como, por ejemplo, un enlace de disulfuro.

La unidad funcional adicional puede unirse al extremo N terminal o al extremo C terminal de la primera y/o segunda cadenas de polipéptidos. Si se une una unidad funcional adicional a ambas, la primera y la segunda, cadenas de polipéptidos, la unidad funcional adicional puede unirse al extremo N-terminal a una cadena de polipéptidos y el extremo C-terminal a la otra cadena de polipéptidos. Los reactivos homobifuncionales y heterobifuncionales para la reticulación química de una cadena de polipéptidos con una unidad funcional adicional tal como un polipéptido adicional o un agente son bien conocidos en la técnica. Ejemplos incluyen, aunque no están limitados a, ácido 5,5"-ditiobis(2-nitrobenzónico) (DT-NB), o-fenilenodimaleimida (o-PDM), N-succinimidil 3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), N-succinimidil S-acetilto acetato (SATA), succinimidil 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (SMCC) o ácido 4-(4-N-maleimidofenil)butírico hidrazina (MPBH). Procedimientos de reticulación de cadenas de polipéptidos que comprenden cadenas de inmunoglobulina con un polipéptido adicional o un agente químico se describen, por ejemplo, en Graziano y col., *Methods in Molecular Biology*, 2004, vol. 283, 71-85 y Hermanson, G.T. "Bioconjugate Techniques" Academic Press, London 1996.

En un aspecto la unidad funcional adicional puede ser al menos un dominio de inmunoglobulina variable adicional. El dominio de inmunoglobulina variable adicional puede ser específico para el primer antígeno A o el segundo antígeno B para el que los sitios de unión de la molécula de unión a antígenos dimérica son específicos o, como alternativa, específicos para un tercer antígeno C que es distintos del antígeno A y el antígeno B. En un determinado aspecto se pueden fusionar un dominio variable de cadena ligera V_L y una variable de cadena pesada adicional V_H en cada una de las dos cadenas de polipéptidos de modo que un dominio adicional, en particular, V_H , se fusiona al extremo N-terminal y el otro dominio adicional, en particular, V_L , se fusiona al extremo C-terminal dando como resultado un polipéptido que tiene seis dominios variables que se asociarán con otro polipéptido idéntico a una molécula de unión de antígenos dimérica que tiene seis sitios de unión a antígenos. En otro aspecto, se puede fusionar un dominio de inmunoglobulina variable adicional a una de las cadenas de polipéptidos de la molécula de unión a antígenos que, entonces, se asocia no covalentemente con un dominio de inmunoglobulina variable complementario con la misma especificidad de un tercer polipéptido formando, de este modo, un sitio de unión a antígenos adicional entre la molécula de unión a antígenos dimérica y el tercer polipéptido adicional. En otro aspecto, una unidad de unión a antígenos adicional que incluye un scFv o un diacuerpo puede unirse como una unidad funcional adicional a la molécula de unión a antígenos dimérica.

En un aspecto determinado la unidad funcional adicional puede ser al menos una molécula de unión a antígenos dimérica adicional tal como se describe en el presente documento. Por consiguiente, dos o más moléculas de unión a antígenos diméricas de acuerdo con la invención se pueden unir con otra para aumentar la valencia y avidéz de las moléculas de unión a antígenos.

En un otro aspecto la unidad funcional adicional puede ser un dominio efector que incluye el dominio Fc, el dominio CH2, el dominio CH3, el dominio bisagra o un fragmento de los mismos. Tal unidad puede conferir propiedades efectoras sobre la molécula de unión a antígenos en el caso de unirse a receptores Fc. Tales unidades funcionales pueden usarse adicionalmente para aumentar la vida útil del suero de la molécula de unión a antígenos.

En un otro aspecto la unidad funcional adicional puede ser una enzima. En el caso en el que la enzima sea capaz de convertir un profármaco en un fármaco activo, tal molécula de unión a antígenos puede usarse en la terapia de profármacos con enzimas dependiente de anticuerpos (ADEPT). Para esto, la molécula de unión a antígenos dirige la enzima al tejido de interés y cuando la molécula de unión a antígenos se une al tejido, el profármaco se activa en ese sitio. Además, el uso de moléculas de antígenos biespecíficas para el direccionamiento de enzima para terapéutica del cáncer es conocido en la técnica, por ejemplo, aunque no de forma limitativa a moléculas de antígenos biespecíficas que tienen especificidades para CD30 y fosfatasa alcalina que cataliza la conversión de fosfato de mitomicina en alcohol de mitomicina, o especificidades para la fosfatasa alcalina placentaria y β -lactamasa que activan profármacos anticancerígenos a base de cefalosporina. También son adecuadas moléculas de unión a antígenos biespecíficas que tienen especificidad para la fibrina y el activador tisular del plasminógeno para la fibrinólisis y el uso de moléculas de unión a antígenos conjugadas con enzimas en inmunoensayos a base de enzimas.

En un otro aspecto la unidad funcional adicional puede ser un fármaco, una toxina, un radioisótopo, una linfocina, una quimiocina o una molécula marcadora. Tal molécula de unión a antígenos envía la unidad funcional a el sitio deseado de acción. Por ejemplo, un fármaco quimioterapéutico unido a una molécula de unión a antígenos que es específica para un antígeno tumoral puede enviarse a una célula tumoral y se pueden enviar toxinas a patógenos o células tumorales. Una molécula de unión a antígenos unida con una toxina puede usarse para dirigir células NK o macrófagos y son preferentemente específicas para CD16. Ejemplos de una toxina son, aunque no de forma limitativa a, ribosil transferasa, serina proteasa, activador de guanilato ciclasa, adenilato ciclasa dependiente de calmodulina, ribonucleasa, agente de alquilación de ADN o inhibidor de mitosis, por ejemplo, doxorubicina. La molécula marcadora puede ser, por ejemplo, una molécula fluorescente, luminiscente o radiomarcadora, un quelato de metal o una enzima (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, malato deshidrogenasa, glucosa oxidasa, ureasa, catalasa, etc.) que, a su vez, cuando se expone por último a un sustrato reaccionará con el sustrato de tal modo que producirá un resto químico que puede detectarse y puede usarse para una formación de imágenes o inmunoensayos *in vivo*, cuando está unida a la molécula de unión a antígenos de acuerdo con la invención. Cuando se usa para un inmunoensayo, la molécula de unión a antígenos dimérica puede también inmovilizarse sobre un vehículo insoluble, por ejemplo, vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nailon, celulosas naturales y modificadas, poliácridamidas, agarosa y perlas magnéticas.

Para aumentar la vida útil del suero de las moléculas de unión a antígenos de acuerdo con la invención en el organismo, la molécula de unión a antígenos, si se desea, puede fusionarse a albúmina o pegilada, sialilada o glicosilada (véase, por ejemplo, Stork y col., 2008, J. Biol. Chem., 283:7804-7812). De forma alternativa, a una fusión de albúmina adicional a la molécula de unión a antígenos de acuerdo con la presente invención, la molécula de unión a antígenos misma puede ser específica para una albúmina y otro antígeno tal como se ha descrito en el presente documento anteriormente.

La molécula de unión a antígenos dimérica de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento anteriormente se puede producir expresando polinucleótidos que codifican las cadenas de polipéptidos individuales que se asocian entre sí para formar la molécula de unión a antígenos dimérica. Por lo tanto, una realización adicional de la invención son polinucleótidos, por ejemplo, ADN o ARN, que codifican las cadenas de polipéptidos de la molécula de unión a antígenos tal como se ha descrito en el presente documento anteriormente.

Los polinucleótidos pueden construirse mediante procedimientos conocidos para el experto, por ejemplo, combinando los genes que codifican el primer dominio V_LA , el segundo dominio V_HB , el tercer dominio V_LB y el cuarto dominio V_HA bien separados mediante conectores peptídicos o directamente unidos mediante un enlace peptídico, en una única construcción genética unida operativamente a un promotor adecuado y, opcionalmente un terminador de la transcripción adecuado y que se expresa en bacterias u otro sistema de expresión adecuado. Dependiendo del sistema de vectores y hospedador utilizados, se puede usar cualquier número de elementos de transcripción y traslación adecuados, incluidos promotores constitutivos e inducibles. El promotor se selecciona de modo que conduce la expresión del polinucleótido en la respectiva célula hospedadora.

Los polinucleótidos pueden optimizarse por codones alterándose el sesgo de codones para adecuarse a la expresión particular en el hospedador escogido.

El polinucleótido puede insertarse en vectores, preferentemente vectores de expresión, que representan una realización adicional de la invención. Estos vectores recombinantes pueden construirse de acuerdo con procedimientos bien conocidos por el experto en la técnica; véase, por ejemplo, Sambrook, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y.

Una variedad de sistemas de vectores/hospedadores de expresión puede utilizarse para contener y expresar los polinucleótidos que codifican las cadenas de polipéptidos de la presente invención. Estas incluyen, pero sin limitación, microorganismos tales como bacterias transformadas con bacteriófagos, plásmidos o vectores de expresión de ADN cósmidos recombinantes, levaduras transformadas con vectores de expresión en levaduras; sistemas celulares de insecto infectados con vectores de expresión víricos (por ejemplo, baculovirus); sistemas celulares de plantas transformados con vectores de expresión víricos (por ejemplo, el virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o vectores de expresión bacterianos (por ejemplo, plásmidos Ti o pBR322); o sistemas celulares de animales, para los que, por ejemplo, se pueden utilizar sistemas de expresión basados en virus.

Un vector de expresión preferente particular para la expresión en *E.coli* es pSKK (LeGall y col., J Immunol Methods. (2004) 285(1) :111-27) or pcDNA5 (Invitrogen) para la expresión en células de mamíferos.

Por tanto, la molécula de unión a antígenos dimérica tal como se describe en el presente documento puede producirse introduciendo un polinucleótido o vector que codifica la cadena de polipéptidos tal como se ha descrito anteriormente en una célula hospedadora y cultivando dicha célula hospedadora en condiciones en las que se expresa la cadena de polipéptidos. La molécula de unión a antígenos dimérica obtenida a partir de las cadenas de polipéptidos expresadas puede aislarse y, opcionalmente, purificarse adicionalmente. Las condiciones para el crecimiento y mantenimiento de células hospedadoras, la expresión, aislamiento y purificación de moléculas de unión a antígenos de acuerdo con la invención a partir de estas células hospedadoras se describe completamente

en la técnica.

En una realización adicional de la invención, se proporcionan composiciones que comprenden una molécula de unión a antígenos dimérica o un polinucleótido tal como se ha descrito anteriormente en el presente documento y al menos un componente adicional. Para su uso en la prevención o tratamiento de una enfermedad o trastorno, la composición que contiene la molécula de unión a antígenos o molécula de ácidos polinucleicos que codifica las cadenas de polipéptidos que forman la molécula de unión a antígenos se combina preferentemente con un vehículo farmacéuticamente aceptable. El término "farmacéuticamente aceptable" pretende abarcar cualquier vehículo, que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica de los ingredientes y que no es tóxico para el paciente al que se administra. Ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados son bien conocidos en la técnica e incluyen soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones de aceite/agua, varios tipos de agentes humectantes, soluciones estériles, etc. Tales vehículos pueden formularse mediante procedimientos convencionales y pueden administrarse al sujeto a una dosis adecuada. Preferentemente, las composiciones son estériles. Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como agentes conservantes, emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la acción de los microorganismos puede asegurarse mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos. La administración de las composiciones adecuadas puede efectuarse de diferentes maneras, por ejemplo, mediante administración por vía intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, tópica o intradérmica. La vía de administración, por supuesto, depende del tipo de terapia y del tipo de compuesto contenido en la composición farmacéutica. El régimen de dosificación será determinado por el médico a cargo y otros factores clínicos. Como es bien sabido en las técnicas médicas, las dosis para cualquier paciente dependen de muchos factores, incluido la talla del paciente, área superficial del cuerpo, la edad, el sexo, el compuesto particular a administrar, hora y vía de administración, el tipo de terapia, la salud general y otros fármacos que se administran simultáneamente.

La invención proporciona adicionalmente un uso o procedimiento en el que la molécula de unión a antígenos dimérica tal como se ha descrito anteriormente se administra en una dosis eficaz a un sujeto, por ejemplo, un paciente, para el tratamiento de cáncer (por ejemplo, linfoma no hodgkiniano; leucemia linfocítica crónica; linfoma de Hodgkin; tumores sólidos, por ejemplo, aquellos que aparecen en el cáncer de mama, cáncer de ovarios, cáncer de colon, cáncer de riñón o cáncer del conductor biliar; enfermedad residual mínima; tumores metastáticos, por ejemplo, aquellos que se metastatizan en los pulmones, huesos, hígado o cerebro). La molécula de unión a antígenos puede usarse en escenarios profilácticos o terapéuticos, sola o en combinación con terapias actuales.

Los cánceres que pueden tratarse usando la molécula de unión a antígenos de la presente invención incluyen, aunque no de forma limitativa a cáncer cortical adrenal primario y metastático, cáncer anal, anemia aplásica, cáncer de las vías biliares, cáncer de vejiga, cáncer de hueso, metástasis ósea, tumores del SNC, cáncer del SNC periférico, cáncer de mama, enfermedad de Castleman, cáncer de cuello de útero, linfoma no hodgkiniano de la niñez, cáncer de colon y de recto, cáncer endometrial, cáncer de esófago, tumores de la familia de Ewing (por ejemplo, sarcoma de Ewing), cáncer ocular, cáncer de vesícula biliar, tumores carcinoides gastrointestinales, tumores del estroma gastrointestinal, enfermedad trofoblástica gestacional, leucemia de células pilosas, enfermedad de Hodgkin, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, cáncer de la laringe y la hipofaringe, leucemia linfocítica aguda, leucemia mieloide aguda, leucemia infantil, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide crónica, cáncer de hígado, cáncer broncopulmonar, tumores carcinoides pulmonares, linfoma no hodgkiniano, cáncer de mama masculina, mesotelioma maligno, mieloma múltiple, síndrome mielodisplásico, trastornos mieloproliferativos, cáncer de cavidad nasal y paranasal, cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, cáncer de cavidad oral y orofaríngeo, osteosarcoma, cáncer de ovarios, cáncer de páncreas, cáncer de pene, tumor de la pituitaria, cáncer de próstata, retinoblastoma, rabdomiosarcoma, cáncer de glándula salival, sarcoma (cáncer de tejido blando adulto), cáncer en la piel de melanoma, cáncer de la piel sin melanoma, cáncer de estómago, cáncer testicular, cáncer del timo, cáncer de tiroides, cáncer uterino (por ejemplo, sarcoma uterino), cáncer vaginal, cáncer vulvar y macroglobulemia de Wldenström.

Una "dosis eficaz" se refiere a cantidades del principio activo que son suficiente para afectar el curso y la gravedad de la enfermedad, lo que lleva a la reducción o remisión de dicha patología. Una "dosis eficaz" útil para tratar y/o prevenir estas enfermedades o trastornos puede determinarse usando procedimientos conocidos por un experto en la materia (véase, por ejemplo, Fingl y col., *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Goddman y Gilman, eds. Macmillan Publishing Co., Nueva York, págs. 1-46 (1975)).

En otro aspecto de la invención la molécula de unión a antígenos dimérica tal como se ha descrito en el presente documento se usa en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cáncer (por ejemplo, linfoma no hodgkiniano; leucemia linfocítica crónica; linfoma de Hodgkin; tumores sólidos, por ejemplo, aquellos que aparecen en el cáncer de mama, cáncer de ovarios, cáncer de colon, cáncer de riñón o cáncer del conductor biliar; enfermedad residual mínima; tumores metastáticos, por ejemplo, aquellos que se metastatizan en los pulmones, huesos, hígado o cerebro). Cuando se especifica, se han descrito anteriormente moléculas de unión multiespecíficas como que tienen una utilidad particular en el tratamiento de una enfermedad especificada, estas moléculas de unión también se pueden usar en la fabricación de un medicamento para esa enfermedad especificada.

Los procedimientos para preparar composiciones farmacéuticas, es decir, medicamentos, y la aplicación clínica de moléculas de unión a antígenos en la prevención y/o tratamiento de enfermedades tales como, por ejemplo, cáncer,

son conocidos para el experto en la materia.

En un aspecto particular de la invención la molécula de unión a antígenos dimérica es biespecífica y se usa para la terapia de cáncer, puesto que tales anticuerpos pueden usarse para redirigir células efectoras citotóxicas frente a células tumorales. Es concepto terapéutico como es bien conocido en la técnica. Por ejemplo, estudios clínicos mostraron regresión tumoral en pacientes tratados con anti-CD3 para anticuerpo biespecífico antitumoral (por ejemplo, Canevari, S. y col., J. Natl. Cancer Inst., 87:1463-1469, 1996) o pacientes tratados con un anti-CD16 para anticuerpo biespecífico antitumoral (por ejemplo, Hartmann y col.; Clin Cancer Res. 2001;7(7):1873-81). La demostración conceptual también ha mostrado para diversas moléculas de anticuerpos biespecíficas recombinantes que comprenden solo dominios variables (Fv) tales como, por ejemplo, moléculas de unión a antígenos CD3xCD19 diméricas y tetravalentes que tienen un orden de dominio $V_HA-V_LB-V_HB-V_LA$ (Cochlovius y col.; Cancer Research, 2000, 60:4336-4341) o estudios clínicos recientes con moléculas de anticuerpos Fv unicatenarias monoméricas del formato BiTE® (dos anticuerpos unicatenarias de distintas especificidades unidos juntos; Micromet AG, Alemania; Bargou R. y col., Science, 2008, 321(5891):974-977; Baeuerle PA and Reinhardt C., Cancer Res. 2009, 69(12):4941-4944). Las moléculas de unión a antígenos diméricas descritas en el presente documento pueden usarse como medicamentos y aplicarse en procedimientos de tratamiento de un modo similar que los anticuerpos biespecíficos de la técnica, ya que son capaces de redirigir mecanismos terapéuticos, por ejemplo, citotóxicos, usando las mismas especificidades de anticuerpos combinadas.

La molécula de unión a antígenos y las composiciones de la misma pueden ser en la forma oral, intravenosa, intraperitoneal u otra forma de dosificación farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la composición se administra oralmente y la forma de dosificación es un comprimido, cápsula, cápsula u otra forma oralmente disponible. En algunas realizaciones, la composición es parenteral, por ejemplo, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular o subcutánea y se administra por medio de una solución que contiene la molécula de unión a antígenos.

Un experto en la técnica será fácilmente capaz sin esfuerzo indebido de construir y obtener las moléculas de unión a antígenos descritas en el presente documento utilizando técnicas establecidas y procedimientos estándares conocidos en la técnica, por ejemplo, véase, Sambrook, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y.; The Protein Protocols Handbook, editado por John M. Walker, Humana Press Inc. (2002); o Antibody engineering: methods and protocols / editado por Benny K.C. Lo; Benny K.C. II Series: Methods in molecular biology (Totowa, N.J.). Además, un experto en la técnica será capaz de fabricar moléculas de unión a antígenos descritas en el presente documento utilizando procedimientos estándar conocidos en la técnica y modificando los procedimientos descritos en el documento US 7.129.330, Kipriyanov y col. J. Mol. Biol. (1999) 293, 41-56 o Le Gall y col., 2004, Protein Engineering 17:357-366 de modo que se obtienen moléculas de unión a antígenos diméricas tal como se ha descrito anteriormente que comprenden dos cadenas de polipéptidos que tienen el orden de dominio $V_LA-V_HB-V_LB-V_HA$ desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal de cada cadena de polipéptidos.

Los ejemplos a continuación ilustran adicionalmente la invención sin limitar el ámbito de la invención.

Ejemplo:

Para construir diacuerpos en tándem diméricos funcionales (TandAb®) usando una disposición de dominio distinta a $V_HA-V_LB-V_HB-V_LA$, se construyeron varios tales diacuerpos en tándem con la disposición de dominio $V_LA-V_HB-V_LB-V_HA$ de acuerdo con la invención usando los dos dominios de un anticuerpo unicatenario anti-CD19 humanizado y un anticuerpo unicatenario anti-CD3 humanizado, respectivamente. Los hallazgos se confirmaron usando dos variantes de cada molécula de unión a antígenos, que representaba los productos de distintas etapas de un procedimiento de maduración por afinidad que se llevó a cabo para ambos anticuerpos anti-CD19 humanizado y anti-CD3 humanizado.

Los anticuerpos monoclonales murinos HD37 y UCHT dirigidos frente a CD19 y CD3, respectivamente, fueron el material de partida para obtener anticuerpos humanizados con afinidades relativamente altas. En cada caso, el dominio V_H se combinó en primer lugar con una librería de V_L humano en un vector fagémico de scFv para seleccionar una cadena de V_L humana mediante expresión de fagos. En una segunda etapa, la cadena V_L humana seleccionada se combinó con una biblioteca de dominios V_H en los que la región CDR3 permaneció constante. Este procedimiento dio como resultado un anti CD19 y anti CD3 humanizados, respectivamente, que solo contenía una secuencia murina corta en la región VHCDR3. Estos clones se maduraron por afinidad posteriormente introduciendo puntos de maduración en restos que se pensaba que estaban implicados en la unión a antígenos. Los mejores mutantes de unión se seleccionaron entonces mediante expresión de fagos. Los clones escogidos para construir el TandAb fueron M13 y M39 que se unían a CD19 y C4 y LcHC21 que se unía a CD3.

Se generaron los siguientes anticuerpos:

Anticuerpo A1: $CD19^{M39} \times CD3^{C4}$ (opción 0) $V_H^{CD3C4} - V_L^{CD19M39} - V_H^{CD19M39} - V_L^{CD3C4}$

Anticuerpo B: $CD19^{M39} \times CD3^{C4}$ (opción 2) $V_L^{CD3C4} - V_H^{CD19M39} - V_L^{CD19M39} - V_H^{CD3C4}$

Anticuerpo A2: $CD19^{M13} \times CD3^{LCHC21}$ (opción 0) $V_H^{CD3LCHC21} - V_L^{CD19M13} - V_H^{CD19M13} - V_L^{CD3LCHC21}$

Anticuerpo C: CD19^{M13}XCD3^{LCHC21} (opción 2) V_L^{CD3LCHC21}-V_H^{CD19M13}-V_H^{CD19M13}-V_H^{CD3LCHC21}

Los plásmidos que codificaban los monómeros híbridos V_L^{CD3C4}-V_H^{CD19M39}-V_L^{CD19M39}-V_H^{CD3C4} del anticuerpo B y V_L^{CD3LCHC21}-V_H^{CD19M13}-V_L^{CD19M13}-V_H^{CD3LCHC21} del anticuerpo C se generaron mediante un proveedor de ingeniería y procesamiento de ADN. La estructura principal secuencial del monómero V_L^{CD3C4}-V_H^{CD19M39}-V_L^{CD19M39}-V_H^{CD3C4} comprende las secuencias de ADN de dos anticuerpos scFv, a saber, scFvCD 19^{M39} y scFvCD3^{C4}, respectivamente. La secuencia monomérica V_L^{CD3LCHC21}-V_H^{CD19M13}-V_L^{CD19M13}-V_H^{CD3LCHC21} combina los dominios variables del Fv CD19^{M13} uncatenario y el Fv CD3^{LCHC21} uncatenario. Todos los cuatro scFv se obtuvieron mediante selección de expresión de fagos de anticuerpos uncatenarios frente a los antígenos CD19 y CD3. En ambos casos la información secuencial se usó para construir los anteriores monómeros híbridos. Un conector de 9 aminoácidos (G₂S)₃ se usó para unir los dominios entre sí. El gen sintetizado que codificaba V_L^{CD3C4}-V_H^{CD19M39}-V_L^{CD19M39}-V_H^{CD3C4} se clonó en el vector de expresión de mamífero pCDNA5FRT (Invitrogen). El gen de V_L^{CD3LCHC21}-V_H^{CD19M13}-V_L^{CD19M13}-V_H^{CD3LCHC21} también se clonó en un vector de expresión y se amplificó mediante PCR usando un cebador directo que introducía un sitio de escisión NcoI y un cebador indirecto que introducía un sitio de escisión NotI. Después del análisis y aislamiento mediante gel de agarosa, el producto de la PCR se digirió dos veces posteriormente mediante NcoI y NotI y se clonó en el vector pSKK3 linealizado de NcoI y NotI. Se confirmó el correcto clonaje mediante secuenciación de ADN.

El mapa de vectores de pCDNA5FRT que codifica el anticuerpo B se muestra en la Fig. 6. El mapa de vectores de pSKK3 que codifica el anticuerpo C se muestra en la Fig. 7.

Para una producción de alto nivel el vector que contenía el gen V_L^{CD3C4}-V_H^{CD19M39}-V_L^{CD19M39}-V_H^{CD3C4} se transfectó transitoriamente (usando CaPO₄) en células HEK293 adherentes. Se llevó a cabo la fermentación proteica en condiciones de crecimiento bien conocidas en la técnica.

La proteína recombinante se expresó como una proteína de fusión His-Tag con un péptido de señal. La proteína se aisló del sobrenadante del cultivo celular mediante cromatografía de afinidad de metal inmovilizada (IMAC) tal como se ha descrito (Kipriyanov y col., 1999, J.Mol.Biol., 293, 41-56). El material purificado se analizó posteriormente mediante SDS-PAGE. La tinción de azul Coomassie de un gel de SDS PAGE y cromatografía por exclusión de tamaño sobre una columna calibrada de Superdex 200 HR10/30 (Amersham Pharmacia, Freiburg, Alemania) en tampón de fosfato de sodio (30 mM de NaPO₄, 0,75M arginina/HCl, pH 6,0) reveló una proteína recombinante correctamente ensamblada y pura (Anticuerpo B).

Para una expresión de alto nivel, el gen que codificaba el monómero V_L^{CD3LCHC21}-V_H^{CD19M13}-V_L^{CD19M13}-V_H^{CD3LCHC21} humanizado seguido por 6x His-Tag se clonó en el plásmido pSKK3 que contenía el sistema suicida celular del gen hok/sok y el gen skp que codificaba el factor periplásmico Skp/OmpH (LeGall y col., 2004, J. Immunol. Methods, 285, 111-127). El plásmido se transfectó en una cepa K12 de E.coli (ATCC 31608TM).

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

El material purificado se analizó posteriormente mediante SDS-PAGE teñido con azul Coomassie y cromatografía de exclusión de tamaño sobre una columna calibrada de Superdex 200 HR10/30 (Amersham Pharmacia, Freiburg, Alemania) en tampón de fosfato de sodio (30 mM de NaPO₄, 0,75M arginina/HCl, pH 6,0). El producto pareció puro y correctamente ensamblado.

Los anticuerpos comparativos A1 y A2 se generaron del mismo modo que los anticuerpos B y C, respectivamente, en los que el orden de dominio de los anticuerpos A1 y A2, respectivamente, se invirtieron en comparación con el de los anticuerpos B y C, respectivamente.

Se llevaron a cabo ensayos de citotoxicidad esencialmente tal como se ha descrito por T. Dreier y col. (2002, Int J Cancer 100, 690-697). Las CMSP que se usaron como células efectoras se aislaron de la sangre periférica de voluntarios sanos mediante centrifugación por gradiente de densidad. En algunos casos, las CMSP se cultivaron durante la noche en presencia de 25 U/ml de IL-2 humana antes de que se usaran como células efectoras en el ensayo de citotoxicidad. La pureza y expresión de antígeno de las CMSP aisladas se evaluó mediante citometría de flujo en cada caso (datos no mostrados).

Se cultivaron células diana Raji o CD19+ JOK-1 en medio RPMI 1640 complementado con 10 % de FCS, 2 mM de L-glutamina y 100 UI/ml de sodio de penicilina G y 100 µg/ml de sulfato de estreptomycin (en el presente documento denominado como medio RPMI; todos los componentes de Invitrogen). Para el ensayo de citotoxicidad las células se marcaron con 10 µM de calceína AM (Sondas moleculares/Invitrogen) durante 30 min en medio RPMI sin FCS a 37 °C. Después de lavar suavemente las células marcadas se resuspendieron en medio RPMI a una densidad de 1x10⁵/ml. A continuación, se cultivaron 1x10⁴ células diana junto con 5x10⁵ de CMSP con los anticuerpos indicados en pocillos individuales de una micro placa de 96 pocillos de fondo redondo en una volumen total de 200 µl/pocillo. Después de una centrifugación de 2 min a 200 g el ensayo se incubó durante 4 horas a 37 °C en una atmósfera humificada con 5 % de CO₂. 15 min antes del final de la incubación se añadieron 20 µl de Triton X-100 al 10 % en medio RPMI a los pocillos con células diana solo. Se añadieron 20 µl de medio RPMI a todos los otros pocillos. Se

- 5 cosecharon 100 µl de sobrenadante de cultivo a partir de cada pocillo después de una centrifugación adicional durante 5 min a 500 g y la fluorescencia de la calceína liberada se midió a 520 nm usando un lector de placas de fluorescencia (Victor 3, Perkin Elmer). Basándose en los recuentos medidos, se calculó la lisis celular específica de acuerdo con la siguiente fórmula: $[\text{fluorescencia (muestra)} - \text{fluorescencia (espontánea)}] / [\text{fluorescencia (máxima)} - \text{fluorescencia (espontánea)}] \times 100 \%$. La fluorescencia (espontánea) representa los recuentos fluorescentes a partir de células diana en ausencia de células efectoras y anticuerpos y la fluorescencia (máxima) representa la lisis celular total inducida mediante la adición de Triton X-100. Se calcularon las curvas de respuesta a la dosis sigmoidal y los valores EC_{50} usando el software Prism (GraphPad Software).

Resultados:

- 10 Los resultados de los ensayos de citotoxicidad para diacuerpos en tándem que tienen el siguiente orden de dominio que empieza en el extremo N-terminal de $V_{HA}-V_{LB}-V_{HB}-V_{LA}$ (anticuerpo A) y $V_{LA}-V_{HB}-V_{LB}-V_{HA}$ (anticuerpo B), respectivamente, usando la variante M39 de anti CD19 y la variante C4 del anti CD3 se muestran en la Figura 3.
- 15 Sorprendentemente, hubo una diferencia muy grande en la actividad citotóxica de los dos diacuerpos en tándem. El diacuerpo en tándem que tenía la disposición de dominio de acuerdo con la invención designado como "anticuerpo B" fue más de 60 veces más activo que el diacuerpo en tándem designado "anticuerpo A" como se determinó mediante comparación de sus valores EC_{50} en condiciones dadas.
- La superioridad de la disposición de dominio representada por la presente invención (anticuerpo C) para una mejor citotoxicidad se confirmó usando dos variantes adicionales de los anticuerpos anti CD19 y anti CD3 (véase Figura 4).
- 20 El valor EC_{50} del diacuerpo en tándem con el orden de dominio de acuerdo con la invención representado por la opción 2 es extremadamente bajo (0,1 pM). Es 27 veces más activo que el TandAb representado por la opción 0 después de comparar los valores EC_{50} en condiciones dadas.

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de unión a antígenos dimérica que consiste en una primera y una segunda cadena de polipéptidos, conteniendo cada una de la primera y la segunda cadenas de polipéptidos

- un primer dominio V_LA que es un dominio variable de cadena ligera específico para el primer antígeno A;
- un segundo dominio V_HB que es un dominio variable de cadena pesada específico para un segundo antígeno B;
- un tercer dominio V_LB que es un dominio variable de cadena ligera específico para el segundo antígeno B; y
- un cuarto dominio V_HA que es un dominio variable de cadena pesada específico para el primer antígeno A,

en la que

- V_LA está unido con V_HB mediante un primer conector $L1$, V_HB está unido con V_LB mediante un segundo conector $L2$ y V_LB está unido con V_HA mediante un tercer conector $L3$;
- el primer dominio V_LA y el cuarto dominio V_HA son específicos para CD3;
- el segundo dominio V_HB y el tercer dominio V_LB son específicos para una célula tumoral;
- dichos conectores $L1$, $L2$ y $L3$ consisten en de 4 a 12 restos de aminoácidos;
- dichos dominios están dispuestos en cada una de dicha primera y segunda cadenas de polipéptidos en el orden $V_LA-V_HB-V_LB-V_HA$ desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal de dichas cadenas de polipéptidos, y
- el primer dominio V_LA de la primera cadena de polipéptidos está asociada con el cuarto dominio V_HA de la segunda cadena de polipéptidos para formar un sitio de unión específico para CD3;
- el segundo dominio V_HB de la primera cadena de polipéptidos está asociada con el tercer dominio V_LB de la segunda cadena de polipéptidos para formar un sitio de unión a antígenos específico para la célula tumoral;
- el tercer dominio V_LB de la primera cadena de polipéptidos está asociada con el segundo dominio V_HB de la segunda cadena de polipéptidos para formar un sitio de unión a antígenos específico para la célula tumoral; y
- el cuarto dominio V_HA de la primera cadena de polipéptidos está asociada con el primer dominio V_LA de la segunda cadena de polipéptidos para formar un sitio de unión específico para CD3.

2. La molécula de unión a antígenos de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la primera y la segunda cadenas de polipéptidos no están covalentemente asociadas.

3. La molécula de unión a antígenos de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que los dominios son dominios humanos o dominios humanizados.

4. La molécula de unión a antígenos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicha molécula de unión a antígenos comprende al menos una unidad funcional adicional.

5. La molécula de unión a antígenos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la especificidad para una célula tumoral es un antígeno tumoral o un antígeno de superficie celular sobre la célula tumoral.

6. La molécula de unión a antígenos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la molécula de unión a antígenos es específica para CD3 y CD19.

7. Una molécula de ácidos nucleicos que codifica la cadena de polipéptidos de la molécula de unión a antígenos dimérica de acuerdo con cualquiera una de las reivindicaciones 1 a 6.

8. Una composición que comprende la molécula de unión a antígenos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

9. La molécula de unión a antígenos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para su uso como medicamento.

10. La molécula de unión a antígenos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para su uso en el tratamiento de cáncer.

11. La molécula de unión a antígenos de acuerdo con la reivindicación 6 para su uso en el tratamiento de una malignidad de linfocitos B.

12. La molécula de unión a antígenos para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en la que la malignidad de linfocitos B se selecciona entre el grupo que consiste en leucemia linfoblástica y linfoma no hodgkiniano.

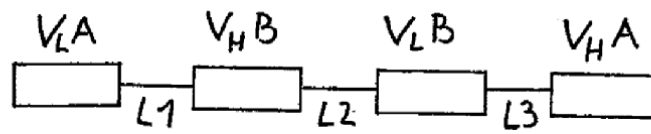


Fig. 1

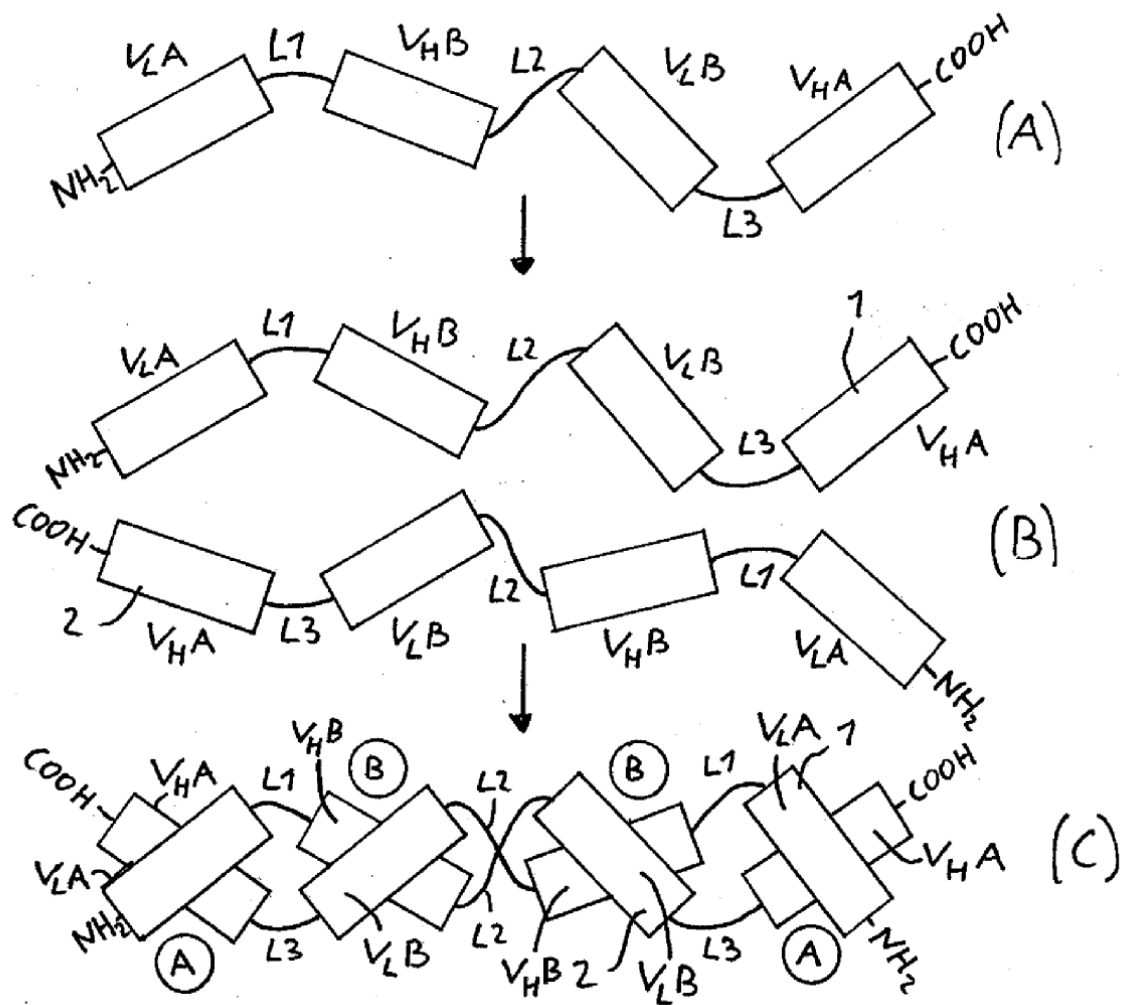


Fig. 2

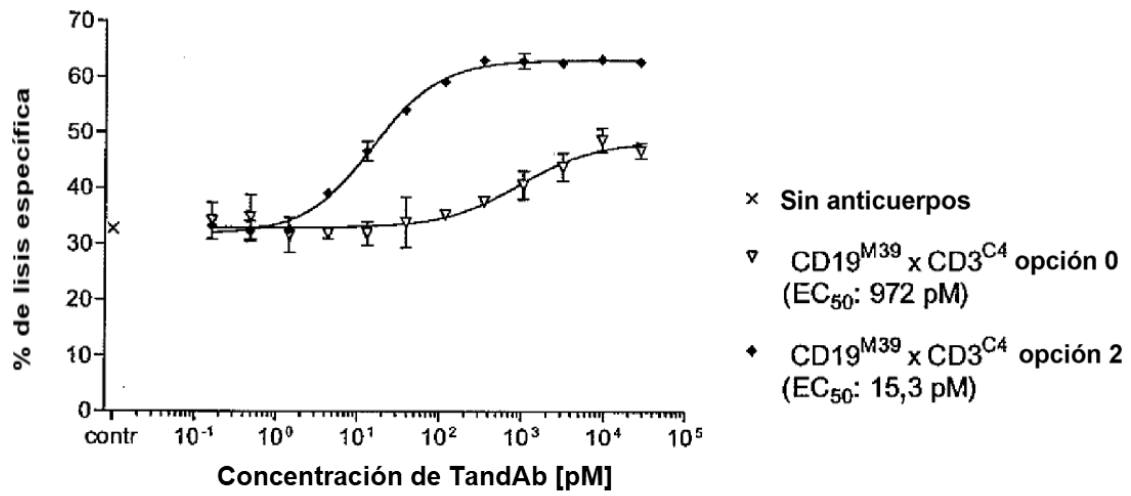


Fig. 3

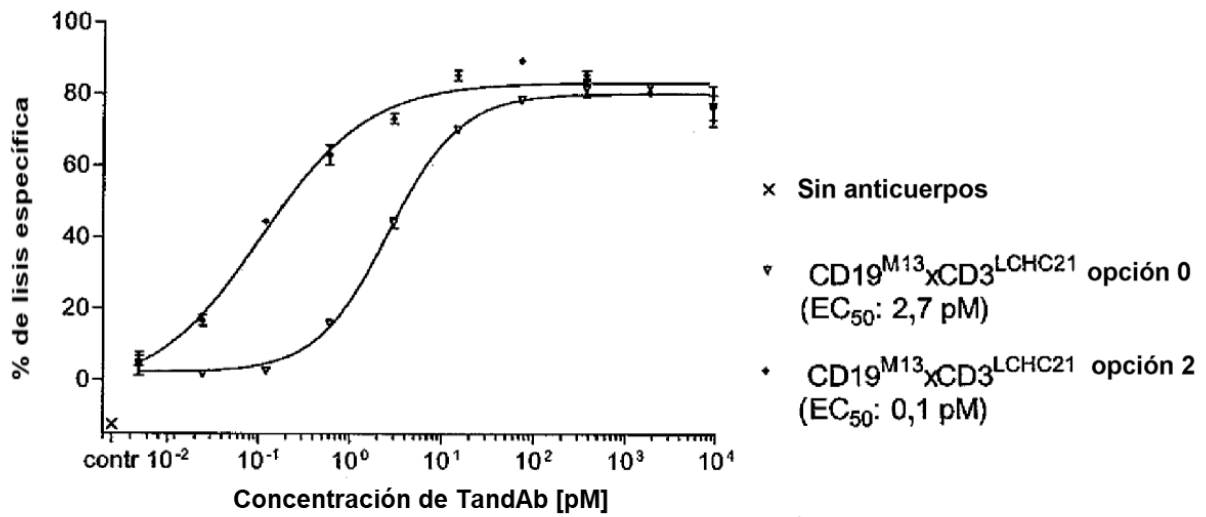


Fig. 4

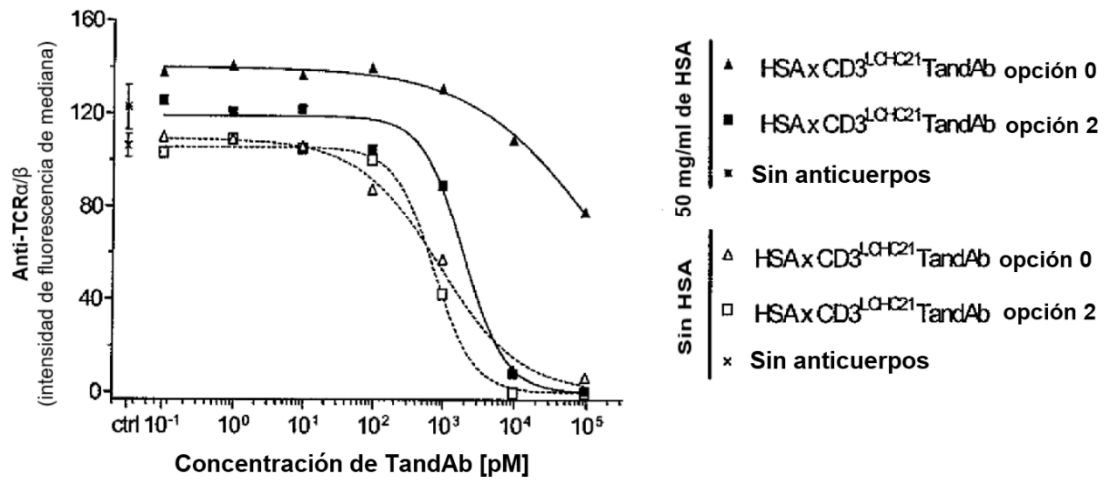


Fig. 5

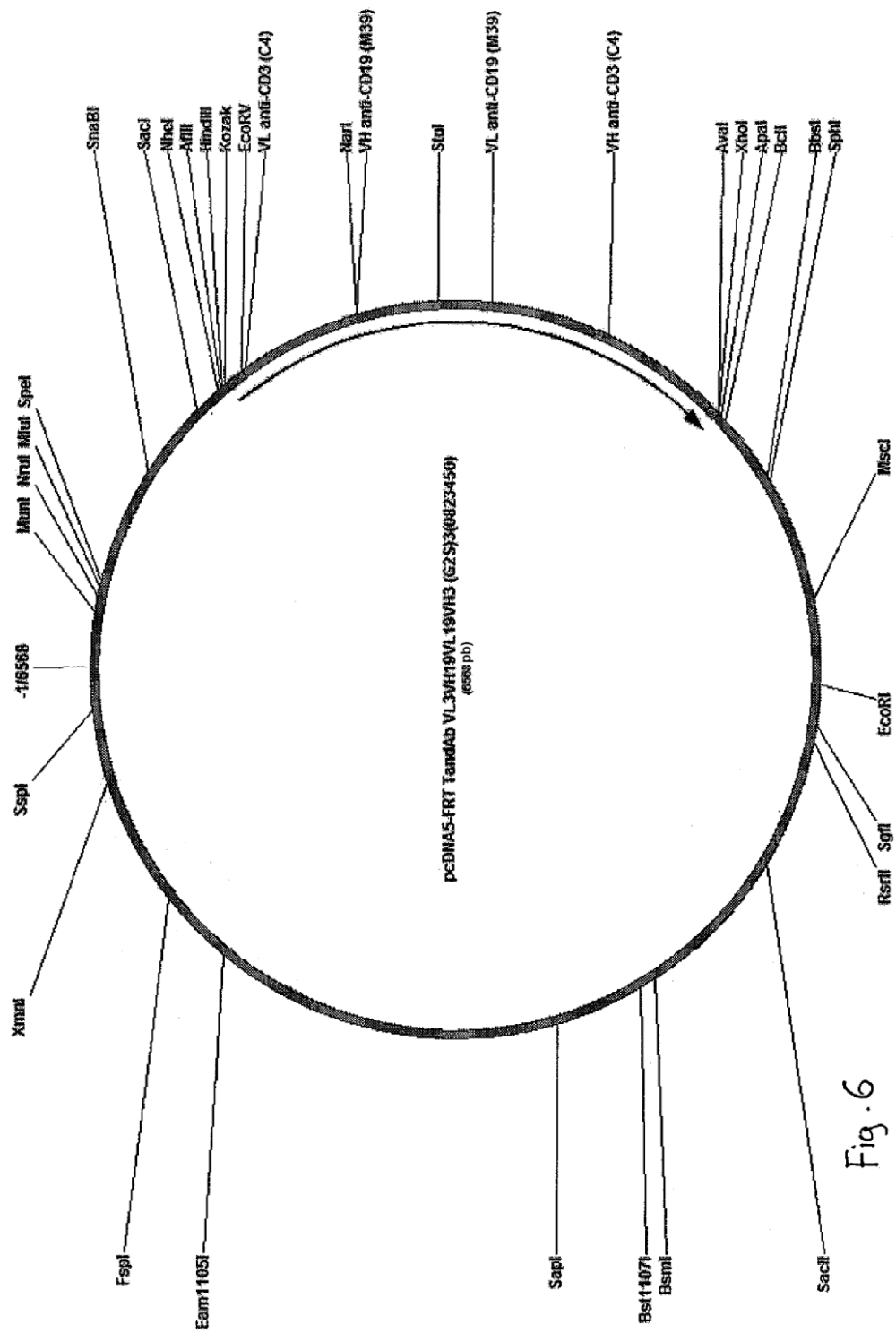


Fig. 6

