

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 716 823**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.11.2012 PCT/EP2012/072986**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.05.2013 WO13072523**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.11.2012 E 12787454 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.01.2019 EP 2780372**

54 Título: **Anticuerpos biespecíficos para uso médico**

30 Prioridad:

17.11.2011 US 201161560867 P

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

17.06.2019

73 Titular/es:

**JUNG, GUNDRAM (100.0%)
Schwabstrasse 30
72108 Rottenburg-Wendelsheim, DE**

72 Inventor/es:

GROSSE-HOVEST, LUDGER

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 716 823 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos biespecíficos para uso médico

La invención se refiere a un nuevo uso médico de un anticuerpo biespecífico que no tiene ninguna porción Fc o la tiene dañada y que tiene un sitio de fijación monovalente para un receptor de muerte y al menos un sitio de fijación para un antígeno de la superficie celular que se expresa sobre los linfocitos B, para la enfermedad autoinmunitaria dependiente de linfocitos B.

Antecedentes de la invención

CD95/Fas/Apo-1 es un receptor en la superficie celular capaz de inducir la muerte apoptótica de las células humanas. De un modo similar al ligando fisiológico de este receptor, CD95L, los anticuerpos agonistas contra CD95, pueden inducir la apoptosis si la fijación a CD95 se produce en un formato multimérico, p. ej., como la IgM pentamérica o la IgG3 autoagregante. Como alternativa, los anticuerpos anti-CD95 pueden ser reconocidos por los receptores de Fc de las células cercanas o por anticuerpos secundarios para conseguir la actividad agonista.

Dado que muchas células tumorales expresan el CD95, se ha perseguido vigorosamente el uso de los anticuerpos anti-CD95 agonistas para el tratamiento de tumores después de la caracterización inicial de los anticuerpos prototípicos contra CD95. Sin embargo, pronto resultó obvio que, al menos en la forma más simple de aplicarles a los pacientes los anticuerpos anti-CD95 agonistas o el CD95L recombinante, esta estrategia fracasa porque muchos tipos de células normales expresan el CD95 funcional y pueden acabar siendo destruidas por los anticuerpos agonistas.

El CD20 es un marcador de los linfocitos B implicado en muchos linfomas y enfermedades autoinmunitarias, p. ej., esclerosis múltiple (EM), artritis reumatoide (AR) y lupus sistémico eritematoso (LSE).

Los anticuerpos dirigidos contra CD20, el antígeno de superficie asociado a los linfocitos B, pueden actuar selectivamente sobre los linfocitos B normales, así como sobre los malignos. Se utilizan con éxito para el tratamiento del linfoma y de la leucemia dependiente de los linfocitos B, y la enfermedad autoinmunitaria mediada por anticuerpos, respectivamente. El rituximab (bajo los nombres comerciales Rituxan y MabThera) es un anticuerpo monoclonal quimérico contra la proteína CD20. El rituximab destruye los linfocitos B y, por lo tanto, se utiliza para tratar las enfermedades que se caracterizan por un número excesivo de linfocitos B, por hiperactividad de los linfocitos B o por disfuncionalidad de los linfocitos B. Esto incluye muchos linfomas, leucemias, rechazo del trasplante y algunos trastornos autoinmunitarios.

Sin embargo, el rituximab destruye inespecíficamente las células que expresan el CD20 y se demostró que era clínicamente eficaz en la EM, pero que está comprometido por los efectos secundarios (p. ej., leucoencefalopatía multifocal progresiva, LMP).

Se había demostrado con anterioridad que los fragmentos F(ab')₂ biespecíficos (bs-F(ab')₂) con especificidad por CD95 y destinados a diferentes antígenos sobre las células de linfoma, tales como CD20 y CD40, inducen la apoptosis de células que expresan el CD95 y el correspondiente antígeno destinatario. Pero no se destruían las células de linfoma que expresaban el CD95 sin expresar el antígeno diana (Jung et al. *Cancer Research* 61, 1846-1848 (2001)).

Herrmann et al. (*Cancer Research* 68 (4): 1221-7 (2008)) valoraron la influencia del formato del anticuerpo y la naturaleza del antígeno destinatario sobre la apoptosis selectiva mediada por el CD95 en las células tumorales.

Otz et al. (*Adv. Exp. Med. Biol.* 691: 797-798 (2011)) describen la estimulación restringida a las células destinatarias con el receptor de muerte CD95 (APO-1/Fas) con diferentes anticuerpos biespecíficos CD20xCD95.

Wischhusen et al. (*Journal of Neuroimmunology* 162: 28-42 (2005)) describen la apoptosis mediada por el receptor de muerte en las células de glioma maligno de humano a través de la modulación ejercida por el sistema CD40/CD40L. Los anticuerpos biespecíficos CD40xCD95 destruyen de manera específica las células de glioma, lo que revela la propiedad del CD40 endógeno a la hora de facilitar la señalización de muerte.

Silverman (*Frontiers in Bioscience* 12: 2194-2206 (2007)) explica el tratamiento con anti-CD20 y la enfermedad autoinmunitaria. En este artículo, se proporciona una visión general de los experimentos clínicos de reciente publicación y se debaten las perspectivas inmunobiológicas que son más relevantes para conocer las oportunidades y los desafíos especiales que plantean estas enfermedades.

Li et al. (*Arthritis & Rheumatism* 52(2): 573-581 (2005)) describen una nueva función de CD40 en la apoptosis dependiente de Fas que se observa en las células epiteliales en cultivo procedentes de pacientes con el síndrome de Sjögren (SS), lo que sugiere que la muerte de las células epiteliales salivales del SS requiere la cooperación tanto de Fas como de CD40.

Yonehara et al. (*Cytokine and Growth Factor Reviews* 13 (4-5): 393-402 (2002)) describen la preparación del anticuerpo monoclonal original contra el Fas humano con la actividad de muerte celular asociada y propone una estrategia de uso terapéutico para las enfermedades autoinmunitarias y para otras enfermedades.

La solicitud de patente internacional WO2002/066516 describe anticuerpos que se pueden fijar a dos miembros diferentes de la familia del factor de necrosis tumoral. Específicamente, la presente invención da a conocer anticuerpos que se fijan tanto al receptor TACI (que interacciona con el ligando ciclofilina modulador de calcio y activador transmembranario) y el receptor del antígeno de maduración de los linfocitos B (BCMA).

5 Tobón et al. (*Autoimmunity Reviews* 9: 224-228 (2010)) revisan los desenlaces clínicos de los pacientes con el síndrome de Sjögren tratados para reducirles los linfocitos B, específicamente los tratamientos con anti-CD20, los tratamientos con anti-CD22 y los tratamientos que actúan selectivamente sobre BAFF y APRIL.

Nalivaiko et al. (*Molecular Therapy* 24 (2): 298-205 (2016)) describen un anticuerpo biespecífico CD20XCD95 recombinante con una actividad superior contra los linfocitos B normales y malignos.

10 Daniel y Krammer (*Journal of Immunology* 152: 5623-5632 (2016)) describen que la activación induce la sensibilidad a la apoptosis mediada por APO-1 (CD95) en los linfocitos B de humano. Afirman que la apoptosis mediada por APO-1 en las células activadas por Ag puede contribuir a la regulación de la respuesta inmunitaria humoral.

15 Medina et al. (*Eur. J. Immunol.* 27: 700-706 (1997)) analizaron el efecto del Acm anti-CD95 sobre las células humanas capaces de secretar Ig de manera espontánea y a alta velocidad. La adición del Acm anti-CD95 CH11 a los linfocitos B de la amígdala inhibió el 50-60% de la secreción espontánea de Ig. Sus datos sugieren que la ligación del CD95 podría intervenir en la respuesta humoral humana de control al inducir la apoptosis en los linfocitos B maduros sensibles. La patente de los EE.UU. US2003/0232049A1 describe un reactivo multiespecífico para la estimulación selectiva de los receptores de la superficie celular. Se describe que las células cancerosas destruyen los anticuerpos biespecíficos, que consisten en fragmentos de anticuerpo que fijan el antígeno en los que hay un primer sitio de fijación para un receptor de superficie celular, tal como un receptor de muerte, p. ej., CD95, y un segundo sitio de fijación para un antígeno destinatario de la misma célula, tal como CD20 o CD40.

Compendio de la invención

El objetivo de la invención es dar a conocer una inmunoterapia selectiva de una enfermedad o trastorno que depende de los linfocitos B, específicamente, la enfermedad autoinmunitaria.

25 El objeto se resuelve mediante el contenido del tema que se reivindica.

De acuerdo con la invención, se da a conocer un anticuerpo biespecífico para ser usado en el tratamiento o la prevención de una enfermedad autoinmunitaria mediada por los linfocitos B, en donde el anticuerpo es un Fab₂ biespecífico que comprende dos fragmentos Fab con diferentes especificidades por un primer y un segundo antígenos, o en donde el anticuerpo comprende:

- 30 - un fragmento Fab que comprende un primer sitio de fijación para un primer antígeno;
- un fragmento scFv que comprende un segundo sitio de fijación para un segundo antígeno; y
- un dominio de CH₂, en donde el fragmento Fab y el fragmento scFv están conectados a través del dominio CH₂, en donde el primer antígeno es CD95 y el segundo antígeno es CD20 o CD40.

Específicamente, se da a conocer un anticuerpo biespecífico, en donde el segundo antígeno es CD20.

35 Específicamente, la enfermedad autoinmunitaria mediada por los linfocitos B se selecciona del grupo que consiste en lupus sistémico eritematoso, síndrome de Sjögren, esclerodermia, artritis reumatoide, artritis idiopática juvenil, enfermedad de injerto contra huésped, dermatomiositis, diabetes sacarina de tipo 1, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Graves, enfermedad de Addison, celiacía, enfermedad de Crohn, anemia perniciosa, pénfigo vulgar, vitíligo, anemia hemolítica autoinmunitaria, púrpura trombocitopénica idiopática, arteritis de células gigantes, miastenia grave, esclerosis múltiple (EM), preferiblemente EM con recaídas y remisiones (EMRR), glomerulonefritis, síndrome de Goodpasture, pénfigo vesicular, colitis ulcerosa, síndrome de Guillain-Barré, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, síndrome antifosfolípido, narcolepsia, sarcoidosis y granulomatosis de Wegener.

45 Específicamente, el sitio de fijación del anticuerpo biespecífico para ser usado tal como se describe en la presente memoria, que se fija al C20, comprende seis regiones determinantes de la complementariedad de los dominios variables de anticuerpo (CDR1 a CDR6), en donde

A)

i) CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos RASSSVSYM (SEQ ID 12);

ii) CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos APSNLAS (SEQ ID 13);

iii) CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos QQWSFNPT (SEQ ID 14);

- iv) CDR4 comprende la secuencia de aminoácidos SYNMH (SEQ ID 16);
- v) CDR5 comprende la secuencia de aminoácidos AIYPGNGDTSYNQKFKG (SEQ ID 17); y
- vi) CDR6 comprende la secuencia de aminoácidos VVYYSNSYWFYFDV (SEQ ID 18);

o

5 B) una variante funcionalmente activa del mismo, en donde al menos uno de

i) CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 70% con la secuencia de aminoácidos RASSSVSYM (SEQ ID 12);

ii) CDR2 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 70% con la secuencia de aminoácidos APSNLAS (SEQ ID 13);

10 iii) CDR3 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 70% con la secuencia de aminoácidos QQWSFNPPT (SEQ ID 14);

iv) CDR4 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 70% con la secuencia de aminoácidos SYNMH (SEQ ID 16);

15 v) CDR5 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 70% con la secuencia de aminoácidos AIYPGNGDTSYNQKFKG (SEQ ID 17); y/o

vi) CDR6 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 70% con la secuencia de aminoácidos VVYYSNSYWFYFDV (SEQ ID 18).

20 Específicamente, el anticuerpo biespecífico para ser usado tal y como se describe en la presente memoria comprende un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID 11 y un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID 15, o una variante humanizada funcionalmente activa del mismo.

Específicamente, la variante humanizada del anticuerpo biespecífico para ser usado tal y como se describe en la presente memoria comprende un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID 19 y un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID 20.

25 Específicamente, el sitio de fijación del anticuerpo para ser usado tal y como se describe en la presente memoria, que se fija al CD95, comprende seis regiones determinantes de la complementariedad de los dominios variables de anticuerpo (CDR1 a CDR6), en donde

A)

i) CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos RASESVEYYGTSLMQ (SEQ ID 2);

ii) CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos VASNVES (SEQ ID 3);

30 iii) CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos QQSTKVPWT (SEQ ID 4);

iv) CDR4 comprende la secuencia de aminoácidos TNAMN (SEQ ID 6);

v) CDR5 comprende la secuencia de aminoácidos RIRSKSNNYATYYAESVKD (SEQ ID 7); y

vi) CDR6 comprende la secuencia de aminoácidos DGY Y (SEQ ID 8);

o

35 B) una variante funcionalmente activa del mismo, en donde al menos una de

i) CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 70% con la secuencia de aminoácidos RASESVEYYGTSLMQ (SEQ ID 2);

ii) CDR2 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 70% con la secuencia de aminoácidos VASNVES (SEQ ID 3);

40 iii) CDR3 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 70% con la secuencia de aminoácidos QQSTKVPWT (SEQ ID 4);

iv) CDR4 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 70% con la secuencia de aminoácidos TNAMN (SEQ ID 6);

v) CDR5 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 70% con la secuencia de aminoácidos RIRSKSNNYATYYAESVKD (SEQ ID 7); y/o

5 vi) CDR6 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 70% con la secuencia de aminoácidos DGYG (SEQ ID 8).

Específicamente, el anticuerpo biespecífico para ser usado tal y como se describe en la presente memoria comprende un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID 1 y un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID 5, o una variante humanizada funcionalmente activa del mismo.

10 Específicamente, la variante humanizada del anticuerpo biespecífico para ser usado tal y como se describe en la presente memoria comprende un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID 9 y un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID 10.

15 Específicamente, el anticuerpo biespecífico para ser usado tal y como se describe en la presente memoria comprende una secuencia de cadena ligera de SEQ ID 21 y una secuencia de cadena pesada de SEQ ID 22, o una variante humanizada funcionalmente activa del mismo.

Específicamente, la variante humanizada del anticuerpo biespecífico para ser usada tal y como se describe en la presente memoria comprende una secuencia de cadena ligera de SEQ ID 24 y una secuencia de cadena pesada de SEQ ID 25.

20 Específicamente, el anticuerpo biespecífico para ser usado tal y como se describe en la presente memoria se fija a CD20 con una $K_d < 10^{-8}$ M y/o que se une a CD95 con una $K_d < 10^{-8}$ M.

Según una realización específica de la invención dada a conocer en la presente memoria, el anticuerpo biespecífico descrito en la presente memoria se utiliza en una politerapia con otro tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria mediada por linfocitos B, preferiblemente una politerapia con un tratamiento con citocinas o un tratamiento con otros formatos de anticuerpo o agentes.

25 Específicamente, en la presente memoria se da a conocer un formato de anticuerpo biespecífico desprovisto de una porción Fc activa que comprende un sitio de fijación monovalente para un receptor de muerte y al menos un sitio de fijación para un antígeno de superficie celular expresado sobre los linfocitos B, para ser usado en el tratamiento o la prevención de un trastorno por linfocitos B autorreactivos.

Específicamente, el formato de anticuerpo comprende una estructura como la representada en la figura 1B.

30 En concreto el receptor de muerte se selecciona del grupo que consiste en CD95, los receptores de TRAIL y los receptores del TNF, preferiblemente el CD95.

Específicamente, el antígeno de superficie celular se selecciona del grupo que consiste en CD20 y CD40, preferiblemente CD20.

35 Según una realización específica, el formato comprende un sitio de fijación monovalente que se fija específicamente a CD95 y al menos un sitio de fijación que se fija específicamente a CD20 o CD40.

Según un aspecto específico, el trastorno por linfocitos B autorreactivos está ocasionado por una respuesta inmunitaria aberrante, excesiva o indeseada. Específicamente, la enfermedad a tratar está ocasionada por linfocitos B normales activados en vez de por linfocitos B malignos.

40 El uso del anticuerpo biespecífico tal y como se da a conocer en la presente memoria está relacionado de manera específica con la lucha contra los linfocitos B autorreactivos y el tratamiento o la prevención de los estados patológicos relacionados con ellos. La leucemia y el linfoma derivados de linfocitos B, al igual que cualquier otro cáncer, están asociados a una producción excesiva de linfocitos B y a estados patológicos relacionados sin tener en cuenta la especificidad ni reactividad de los linfocitos B. Por lo tanto, la prevención y el tratamiento de tal leucemia, linfoma o cáncer queda específicamente excluido del tratamiento de la enfermedad dado a conocer en la presente memoria.

45 Específicamente, el trastorno por linfocitos B autorreactivos es un trastorno autoinmunitario, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjögren, esclerodermia, artritis reumatoide, artritis idiopática juvenil, enfermedad de injerto contra huésped, dermatomiositis, diabetes sacarina de tipo 1, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Graves, enfermedad de Addison, celiaquía, enfermedad de Crohn, anemia perniciosa, pénfigo vulgar, vitiligo, anemia hemolítica autoinmunitaria, púrpura trombocitopénica idiopática, arteritis de células gigantes, miastenia grave, esclerosis múltiple (EM), preferiblemente EM con recaídas y remisiones (EMRR), glomerulonefritis, síndrome de Goodpasture, pénfigo vesicular, colitis ulcerosa, síndrome de Guillain-Barré, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, síndrome antifosfolípido, narcolepsia, sarcoidosis y

granulomatosis de Wegener.

5 Según un aspecto específico, el formato del anticuerpo biespecífico es una molécula recombinante que comprende al menos 2 dominios de anticuerpo, preferiblemente al menos 3, 4, 5, 6, 7 u 8 dominios de anticuerpo y, optativamente, una región bisagra. Un formato de anticuerpo biespecífico recombinante preferido está representado en la figura 1B. Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo pueden comprender o consistir en tales dominios de anticuerpo y región bisagra, preferiblemente anticuerpos monoclonales, fragmentos de anticuerpos monoclonales y otros formatos de anticuerpo monoclonal, que comprenden la secuencia de aminoácidos nativa, o bien que comprenden una o varias mutaciones de la secuencia de aminoácidos, la estructura terciaria y, optativamente, la glucosilación, p. ej., para mejorar la especificidad, la afinidad y/o la avidéz de fijación a una diana, o para mejorar la estabilidad del formato o para incrementar la capacidad de producción de la molécula recombinante.

10 Específicamente, los dominios de anticuerpo tienen su origen en los mamíferos, tal como roedor, p. ej., origen murino, o humano, o dominios de anticuerpo quiméricos o humanizados con origen en un mamífero diferente al humano, tal como dominios de anticuerpo de camélidos o murinos humanizados.

15 El formato de anticuerpo biespecífico comprende específicamente al menos 2 sitios de fijación formados por regiones determinantes de la complementariedad (CDR), preferiblemente las CDR procedentes de los dominios de anticuerpo seleccionados del grupo que consiste en VH y parejas de dominios VH/VL, preferiblemente al menos uno o dos dominios VH y/o al menos una o dos parejas de dominios VH/VL.

20 Específicamente, el formato comprende al menos uno de un sitio de fijación VH/VL y/o un sitio de fijación scFv y, optativamente, al menos uno de un dominio constante de anticuerpo, específicamente un dominio CH1, CL, CH2 o CH3.

Según una realización preferida, el formato comprende al menos una pareja de dominios de anticuerpo VH/VL y al menos un sitio de fijación scFv, optativamente con cualquiera de los dominios constantes, que específicamente incluyen los dominios CH2, CH1 y CL, que se utilizan preferiblemente como un conector entre los dominios variables que incorporan los sitios de fijación específicos.

25 Según otra realización preferida, el formato comprende al menos dos dominios de anticuerpo VH únicos, preferiblemente dominios VHH únicos.

Específicamente, el formato se selecciona del grupo que consiste en scFv, una combinación de un fragmento Fab o F(ab')₂ con uno o varios dominios variables de anticuerpo, F(ab')₂ y combinaciones de los mismos, que emplean preferiblemente al menos un dominio constante de anticuerpo a modo de conector.

30 Según una realización específica, el formato es una construcción que comprende o que consiste en

a) un fragmento Fab que consiste en una pareja de dominios VL/VH y una pareja de dominios CL/CH1, en donde el fragmento Fab comprende el primer sitio de fijación;

b) un scFv que consiste en los dominios de VH/VL unidos entre sí; y

c) un dominio CH2 que conecta el dominio CH1 del fragmento Fab de a) al dominio VH del scFv de b).

35 Según otra realización específica, se da a conocer un formato de anticuerpo biespecífico para ser usado tal y como se describe en la presente memoria, que comprende o consiste en

- un fragmento Fab que comprende un primer sitio de fijación para un primer antígeno;

- un fragmento scFv que comprende un segundo sitio de fijación para un segundo antígeno; y

40 - un dominio CH2, en donde el fragmento Fab y el fragmento scFv están conectados a través del dominio CH2, en donde

a) el primer antígeno es CD95 y el segundo antígeno se selecciona de CD20 y CD40, preferiblemente CD20; o

b) el primer antígeno se selecciona de CD20 y CD40, preferiblemente CD20, y el segundo antígeno es CD95.

En concreto el sitio de fijación que se fija a CD20 comprende seis regiones determinantes de la complementariedad de los dominios variables de anticuerpo (CDR1 a CDR6), en donde

45 A)

i) CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos RASSSVSYM (SEQ ID 12);

ii) CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos APSNLAS (SEQ ID 13);

iii) CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos QQWSFNPPT (SEQ ID 14);

iv) CDR4 comprende la secuencia de aminoácidos SYNMH (SEQ ID 16);

v) CDR5 comprende la secuencia de aminoácidos AIYPGNGDTSYNQKFKG (SEQ ID 17); y

vi) CDR6 comprende la secuencia de aminoácidos VVYYSNSYWFYFDV (SEQ ID 18);

5 o

B) una variante funcionalmente activa del mismo, en donde al menos uno de

i) CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 70% con la secuencia de aminoácidos RASSSVSYM (SEQ ID 12), o al menos el 80% o al menos el 90%;

10 ii) CDR2 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 70% con la secuencia de aminoácidos APSNLAS (SEQ ID 13), o al menos el 80% o al menos el 90%;

iii) CDR3 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 70% con la secuencia de aminoácidos QQWSFNPPT (SEQ ID 14), o al menos el 80% o al menos el 90%;

iv) CDR4 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 70% con la secuencia de aminoácidos SYNMH (SEQ ID 16), o al menos el 80% o al menos el 90%;

15 v) CDR5 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 70% con la secuencia de aminoácidos AIYPGNGDTSYNQKFKG (SEQ ID 17), o al menos el 80% o al menos el 90%; y/o

vi) CDR6 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 70% con la secuencia de aminoácidos VVYYSNSYWFYFDV (SEQ ID 18), o al menos el 80% o al menos el 90%.

20 Específicamente, se contempla en la presente memoria el uso de cualquier formato de anticuerpo que comprende un sitio de fijación a CD20 procedente de las secuencias A i) a vi) de más arriba, p. ej., las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera y/o las secuencias de CDR4, CDR5 y CDR6 de la región variable de la cadena pesada, incluidas las construcciones que comprenden dominios variables únicos que comprenden cualquiera de la combinación de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, o la combinación de las secuencias de CDR4, CDR5 y CDR6, o parejas de tales dominios variables únicos, p. ej. VH, VHH o las parejas de los dominios VH/VL.

25 Las realizaciones específicas se refieren al formato de anticuerpo que comprende al menos una de las secuencias de CDR de A, preferiblemente al menos dos o al menos tres, y al menos una de las secuencias de CDR de B.

Otras realizaciones específicas se refieren al formato de anticuerpo que comprende al menos una de las secuencias de CDR de B, preferiblemente al menos dos o al menos tres, y al menos una de las secuencias de CDR de A.

30 La realizaciones específicas se refieren al uso de una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de CDR1 de A i), la secuencia de CDR2 de A ii) y la secuencia de CDR3 de A iii), y una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de CDR4 de A iv) o B iv), la secuencia de CDR5 de A v) o B v) y la secuencia de CDR6 de A vi) o B vi), en donde al menos una de las secuencias de CDR4, CDR5 y CDR6 comprende una variante funcionalmente activa de B.

35 Otras realizaciones específicas se refieren al uso de una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de CDR4 de A iv), la secuencia de CDR5 de A v) y la secuencia de CDR6 de A vi), y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de CDR1 de A i) o B i), la secuencia de CDR2 de A ii) o B ii) y la secuencia de CDR3 de A iii) o B iii), en donde al menos una de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 comprende una variante funcionalmente activa de B.

40 Una variante de B comprende optativamente la secuencia específica de CDR como la que se recoge en la lista, que contiene una, dos o tres mutaciones puntuales, p. ej., por inserción, delección, sustitución o modificación química de un resto de aminoácido.

Las variantes de un aglutinador de CD20 se consideran variantes funcionalmente activas si se fijan a CD20, específicamente a CD20 de humano, específicamente con una gran afinidad, p. ej., con una $K_d < 10^{-8}$ M.

45 Otras variantes funcionalmente activas tienen actividad funcional que actúa selectivamente sobre los linfocitos B activados, p. ej., la actividad apoptótica, según se determina en una prueba que se describe en los ejemplos.

Según una realización específica, el formato de anticuerpo comprende un dominio VL que comprende o consiste en

la secuencia de aminoácidos de SEQ ID 11 y/o un dominio VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID 15, o variantes funcionalmente activas del mismo.

5 Específicamente, la variante es una variante humanizada que comprende un dominio VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID 19 y/o un dominio VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID 20, o una variante funcionalmente activa del mismo.

Específicamente, el sitio de fijación que se fija a CD95 comprende seis regiones determinantes de la complementariedad de los dominios variables de anticuerpo (CDR1 a CDR6), en donde

A)

i) CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos RASESVEYYGTSLMQ (SEQ ID 2);

10 ii) CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos VASNVES (SEQ ID 3);

iii) CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos QQSTKVPWT (SEQ ID 4);

iv) CDR4 comprende la secuencia de aminoácidos TNAMN (SEQ ID 6);

v) CDR5 comprende la secuencia de aminoácidos RIRSKSNNYATYYAESVKD (SEQ ID 7); y

vi) CDR6 comprende la secuencia de aminoácidos DGYG (SEQ ID 8);

15 o

B) una variante funcionalmente activa del mismo, en donde al menos uno de

i) CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 70% con la secuencia de aminoácidos RASESVEYYGTSLMQ (SEQ ID 2), o al menos el 80% o al menos el 90%;

20 ii) CDR2 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 70% con la secuencia de aminoácidos VASNVES (SEQ ID 3), o al menos el 80% o al menos el 90%;

iii) CDR3 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 70% con la secuencia de aminoácidos QQSTKVPWT (SEQ ID 4), o al menos el 80% o al menos el 90%;

iv) CDR4 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 70% con la secuencia de aminoácidos TNAMN (SEQ ID 6), o al menos el 80% o al menos el 90%;

25 v) CDR5 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 70% con la secuencia de aminoácidos RIRSKSNNYATYYAESVKD (SEQ ID 7), o al menos el 80% o al menos el 90%; y/o

vi) CDR6 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 70% con la secuencia de aminoácidos DGYG (SEQ ID 8), o al menos el 80% o al menos el 90%.

30 Se contempla específicamente en la presente memoria el uso de cualquier formato de anticuerpo que comprende un sitio de fijación de CD95 derivado de las secuencias A i) a vi) de más arriba, p. ej., las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera y/o las secuencias de CDR4, CDR5 y CDR6 de la región variable de la cadena pesada, que incluyen las construcciones que comprenden dominios variables únicos que comprenden cualquiera de las combinaciones de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, o la combinación de las secuencias de CDR4, CDR5 y CDR6, o las parejas de tales dominios variables únicos, p. ej., VH, VHH o las parejas de dominios VH/VL.

Las realizaciones específicas se refieren al formato de anticuerpo que comprende al menos una de las secuencias de CDR de A, preferiblemente al menos dos o al menos tres, y al menos una de las secuencias de CDR de B.

Otras realizaciones específicas se refieren al formato de anticuerpo que comprende al menos una de las secuencias de CDR de B, preferiblemente al menos dos o al menos tres, y al menos una de las secuencias de CDR de A.

40 Las realizaciones específicas se refieren al uso de una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de CDR1 de A i), la secuencia de CDR2 de A ii) y la secuencia de CDR3 de A iii), y una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de CDR4 de A iv) o B iv), la secuencia de CDR5 de A v) o B v) y la secuencia de CDR6 de A vi) o B vi), en donde al menos una de las secuencias de CDR4, CDR5 y CDR6 comprende una variante funcionalmente activa de B.

45 Otras realizaciones específicas se refieren al uso de una región variable de la cadena pesada que comprende la

secuencia de CDR4 de A iv), la secuencia de CDR5 de A v) y la secuencia de CDR6 de A vi), y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de CDR1 de A i) o B i), la secuencia de CDR2 de A ii) o B ii) y la secuencia de CDR3 de A iii) o B iii), en donde al menos una de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 comprende una variante funcionalmente activa de B.

- 5 Una variante de B comprende optativamente la secuencia de CDR específica tal y como está en la lista, que contiene una, dos o tres mutaciones puntuales, p. ej., por inserción, delección, sustitución o modificación química de un resto de aminoácido.

Las variantes de una molécula que se fija a CD95 se consideran variantes funcionalmente activas si la fijación a CD95, específicamente al CD95 de humano, en particular con una gran afinidad, p. ej., con una $K_d < 10^{-8}$ M.

- 10 Otras variantes funcionalmente activas tienen actividad funcional que actúa selectivamente sobre los linfocitos B activados, p. ej., la actividad apoptótica, según se determina en una prueba como la descrita en los ejemplos.

Según una realización específica, el formato de anticuerpo comprende un dominio VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID 1 y/o un dominio VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID 5, o variantes funcionalmente activas de los mismos.

- 15 Específicamente, la variante es una variante humanizada que comprende un dominio VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID 9 y/o un dominio VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID 10, o una variante funcionalmente activa de la misma.

- 20 Según una realización específica, el formato de anticuerpo comprende o consiste en una secuencia de la cadena ligera de SEQ ID 21 y una secuencia de la cadena pesada de SEQ ID 22, o variantes funcionalmente activas de los mismos.

Específicamente, la variante es una variante humanizada que comprende un dominio VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID 24 y/o un dominio VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID 25, o una variante funcionalmente activa de la misma.

- 25 El formato del anticuerpo biespecífico descrito en la presente memoria comprende específicamente secuencias murinas, quiméricas, humanizadas y/o humanas.

Preferiblemente, el formato del anticuerpo biespecífico se fija a un antígeno seleccionado de CD20 y CD40, preferiblemente CD20, con una $K_d < 10^{-8}$ M y/o se fija a CD95 con una $K_d < 10^{-8}$ M.

Una construcción de ejemplo es una cadena única de Fab biespecífico recombinante (bsFabXsc) con especificidad por CD20XCD95 que se describe esquemáticamente en la figura 1B. Se denomina NA-C20.

- 30 Específicamente, el formato carece de una porción Fc o comprende una porción Fc manipulada genéticamente para inactivar o reducir su función efectora de Fc, preferiblemente mediante una o varias mutaciones en la porción Fc. Las mutaciones de ejemplo para la reducción de la función efectora de Fc se encuentran en la región de fijación al receptor Fc γ del fragmento Fc del anticuerpo, preferiblemente en la región del extremo amino de CH2. Se pueden hacer las mutaciones por ingeniería molecular y/o ingeniería química. Las mutaciones preferidas son mutaciones puntuales en la secuencia de aminoácidos, p. ej., inserciones y/o delecciones y/o sustituciones. Otras mutaciones preferidas son por modificación química de los aminoácidos.

La inactivación o reducción de la función efectora de Fc se puede determinar mediante un ensayo idóneo para determinar la actividad de ADCC y/o CDC debida al formato de anticuerpo. Los resultados se comparan con la actividad de la correspondiente molécula de tipo silvestre.

- 40 Específicamente, el formato puede derivarse de un anticuerpo de la clase IgG, en particular, cualquiera de las subclases de IgG1, IgG2 o IgG4, que comprende específicamente las secuencia procedentes de un anticuerpo de tipo IgG de humano.

Específicamente, el formato puede derivarse de un anticuerpo de tipo IgG de humano.

- 45 Según una realización específica, el formato de anticuerpo biespecífico descrito en la presente memoria se da a conocer para ser usado en una politerapia con otro tratamiento de un trastorno por linfocitos B autorreactivos, preferiblemente una politerapia con tratamiento con citocinas, tal como interferón, en particular el interferón β , o el tratamiento con cualquier otro formato de anticuerpo o agentes.

- 50 Específicamente, el formato de anticuerpo biespecífico para ser usado según está descrito en la presente memoria se administra a un sujeto que lo necesita en una cantidad terapéuticamente eficaz, preferiblemente dado a conocer en una formulación para el uso parenteral, p. ej., formulación intravenosa o subcutánea, en particular en una preparación farmacéutica que comprende el formato de anticuerpo y, optativamente, un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Según un aspecto específico, se da a conocer un método para el tratamiento o la prevención de un trastorno por linfocitos B autorreactivos que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz del formato de anticuerpo biespecífico desprovisto de una porción Fc activa que comprende un sitio de fijación monovalente para un receptor de muerte y al menos un sitio de fijación para un antígeno de superficie celular expresado en los linfocitos B.

Específicamente, tal método para el tratamiento o la prevención de un trastorno por linfocitos B autorreactivos se caracteriza por las realizaciones relacionadas con el uso médico, tal y como se describe en la presente memoria.

Según otro aspecto específico, se da a conocer un método para el tratamiento de los linfocitos B autorreactivos, que comprende poner en contacto dichas células con una composición que comprende el formato de anticuerpo biespecífico descrito en la presente memoria. Tal método de tratamiento puede ser *in vivo* o *ex vivo*.

Específicamente, el formato de anticuerpo biespecífico tiene por diana un receptor de muerte y un antígeno de superficie celular que se expresan en dichas células, gracias a lo cual se inhibe la producción de IgG desde dichas células y, optativamente, se consigue la apoptosis de dichas células.

Figuras

Figura 1: Descripción esquemática de dos formatos de anticuerpo de ejemplo: Dos formatos diferentes de anticuerpos biespecíficos CD20XCD95 para la estimulación selectiva del receptor de muerte CD95 de la superficie de los linfocitos B normales, activados o malignos que expresan tanto CD20 como CD95.

Figura 1A: fragmento (Fab')₂ biespecífico hibridado químicamente (también denominado en la presente memoria bsFab₂). Los fragmentos Fab₂ biespecíficos se prepararon tal y como está descrito en Jung et al. *Eur. J. Immunol.* 21: 2431, 1991. Los anticuerpos originales que se utilizaron para la hibridación química fueron el anticuerpo anti-CD20 rituximab (Roche) autorizado para el tratamiento del linfoma maligno derivado de los linfocitos B y el anticuerpo anti-CD95 Apo-1 purificado del sobrenadante de las células de hibridoma cultivadas. Como alternativa, el anticuerpo Apo-1 se puede comprar a eBioscience, San Diego, CA 92121, en su forma purificada (BMS151).

Figura 1B: cadena única de Fab biespecífico recombinante (también denominado en la presente memoria bsFabXsc o NA-C20). NA-C20 contiene un Fab, que está conectado a un scFv por medio de un dominio CH2 monomérico que actúa de conector.

La secuencia de este formato de anticuerpo, que incluye la de los anticuerpos contra CD20 (2H7, murino y humanizado) y contra CD95 (murino y humanizado) se dan a conocer en la figura 9E. La construcción genética que codifica el anticuerpo se transfirió de manera estable en las células Sp2/0 mediante el uso de las técnicas estándares. La proteína se purificó desde los sobrenadantes de las células transfectadas mediante el uso de la cromatografía de afinidad con selección por κ, comprado a GE-Healthcare, Life Sciences, Friburgo, Alemania.

Figura 2: Expresión de CD95 en los linfocitos B de humano activados con 1 µg/ml de PWM.

Las células mononucleares de la sangre periférica (CMSP) de un donante sano normal, aisladas por centrifugación en gradiente de densidad, se incubaron con el mitógeno de la hierba carmesí (PWM, 1 µg/ml, Sigma Aldrich, Taufkirchen, Alemania) durante 6 días y luego se lavaron. En los momentos indicados, las células se retiraron de los matraces de cultivo y se analizaron mediante citometría de flujo. Con este fin, las células se tiñeron con un anticuerpo contra CD19 o un anticuerpo de control de isotipo conjugado a azul pacífico, un anticuerpo contra CD95 conjugado a alofocianina (APC) y el colorante 7-aminoactinomicina D (7-AAD) para identificar con claridad las células viables. Se recogieron las células viables que expresan CD19 y se las analizó. Los anticuerpos se compraron a Biolegend, San Diego, CA92121. Se obtuvieron perfiles brillantes con los perfiles oscuros de un control de isotipo con el anticuerpo contra CD95.

Conclusión: Aunque CD95 no es detectable en los linfocitos B en reposo, su expresión sube al cabo de 1 día de estimulación con PWM, alcanza su máximo el día tres y permanece alto hasta el día 10 a pesar del lavado de las células el día 6.

Figura 3: Cinética de la producción de IgG desde los linfocitos B activados con PWM.

Las CMSP normales se estimularon con PWM (1 µg/ml). Transcurridos determinados periodos de tiempo, se retiraron alícuotas del sobrenadante de cultivo y se les analizó por ELISA el contenido de IgG de humano. La estimulación de las CMSP con el PWM (círculo relleno) induce la producción de la IgG de humano. La producción de anticuerpos se vuelve detectable el día 4 y sube continuamente hasta el día 10. La medición de la producción de anticuerpos de las CMSP sin estimular (círculo hueco) sirve de control.

Conclusión: La producción de IgG se vuelve detectable después de 5 días de estimulación con PWM y sube continuamente hasta el día 10.

Figura 4: Reducción de los linfocitos B CD19+ y de linfocitos T cooperadores/citolíticos naturales CD4+/CD8+ desde las CMSP sin estimular

Las CMSP sin estimular se incubaron durante 4 días con los anticuerpos indicados (1 µg/ml), se lavaron y se analizaron por citometría de flujo con un anticuerpo contra CD19 conjugado a azul pacífico, un anticuerpo contra CD4 conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC), un anticuerpo contra CD8 conjugado a la APC y el colorante de viabilidad 7-AAD (Biolegend, San Diego, CA92121). El NA-C20 es un anticuerpo biespecífico recombinante descrito en la figura 1B.

Conclusión: Ninguno de los anticuerpos indicados afecta a los linfocitos T ni a los linfocitos B en los cultivos de las CMSP sin estimular.

Figura 5: Reducción de los linfocitos B CD19+ y de los linfocitos T cooperadores/citolíticos naturales CD4+/CD8+ de las CMSP estimuladas

Las CMSP se estimularon durante 6 días con el mitógeno de la hierba carmesí (PWM, Sigma-Aldrich, 1 µg/ml), se lavaron, y se incubaron durante 4 días con los anticuerpos indicados (1 µg/ml). Las células se analizaron por citometría de flujo el día 10 tal y como se describe en la figura 4. El NA-C20 es el anticuerpo biespecífico recombinante en el formato bsFabXsc descrito en la figura 1B.

Conclusión: Los dos anticuerpos biespecíficos CD20XCD95 inducen la reducción de los linfocitos B en las CMSP estimuladas con PWM. Los linfocitos T no se ven afectados. Se revela ineficaz un anticuerpo de control hibridado por medios químicos con especificidad por MycXCD95.

Figura 6: Supresión de la producción de anticuerpos *in vitro*:

Las células mononucleares de la sangre periférica (CMSP) de humano se aislaron de sangre heparinizada por centrifugación en gradiente de densidad, se inocularon a 1×10^6 células/ml en placas de 6 pocillos y se estimularon con una lectina (el mitógeno de la hierba carmesí (PWM, 1 µg/ml, Sigma Aldrich)). El día 6, se lavaron las células y se les añadieron los anticuerpos indicados. El día 10, la cantidad de IgG de humano en el sobrenadante se midió por ELISA. El NA-C20 es el anticuerpo biespecífico recombinante en el formato bsFabXsc descrito en la figura 1B.

Conclusión: ambos anticuerpos biespecíficos CD20XCD95 suprimen la producción de IgG desde las CMSP humanas estimuladas. Un anticuerpo de control hibridado por medios químicos con especificidades de MycXCD95 no lo hace.

Figura 7: El anticuerpo biespecífico participó en la supresión de la síntesis de IgG *in vitro* inducida por el PMW. Las células mononucleares de la sangre periférica (CMSP) de humano de tres donantes sanos diferentes (7A-7C) se aislaron de la sangre heparinizada mediante centrifugación en gradiente de densidad, se inocularon a 1×10^6 células/ml en placas de 6 pocillos y se estimularon con una lectina (el mitógeno de la hierba carmesí (PWM, 1 µg/ml, Sigma Aldrich)). El día 6, se lavaron las células y se les añadieron los anticuerpos F(ab')₂ biespecíficos (a saber, el formato de anticuerpo F(ab')₂). El día 10, se midió por ELISA la cantidad de IgG de humano en el sobrenadante. Los anticuerpos biespecíficos analizados eran los de especificidad selectiva CD20XCD95 (círculo relleno) o bien CD40xCD95 (triángulos). A modo de comparación, se analizó en paralelo un anticuerpo biespecífico (a saber, el formato de anticuerpo F(ab')₂) con una especificidad por una diana que no tienen ninguna relación, a saber, la proteína myc intracelular (MycXCD95) (círculo hueco).

Conclusión:

Los anticuerpos Fab₂ biespecíficos con la especificidad CD20XCD95 o CD40xCD95 suprimen la producción de IgG desde los linfocitos B activados de humano *in vitro*, pero los anticuerpos con la especificidad MycXCD95 no la suprimen.

Figura 8: Supresión de la producción específica de IgG contra la toxina del tétanos

Las CMSP de un donante recién vacunado con la toxina del tétanos se estimularon con la toxina del tétanos (25 ng/ml, Calbiochem, Merck Darmstadt, Alemania) durante 4 días, se lavaron, y se incubaron con los anticuerpos indicados (1 µg/ml) durante 8 días. El día 12, la cantidad de anticuerpos antitetánicos específicos se determinó por ELISA. El NA-C20 es el anticuerpo biespecífico CD20XCD95 recombinante en el formato bsFabXsc descrito en la figura 1B.

Conclusión: El anticuerpo biespecífico CD20XCD95 recombinante NA-C20 y el anticuerpo anti-CD20 mono específico Rituxan suprimen *in vitro* la producción de los anticuerpos específicos contra la toxina del tétanos. Han resultado ineficaces los anticuerpos correspondientes con especificidades deseadas sin ninguna relación dirigidos contra el receptor de EGF (Erbix) y un proteoglicano asociado al melanoma (NA-CMel), respectivamente.

Figura 9: Secuencia de formatos de anticuerpo de ejemplo a los que se hace referencia en los ejemplos.

Figura 9A: Secuencia de VL y VH de ratón (SEQ ID 1 y 5, respectivamente) de un formato de anticuerpo con un sitio de fijación dirigido contra CD95, donde las secuencias de las CDR están subrayadas (CDR1, CDR2, CDR3 de la VL: SEQ ID n.ºs 2 a 4; CDR1, CDR2, CDR3 de la VH: SEQ ID n.ºs 6 a 8).

Figura 9B: Secuencia de VL y VH (SEQ ID 9 y 10, respectivamente) de un formato de anticuerpo con un sitio de fijación dirigido contra CD95 (humanizado), donde las secuencias de la CDR están subrayadas.

Figura 9C: Secuencia de VL y VH (SEQ ID 11 y 15, respectivamente) de un formato de anticuerpo con un sitio de fijación dirigido contra CD20 (murino, procedente del anticuerpo 2H7 que se describe en Liu et al. *The Journal of Immunology* 139, 3521-3526 (1987), acceso al NCBI M17953 y M17954), la secuencia de las CDR está subrayada (CDR1, CDR2, CDR3 de VL: SEQ ID 12 a 14; CDR1, CDR2, CDR3 de VH: SEQ ID 16 a 18).

5 Figura 9D: Secuencia de VL y VH (SEQ ID 19 y 20, respectivamente) de un formato de anticuerpo con un sitio de fijación dirigido contra CD20 (humanizado, derivado del anticuerpo 2H7), donde las secuencias de las CDR están subrayadas.

10 Figura 9E: formatos de anticuerpo biespecífico CD95XCD20 de ejemplo, versiones quiméricas y humanizadas: SEQ ID 21: cadena ligera de la versión quimérica; SEQ ID 22: cadena pesada de la versión quimérica; SEQ ID 23: secuencia conectora; SEQ ID 24: cadena ligera de la versión humanizada; SEQ ID 25: cadena pesada de la versión humanizada.

Descripción detallada de la invención

15 El término «formato de anticuerpo», tal y como se utiliza en la presente memoria, se referirá a los polipéptidos o proteínas que consisten en o comprenden dominios de anticuerpo, que se sabe que son dominios constantes y/o variables de las cadenas pesada y/o ligera de las inmunoglobulinas. La definición hace referencia de manera específica a los dominios de las cadenas ligera y pesada de la región variable (tales como dAb, Fd, VL, Vk, VH, VHH) y la región constante o los dominios individuales de un anticuerpo intacto, tales como CH1, CH2, CH3, CH4, CI y Ck. Vk o V λ se entienden como VL, el dominio variable de la cadena ligera, κ o λ ; de igual forma, CI o Ck es el dominio CL κ o λ . Se entiende expresamente que una referencia a un dominio de anticuerpo tal y como se utiliza en la presente memoria se refiere a cualquier tipo o variante de tal dominio de anticuerpo. Así pues, cualquier referencia a un dominio VH, tal y como se utiliza en la presente memoria, se entiende que abarca cualquier tipo de dominio VH, que incluye el VHH.

20 Los dominios de anticuerpo pueden ser de estructura nativa o pueden estar modificados por mutagénesis o modificación química, p. ej., para modificar las propiedades de fijación al antígeno o cualquier otra propiedad, tal como las propiedades funcionales o de estabilidad, tales como la fijación a los receptores de Fc FcRn y/o al receptor Fc γ . Las secuencias polipeptídicas se considera que son dominios de anticuerpo, si comprenden una estructura en barril β que consiste en al menos dos hojas β de una estructura del dominio de anticuerpo conectadas por una secuencia de lazo.

25 El término «formato de anticuerpo» se referirá específicamente a los polipéptidos o proteínas que pueden exhibir propiedades de fijación mono-, bi- o multispecíficas, o mono-, bi- o multivalentes, preferiblemente al menos dos, más preferiblemente al menos tres, sitios de fijación específicos para los epítopos de, p. ej., antígenos, moléculas efectoras o estructuras con un origen patógeno o de estructura humana, como los autoantígenos que incluyen proteínas asociadas a células o proteínas séricas. El término formato de anticuerpo para ser usado tal y como se describe en la presente memoria incluye anticuerpos de longitud completa o fragmentos funcionales de un anticuerpo, tal como Fab (en la presente memoria se entiende que incluye Fab, F(ab) o F(ab')), (Fab')₂, scFv u otro dímero de cadena única, p. ej., de dominios CH1/CL (κ o λ), Fv, dímeros como VH/VL, CH1/CL, CH2/CH2, CH3/CH3 u otros derivados o combinaciones de los mismos, p. ej., cadenas únicas de parejas de dominios de anticuerpo o cadenas de dominios de anticuerpo unidas las unas a las otras por un conector o una región bisagra, específicamente un formato de anticuerpo como el descrito en la figura 1B.

30 Un anticuerpo digerido por la papaína produce tres fragmentos: dos fragmentos Fab y un fragmento Fc. El término «Fab» se entiende en la presente memoria que incluye Fab, F(ab) o F(ab'), que puede o no incluir una región bisagra. El fragmento Fab o F(ab') es una estructura de anticuerpo que se sigue uniendo al antígeno, pero que es monovalente y sin ninguna porción Fc. Según una realización preferida, se da a conocer un formato de anticuerpo que comprende un fragmento Fab, que comprende la pareja de dominios VH/VL y otros dos dominios constantes de anticuerpo, p. ej., CL y CH1.

35 Los anticuerpos de fragmentos F(ab')₂ se generan mediante la digestión con pepsina de los anticuerpos enteros de tipo IgG para retirar la mayor parte de la región Fc al mismo tiempo que se deja intacta parte de la región bisagra. Los fragmentos F(ab')₂ tienen dos porciones F(ab') de fijación al antígeno unidas entre sí y, por lo tanto, son divalentes.

40 Se prefiere que el formato de anticuerpo descrito en la presente memoria comprenda al menos dominios variables para mantener los al menos dos sitios de fijación específicos; y al menos uno, preferiblemente al menos 2, o al menos tres, dominios constantes.

45 El término «formato de anticuerpo» incluirá de manera específica formatos de anticuerpo aislados, que en la presente memoria se entiende que están sustancialmente libres de otros formatos de anticuerpo dirigidos contra diferentes antígenos diana o que comprenden una disposición estructural diferente de los dominios de anticuerpo. Aún más, un formato de anticuerpo aislado para ser usado tal y como se describe en la presente memoria puede estar comprendido en una preparación de combinación, que contiene una combinación del formato de anticuerpo aislado, p. ej., con al menos otro formato de anticuerpo, tal como anticuerpos monoclonales o fragmentos de anticuerpo que tienen diferentes especificidades.

5 El formato de anticuerpo, tal y como se utiliza en la presente memoria, puede ser un formato de anticuerpo biespecífico recombinante, en donde el término incluye todos los formatos de anticuerpo que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como los anticuerpos que se originan de animales, p. ej., mamíferos que incluyen los humanos, que comprende genes o secuencias de diferente origen, p. ej., anticuerpos humanizados o anticuerpos procedentes de hibridoma. Otros ejemplos se refieren a formatos de anticuerpo aislados de una célula hospedadora transformada para que exprese el formato de anticuerpo o los formatos de anticuerpo aislados de una colección combinatoria recombinante de anticuerpos o de dominios de anticuerpo, o los formatos de anticuerpo preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implica el ajuste de secuencias del gen de los anticuerpos a otras secuencias de ADN.

10 Se entiende que el término «formato de anticuerpo» incluye los derivados de los mismos. Un derivado es cualquier combinación de uno o varios dominios de anticuerpo o formatos de anticuerpo descritos en la presente memoria y/o una proteína de fusión, en la que cualquier dominio del formato de anticuerpo descrito en la presente memoria puede estar fusionado en cualquier posición de una u varias proteínas adicionales, tales como otros anticuerpos o formatos de anticuerpo, p. ej., una estructura de fijación que comprende lazos de CDR, un polipéptido del receptor, pero también ligandos, andamios proteicos, enzimas, toxinas y similares.

15 Un derivado del anticuerpo modular descrito en la presente memoria también se puede obtener por la asociación o fijación a otras sustancias mediante diferentes técnicas químicas, tales como la conjugación covalente, interacción electrostática, formación de puentes disulfuro, etc. Las otras sustancias fijadas a las inmunoglobulinas pueden ser lípidos, glúcidos, ácidos nucleicos, moléculas orgánicas e inorgánicas, o cualquier combinación de las mismas (p. ej., PEG, profármacos o fármacos). El término derivado también incluye fragmentos, variantes, análogos u homólogos de formatos de anticuerpo, que son funcionales y pueden servir de equivalentes funcionales, p. ej., fijación a las dianas específicas y con propiedades funcionales, tales como actividad inhibidora de IgG o actividad apoptótica. Los derivados preferidos siguen siendo funcionales con respecto a la fijación al antígeno, a la actividad apoptótica y/o a la actividad para inhibir la producción de IgG desde los linfocitos B autorreactivos.

20 El término «porción Fc activa», tal y como se utiliza en la presente memoria, se referirá a un fragmento Fc de un anticuerpo que comprende al menos dos, preferiblemente al menos cuatro dominios constantes de anticuerpo, p. ej., dominios de anticuerpo CH2 y CH3, o modificaciones, derivados, combinaciones o partes de los dominios constantes de anticuerpo que siguen siendo funcionales respecto a la función efectora de Fc. La función efectora de Fc se entiende del siguiente modo. Los anticuerpos que comprenden una porción Fc activa le confieren típicamente actividad citotóxica. Cuando se fijan a un antígeno, la porción Fc participa en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) y/o en la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) mediante su actividad sobre las células efectoras, lo que da lugar a la activación de los linfocitos T citotóxicos o de las células que intervienen en la CCDA o la CDC. Por lo tanto, las porciones Fc funcionalmente activas se fijan a las células efectoras a través de un sitio de fijación del receptor Fcγ (FCGR).

25 Los formatos de anticuerpo dados a conocer en la presente memoria están desprovistos de una porción Fc activa, con lo que se componen de dominios de anticuerpo que no tienen un sitio de fijación del FCGR, lo que incluye de manera específica cualquier formato de anticuerpo desprovisto de una cadena de los dominios CH2 y CH3, o bien comprenden una porción Fc que carece de la función efectora de Fc, p. ej., por modificaciones para reducir las funciones efectoras de Fc, en particular para anular o reducir la actividad de CCDA y/o CDC. Tales modificaciones pueden efectuarse mediante mutagénesis, p. ej., mutaciones en el sitio de fijación de FCGR o mediante derivados o agentes que interfieren con la actividad de CCDA y/o CDC de un formato de anticuerpo, para conseguir la reducción de una función efectora de Fc o la ausencia de la función efectora de Fc, que típicamente se entiende que se refiere a una función efectora de Fc de menos del 10% del formato sin modificar (el tipo silvestre), preferiblemente de menos del 5%, según se mide por la actividad de la CCDA y/o CDC. Los ejemplos específicos se refieren a formatos de anticuerpo que comprenden una región Fc, en la que se han hecho una o varias alteraciones para cambiar las propiedades funcionales o farmacocinéticas de los anticuerpos, p. ej., por sustituciones en uno o varios de los restos de aminoácidos localizados en la región Fc responsable de intervenir en la función efectora de Fc, p. ej., mutaciones en la región del extremo amino del dominio CH2.

30 El término «linfocito B autorreactivo» y «trastorno por linfocitos B autorreactivos», tal y como se utiliza en la presente memoria, se entienden del modo explicado a continuación. Los linfocitos B autorreactivos forman parte del repertorio de linfocitos B indiferenciados y son capitales en la patogenia de las enfermedades autoinmunitarias, no solo por producir autoanticuerpos, sino también por secretar citocinas y por presentar autoantígenos. Un trastorno por linfocitos B autorreactivos se pretende que haga referencia a una situación patológica que se puede mejorar mediante la administración de una composición farmacéutica que comprende un formato de anticuerpo descrito en la presente memoria. En las enfermedades asociadas a un trastorno por linfocitos B autorreactivos, como las enfermedades autoinmunitarias provocadas por los linfocitos B, hay típicamente una selección negativa aberrante y la activación de linfocitos B autorreactivos.

35 Las enfermedades autoinmunitarias se entiende de manera específica que son trastornos que surgen de reacciones dirigidas contra los propios tejidos u órganos de un sujeto, típicamente reacciones de anticuerpos con autoantígenos. Entre los diferentes marcadores clínicos y de laboratorio que indican las enfermedades autoinmunitarias, se encuentran la hipergammaglobulinemia, la concentración elevada de autoanticuerpos, los depósitos de complejos

entre antígeno y anticuerpo en los tejidos, el beneficio clínico de los tratamientos con corticosteroides o inmunodepresores, y los agregados de células linfocíticas en los tejidos afectados.

El formato de anticuerpo dado a conocer en la presente memoria permite la modulación del repertorio de linfocitos B para reducir la autorreactividad de los linfocitos B. La modulación es más específica que la conseguida con los anticuerpos monoespecíficos, ya que solo se ven afectados los linfocitos B activados que expresan el CD95 y no los linfocitos B en reposo que carecen de él. Se podía demostrar que el formato de anticuerpo dado a conocer en la presente memoria indujo la apoptosis de los linfocitos B activados, suprimía adicionalmente la producción de IgG inducida por la activación, e inhibía la síntesis de IgG de los linfocitos B activados. Así pues, los linfocitos B autorreactivos que producen anticuerpos de tipo IgG dirigidos contra las dianas autoinmunitarias, tales como los autoantígenos, se pueden reducir de manera eficaz.

Mediante el formato de anticuerpo biespecífico dado a conocer en la presente memoria, de manera específica los biespecíficos CD20XCD95, podían actuar selectivamente y retirar no solo los linfocitos B malignos, sino también los linfocitos B normales (benignos) activados que expresan el receptor de muerte CD95. En cambio, no actuaban contra los linfocitos B en reposo, y no se pudo observar ningún efecto con tales linfocitos B normales. Esto indica que los linfocitos B activados dependen de CD95 para someterse a la muerte celular apoptótica después de la incubación con los anticuerpos biespecíficos CD20XCD95 de la clase descrita.

La reducción de los linfocitos B activados suprime la producción de anticuerpos. Esto era sorprendente porque las células productoras de anticuerpos diferenciadas a término, a saber, células plasmáticas, no expresan el CD20. La supresión de los precursores activados de los linfocitos B es obviamente suficiente para suprimir la producción de anticuerpos.

Se prefiere la supresión de la producción de anticuerpos debida a los formatos de anticuerpo biespecífico dados a conocer en la presente memoria frente al uso de los anticuerpos contra CD20 monoespecíficos consolidados, como el rituximab (Rituxan®), que retira todos los linfocitos B que expresan el CD20, sin diferenciar los linfocitos B autorreactivos o activados de los linfocitos B normales o en reposo.

El término «sitio de fijación», tal y como se utiliza en la presente memoria con respecto a un anticuerpo o formato de anticuerpo descrito en la presente memoria, se refiere a una estructura molecular capaz de interactuar al fijarse con un antígeno. Típicamente, el sitio de fijación está localizado dentro de la región determinante de la complementariedad (CDR) de un anticuerpo, también denominado en la presente memoria «un sitio de fijación de CDR», que es una región específica con diferentes estructuras que confieren la función de fijación a diferentes antígenos. Las diferentes estructuras pueden derivarse de repertorios naturales de anticuerpos, p. ej., repertorios murinos o humanos, o se pueden producir por medios recombinantes o sintéticos, p. ej., mediante mutagénesis y de manera específica mediante técnicas de aleatorización. Estas incluyen regiones CDR mutagenizadas, regiones de lazos de dominios variables de anticuerpo, específicamente, lazos de CDR de anticuerpos, tales como los lazos de CDR1, CDR2 y CDR3 de cualquiera de los dominios VL y/o VH de anticuerpo. El formato de anticuerpo para ser usado tal y como está descrito en la presente memoria comprende típicamente uno o varios sitios de fijación de CDR, cada uno específico de un antígeno.

El término «específico» o «biespecífico», tal y como se utiliza en la presente memoria, se referirá a una reacción de fijación que es determinante del ligando semejante de interés en una población heterogénea de moléculas. Así pues, en las condiciones escogidas, p. ej., condiciones de inmunoensayo, el formato de anticuerpo que se fija de manera específica a su diana concreta no se fija en una cantidad significativa a otras moléculas presentes en una muestra.

Lo típico es que un sitio de fijación específico no produzca una reacción cruzada con otras dianas. Aun así, el sitio de fijación específico puede fijarse de manera específica a uno o varios epítomos, isoformas o variantes de la diana, o puede tener una reacción cruzada con otros antígenos diana relacionados, p. ej., homólogos o análogos.

La fijación específica significa que la fijación es selectiva en términos de identidad de la diana, alta, media o baja afinidad de fijación o avidez, según se seleccione. La fijación selectiva se suele conseguir si la constante de fijación o la dinámica de fijación es al menos 10 veces diferente, preferiblemente la diferencia es al menos de 100 veces y más preferiblemente de al menos 1000 veces.

El formato de anticuerpo biespecífico descrito en la presente memoria comprende específicamente dos o más sitios de fijación, posiblemente 3 o 4 sitios de fijación con propiedades de fijación específicas, en donde al menos dos antígenos diana diferentes son reconocidos por el formato de anticuerpo. Así pues, un formato de anticuerpo biespecífico ejemplar puede comprender dos sitios de fijación, en donde cada uno de los sitios de fijación es capaz de fijarse de manera específica a un antígeno diferente, p. ej., un receptor de muerte y un antígeno de la superficie celular de un linfocito B. Cuando el formato de anticuerpo biespecífico comprende más de dos sitios de fijación, puede estar dirigido contra más de dos antígenos diana diferentes y/o comprender más de una valencia para fijarse de manera específica a un único, o el mismo, tipo de antígeno diana.

El término «monovalente», tal y como se utiliza en la presente memoria con respecto a un sitio de fijación de un anticuerpo o formato de anticuerpo, deberá referirse a una molécula que comprende sólo un sitio de fijación dirigido contra un antígeno diana. El término «valencia» se entiende, así pues, como el número de sitios de fijación dirigidos

contra el mismo antígeno diana, al fijarse de manera específica al mismo o bien a diferentes epítomos de un antígeno. Cuando un anticuerpo o formato de anticuerpo para ser usado tal y como se describe en la presente memoria comprende dos o más sitios de fijación, p. ej., 2, 3 o 4 sitios de fijación, contra el mismo antígeno diana, que se dirigen específicamente contra el mismo o diferentes epítomos de un antígeno, esto se denomina bivalencia o multivalencia.

5 El formato de anticuerpo para ser usado tal y como se describe en la presente memoria se entiende que comprende un sitio de fijación monovalente que de manera específica fija a una diana que es el receptor de muerte y al menos otro sitio de fijación para la fijación específica a un antígeno de la superficie celular expresado en los linfocitos B, específicamente en los linfocitos B autorreactivos. Así pues, se entiende que es monovalente con respecto a la fijación al receptor de muerte y mono-, bi- o multivalente con respecto a la fijación al antígeno de la superficie celular.

10 El término «antígeno», tal y como se utiliza en la presente memoria de manera intercambiable con los términos «diana», «destinatario» o «antígeno diana», deberá referirse a una molécula destinataria completa o a un fragmento de tal molécula reconocida por un sitio de fijación de anticuerpo. Específicamente, las subestructuras de un antígeno, p. ej., una estructura polipeptídica o glucídica, a las que se hace referencia por lo general como «epítomos», p. ej., epítomos de linfocitos B o epítomo de linfocitos T, que son relevantes desde el punto de vista inmunitario, pueden ser reconocidas por tal sitio de fijación. El término «epítomo», tal y como se utiliza en la presente memoria, deberá referirse específicamente a una estructura molecular que puede fabricar completamente un compañero de fijación específico, o ser parte de un compañero de fijación específico para un sitio de fijación de un formato de anticuerpo descrito en la presente memoria. Un epítomo puede estar formado por un glúcido, una estructura peptídica, un ácido graso, una sustancia orgánica, bioquímica o inorgánica, o derivados de los mismos y cualquier combinación de los mismos. Si un epítomo está comprendido en una estructura peptídica, tal como un péptido, un polipéptido o una proteína, lo normal es que incluya al menos 3 aminoácidos, preferiblemente de 5 a 40 aminoácidos, y más preferiblemente entre aproximadamente 10 y 20 aminoácidos. Los epítomos puede ser epítomos lineales o bien conformacionales. Un epítomo lineal está compuesto por un solo segmento de una secuencia primaria de una cadena de polipéptido o de glúcido. Los epítomos lineales pueden ser contiguos o solapantes. Los epítomos conformacionales están compuestos por aminoácidos o glúcidos que se han juntado por el plegamiento del polipéptido para formar una estructura terciaria y los aminoácidos no están necesariamente adyacentes los unos a los otros en la secuencia lineal.

20 El término «antígeno de superficie celular» con respecto a un linfocito B, tal y como se utiliza en la presente memoria, deberá referirse a un antígeno expresado sobre la superficie de un linfocito B, preferiblemente un linfocito B maduro, activado o autorreactivo, sobre el que puede actuar selectivamente un antagonista que se fija a ellos. Los marcadores de superficie de ejemplo para los linfocitos B incluyen el CD20 y el CD40.

30 El antígeno de superficie de los linfocitos B de particular interés se expresa mucho de manera preferencial en la superficie de los linfocitos B autorreactivos, de manera preferencial más de 10000 moléculas por célula.

35 Un sitio de fijación que se fija específicamente a un antígeno seleccionado de CD20 y CD40 puede obtenerse por modificación de un anticuerpo monoclonal disponible en el mercado que está dirigido contra el antígeno, p. ej., rituximab u ocrelizumab dirigidos contra el CD20. Específicamente, se puede utilizar un sitio de fijación derivado de cualquiera de los formatos de anticuerpo anti-CD20 tal y como se ejemplifica en la figura 9.

40 El término «CD19» incluye cualquier variante, isoforma y homólogo de especie del CD19 de humano que se expresa de manera natural desde las células o que se expresa sobre las células transfectadas con el gen de CD19.

El término «CD20» incluye cualquier variante, isoforma y homólogo de especie del CD20 de humano que se expresa de manera natural desde las células o que se expresa sobre las células transfectadas con el gen de CD20.

El término «CD40» incluye cualquier variante, isoforma y homólogo de especie del CD40 de humano que se expresa de manera natural desde las células o que se expresa sobre las células transfectadas con el gen de CD40.

45 El término «receptor de muerte» con respecto a un linfocito B, tal y como se utiliza en la presente memoria, deberá referirse a un antígeno derivado de un receptor en la superficie de células que conduce a la muerte celular programada mediante una o varias vías de apoptosis. Los receptores de muerte de ejemplo se expresan en los linfocitos B activados e incluyen, p. ej., CD95, receptores de TRAIL, p. ej., TRAIL-R1 o TRAIL-R2, y receptores del TNF. A diferencia de los linfocitos B activados, el CD95 no se expresa en los linfocitos B normales en reposo.

50 El CD95 también se conoce como Fas o Apo-1, y es miembro de la subfamilia del receptor del factor de la necrosis tumoral. Un sitio de fijación que se fija de manera específica al CD95 puede derivarse de los anticuerpos dirigidos contra el CD95, tales como los clones APO-1 o LT95 y DX2 distribuidos por Acris Antibodies, Herford, Alemania. Específicamente, se puede utilizar un sitio de fijación derivado de cualquiera de los formatos de anticuerpo anti-CD95 tal y como se ejemplifican en la figura 9.

El término «CD95» incluye cualquier variante, isoforma y homólogo de especie del CD95 de humano que se expresa de manera natural desde las células o que se expresa sobre las células transfectadas con el gen de CD95.

55 El término «variantes» se deberá referir a mutantes, p. ej., los obtenidos por los métodos de mutagénesis dirigida específica de sitio, específicamente para deleccionar, intercambiar, introducir insertos en una región específica de

5 anticuerpo o modificar químicamente una secuencia de aminoácidos, en los dominios constantes para manipular genéticamente la función efectora o la semivida del anticuerpo, o en los dominios variables para mejorar las propiedades de fijación al antígeno, p. ej., mediante técnicas de maduración de la afinidad. Se puede emplear cualquiera de los métodos conocidos de mutagénesis, que incluyen mutaciones puntuales en las posiciones deseadas, p. ej., obtenidas por técnicas de aleatorización. En algunos casos, las posiciones se eligen al azar, p. ej., con cualquiera de los posibles aminoácidos o una selección de los aminoácidos preferidos para aleatorizar la secuencia de los anticuerpos. El término «variante» deberá englobar de manera específica las variantes funcionalmente activas.

10 El término «variante funcionalmente activa» de una molécula, tal como el anticuerpo que se utiliza en la presente memoria, significa una secuencia que se obtiene por la modificación de esta secuencia (una secuencia original) por inserción, delección o sustitución de uno o varios aminoácidos, o la modificación química de uno o varios restos de aminoácidos, o nucleótidos, dentro de la secuencia o en cualquiera o ambos de los extremos distales de la secuencia, y cuya modificación no afecta (específicamente, deteriora) la actividad de esta secuencia. En el caso de un sitio de fijación que tiene especificidad por un determinado antígeno diana, la variante funcionalmente activa de una molécula tendría aún la especificidad de fijación predeterminada, aunque esta se podría cambiar, p. ej., para cambiar la delicada especificidad por un epítipo específico, la afinidad, la avidéz, las constantes de asociación o disociación, etc.

15 Se pueden obtener variantes funcionalmente activas al cambiar la secuencia de un formato de anticuerpo original, p. ej., cualquiera de las secuencias de la figura 9, p. ej., la secuencia de NA-C20 de la figura 9E i) o ii), y se caracterizan por tener una actividad biológica parecida a la desplegada por la secuencia correspondiente, que incluye la capacidad para fijarse a CD20 y/o CD95 o para actuar selectivamente sobre los linfocitos B activados o autorreactivos.

20 Preferiblemente, la variante funcionalmente activa del formato de anticuerpo tiene sustancialmente la misma actividad biológica según se determina por un ensayo de fijación o análisis funcional específicos para la acción selectiva sobre los linfocitos B activados o autorreactivos. El término «sustancialmente la misma actividad biológica», tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a la actividad que se indica mediante sustancialmente la misma actividad que es de al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 95%,
25 al menos el 98% o incluso al menos el 100% o al menos el 110%, o al menos el 120%, o al menos el 130%, o al menos el 140%, o al menos el 150%, o al menos el 160%, o al menos el 170%, o al menos el 180%, o al menos el 190%, p. ej., hasta el 200%, de la actividad que se determina para el formato de anticuerpo original, p. ej., el formato de anticuerpo biespecífico recombinante NA-C20 de la figura 9B.

En una realización preferida, la variante funcionalmente activa

30 a) es un fragmento biológicamente activo de la molécula, en donde el fragmento comprende al menos el 50% de la secuencia de la molécula, preferiblemente al menos el 70%, más preferiblemente al menos el 80%, aún más preferiblemente al menos el 90%, incluso más preferiblemente al menos el 95%, y lo más preferiblemente al menos el 97%, 98% o 99%;

35 b) se deriva de la molécula mediante al menos una sustitución, adición y/o delección de aminoácido, en donde la variante funcionalmente activa tiene una identidad de secuencia con la molécula o parte de ella, tal como un anticuerpo de una identidad de secuencia de al menos el 50%, preferiblemente al menos el 60%, más preferiblemente al menos el 70%, lo más preferiblemente al menos el 80%, aún más preferiblemente al menos el 90%, incluso más preferiblemente al menos el 95%, y lo más preferiblemente al menos el 97%, 98% o 99%; y/o

40 c) consiste en la molécula o una variante funcionalmente activa de la misma y adicionalmente al menos un aminoácido o nucleótido heterólogo para la secuencia del polipéptido o de nucleótidos, preferiblemente en donde las variantes funcionalmente activas se derivan de cualquiera de los anticuerpos anti-CD20, anti-CD40 y/o anti-CD95 recombinantes o que se producen en la naturaleza.

45 En una realización preferida, la variante funcionalmente activa del anticuerpo descrito en la presente memoria es esencialmente idéntico a la variante descrita más arriba, pero difiere de su secuencia polipeptídica o de nucleótidos, respectivamente, en que procede de una secuencia homóloga de una especie diferente. Estas se dice que son variantes que se producen en la naturaleza.

De manera específica, se dan a conocer secuencias quiméricas, humanizadas o humanas, y variantes funcionalmente activas de un formato de anticuerpo original que comprende tales secuencias quiméricas, humanizadas o humanas.

50 El término «quimérico», tal y como se utiliza con respecto a un formato de anticuerpo descrito en la presente memoria, se refiere a los anticuerpos en los que una porción de cada una de las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera es homóloga a las correspondientes secuencias en los anticuerpos procedentes de una especie específicamente o que pertenece a una clase particular, mientras que el resto del segmento de la cadena es homólogo a las correspondientes secuencias en otra especie o clase. Típicamente, la región variable de ambas cadenas ligera y pesada imita las regiones variables de los anticuerpos procedentes de una especie de mamífero, mientras que las porciones constantes son homólogas a las secuencias de anticuerpo procedentes de otra. Por ejemplo, la región variable puede proceder de fuentes actualmente conocidas mediante el uso de linfocitos B o hibridomas de fácil disponibilidad en los organismos hospedadores no humanos en combinación con regiones constantes procedentes de, por ejemplo, preparaciones de células humanas.

El término «humanizado», tal y como se utiliza con respecto a un formato de anticuerpo descrito en la presente memoria, se refiere a una molécula que tiene un sitio de fijación a antígeno que procede sustancialmente de una inmunoglobulina de una especie no humana, en donde el resto de la estructura de inmunoglobulina de la molécula se basa en la estructura y/o la secuencia de una inmunoglobulina de humano. El sitio de fijación del antígeno puede comprender dominios variables completos fusionados con dominios constantes, o bien solo las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) injertadas sobre las regiones flanqueantes apropiadas en los dominios variables. Los sitios de fijación a antígeno pueden ser de tipo silvestre o modificados, p. ej., mediante una o varias sustituciones de aminoácido, preferiblemente modificados para parecerse aún más a las inmunoglobulinas de humano. Algunas formas de anticuerpos humanizados conservan todas las secuencias de CDR (por ejemplo, un anticuerpo de ratón humanizado que contiene las seis CDR del anticuerpo de ratón). Otras formas tienen una o varias CDR, que están alteradas con respecto al anticuerpo original.

El término «humano», tal y como se utiliza con respecto a un formato de anticuerpo descrito en la presente memoria, se entiende que incluye los anticuerpos que tienen las regiones variable y constante procedentes de las secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal de humano. Los formatos de anticuerpo de humano descritos en la presente memoria pueden incluir restos de aminoácidos que no están codificados por las secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal de humano (p. ej., mutaciones introducidas mediante mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o mediante mutación somática *in vivo*), por ejemplo, en las CDR. Los formatos de anticuerpo de humano descritos en la presente memoria incluyen los anticuerpos aislados de inmunoglobulinotecas de humano o de animales transgénicos para una o varias inmunoglobulinas de humano.

El término «variante funcionalmente activa» también incluye las variantes alélicas que se producen en la naturaleza, así como los mutantes o cualquier otra variante que no se produce de forma natural. Tal y como se conoce en la técnica, una variante alélica es una forma alternativa de un (poli)péptido que se caracteriza por tener una sustitución, delección o adición de uno o varios aminoácidos que esencialmente no alteran la función biológica del polipéptido.

Las variantes funcionalmente activas se pueden obtener mediante la alteración de la secuencia en la secuencia polipeptídica o de nucleótidos, p. ej., mediante una o varias mutaciones puntuales, en donde la alteración de la secuencia conserva una función del polipéptido o de la secuencia nucleotídica sin alterar, cuando se utiliza en la combinación que se describe en la presente memoria. Tales alteraciones de secuencia pueden incluir, pero sin limitación, sustituciones (conservativas), adiciones, delecciones, mutaciones e inserciones.

Una variante de CDR incluye una secuencia de aminoácidos modificada en al menos un aminoácido, en donde dicha modificación puede ser una alteración química o una alteración parcial de la secuencia de aminoácidos, en donde dicha modificación permite que la variante conserve las características biológicas de la secuencia sin modificar. Por ejemplo, la variante es una variante funcional que se fija a CD20, CD40 o CD95. Una alteración parcial de la secuencia de aminoácidos de la CDR puede ser por delección o sustitución de uno a varios aminoácidos, p. ej., 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos, o por la adición o inserción de uno a varios aminoácidos, p. ej., 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos, o por una modificación química de uno a varios aminoácidos, p. ej., 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos, o una combinación de las mismas. Las sustituciones de los restos de aminoácido pueden ser sustituciones conservativas, por ejemplo, la sustitución de un aminoácido hidrófobo por un aminoácido hidrófobo alternativo.

Las sustituciones conservativas son las que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales y en las propiedades químicas. Los ejemplos de tales familias son los aminoácidos con cadenas laterales básicas, con cadenas laterales ácidas, con cadenas laterales alifáticas apolares, con cadenas laterales aromáticas apolares, con cadenas laterales polares sin carga, con cadenas laterales pequeñas, con cadenas laterales grandes, etc.

Una mutación puntual se entiende específicamente como la manipulación genética de un polinucleótido que da lugar a la expresión de una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia de aminoácidos sin manipulación genética en la sustitución o intercambio, delección o inserción, de uno o varios aminoácidos únicos (no consecutivos) o dobles de aminoácidos para diferentes aminoácidos.

Las mutaciones puntuales preferidas se refieren al intercambio de aminoácidos de la misma polaridad y/o carga. En este sentido, los aminoácidos se refieren a los veinte aminoácidos que se producen en la naturaleza codificados por 64 tripletes o codones. Estos 20 aminoácidos pueden separarse en los que tienen carga neutra, cargas positivas y cargas negativas:

Los aminoácidos «neutros» se muestran a continuación junto con sus correspondientes códigos de tres letras, de una letra, y la polaridad:

Alanina: (Ala, A) no polar, neutro;

Asparagina: (Asn, N) polar, neutro;

Cisteína: (Cys, C) apolar, neutro;

Glutamina: (Gln, Q) polar, neutro;

Glicina: (Gly, G) apolar, neutro;

Isoleucina: (Ile, I) apolar, neutro;

Leucina: (Leu, L) apolar, neutro;

Metionina: (Met, M) apolar, neutro;

5 Fenilalanina: (Phe, F) apolar, neutro;

Prolina: (Pro, P) apolar, neutro;

Serina: (Ser, S) polar, neutro;

Treonina: (Thr, T) polar, neutro;

Triptófano: (Trp, W) apolar, neutro;

10 Tirosina: (Tyr, Y) polar, neutro;

Valina: (Val, V) apolar, neutro; e

Histidina: (His, H) polar, positivo (10%), neutro (90%).

Los aminoácidos cargados «positivamente» son:

Arginina: (Arg, R) polar, positivo; y

15 Lisina: (Lys, K) polar, positivo.

Los aminoácidos cargados «negativamente» son:

Ácido aspártico: (Asp, D) polar, negativo; y

Ácido glutámico: (Glu, E) polar, negativo.

20 «El porcentaje (%) de identidad de la secuencia de aminoácidos» con respecto a las secuencias polipeptídicas identificadas en la presente memoria se define como el porcentaje de restos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los restos de aminoácidos en la secuencia del polipéptido específico, después de alinear la secuencia e introducir los huecos, si son necesarios, para conseguir el porcentaje máximo de identidad de la secuencia, y no se considera ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de la secuencia. Los expertos en la técnica pueden determinar los parámetros adecuados para medir el alineamiento, que incluye cualquier algoritmo necesario para conseguir el alineamiento máximo a lo largo de toda la longitud de la secuencias que se comparan.

El término «sujeto», tal y como se utiliza en la presente memoria, deberá referirse a un mamífero de sangre caliente, en particular a un ser humano. Un sujeto que necesita la profilaxis o el tratamiento de un trastorno por linfocitos B autorreactivos específicamente puede ser un paciente que padece una enfermedad en las primeras etapas o en fase avanzada, o cualquier sujeto predispuesto a tal enfermedad, p. ej., mediante predisposición genética.

30 Por lo tanto, el formato de anticuerpo biespecífico para ser usado tal y como se describe en la presente memoria se basa en el hallazgo sorprendente de que las construcciones de anticuerpo biespecífico de ejemplo, específicamente las que se fijan a CD95 y CD20 o CD40 sobre la superficie de los linfocitos B activados, suprime específicamente la producción de IgG e inhibe la síntesis de IgG, con lo que se reduce la generación de una concentración de IgG en un sujeto y reducen las reacciones autoinmunitarias del sujeto. Para el anticuerpo biespecífico recombinante NA-C20 descrito en la presente memoria y representado en la figura 1B, está demostrado que suprime no sólo la producción de anticuerpos desde los linfocitos B activados policlonalmente, sino más específicamente de los linfocitos B activados que producen el anticuerpo específico contra la toxina del tétanos.

40 Se describió previamente que los anticuerpos biespecíficos con especificidad por CD20 y el receptor de muerte CD95 son capaces de inducir la apoptosis mediada por CD95 en las células de linfoma que expresan el CD20. Resultó muy sorprendente que los anticuerpos híbridos CD20XCD95 dados a conocer en la presente memoria indujeran la apoptosis en los linfocitos B activados por el mitógeno de la hierba carmesí (PWM) que expresan el CD95, pero no en las células en reposo que carecen de él. La producción de anticuerpos inducida por PWM *in vitro* está inhibida profundamente. Estos resultados indican que los anticuerpos biespecíficos CD20XCD95 dados a conocer en la presente memoria se pueden utilizar para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias mediadas por anticuerpos. En comparación con los anticuerpos mono-específicos contra CD20, estos reactivos ofrecen un nuevo principio efector y especificidad por los linfocitos B activados en vez de por los linfocitos B en reposo.

Además, se determinó la capacidad que tienen *in vitro* los anticuerpos biespecíficos CD20XCD95 descritos en la

presente memoria y los formatos de anticuerpo específicos para destruir los linfocitos B humanos activados, y se comparó con el anticuerpo anti-CD20 rituximab.

5 Los formatos de anticuerpo biespecífico de ejemplo dados a conocer en la presente memoria fueron capaces de actuar selectivamente sobre células que llevan el CD20 y el CD95, y de estimular el receptor de muerte CD95. La presencia creciente de linfocitos B activados que expresan CD20/CD95 suele estar asociada a la exacerbación del lupus y la artritis reumatoide. La implicación de los linfocitos B activados en la esclerosis múltiple (EM) también es cada vez más aceptado, ya que están implicados, p. ej., en el reclutamiento y la activación de los linfocitos T, la liberación de las citocinas y la producción de anticuerpos.

10 Los estudios *in vitro* han demostrado que los formatos de anticuerpo biespecífico de ejemplo descritos en la presente memoria pueden reducir la producción de inmunoglobulinas desde los linfocitos B activados de humano. Se halló que son muy selectivos, gracias a lo cual evitan los efectos secundarios al reducir al reacciones inespecíficas.

15 La supresión de la producción de IgG debida a los linfocitos B activados y la inhibición de la síntesis de IgG debida a los formatos de anticuerpo descritos en la presente memoria se entiende que son «actividad inhibidora de IgG». Tal actividad inhibidora de IgG hace referencia a los linfocitos B activados, específicamente a los linfocitos B autorreactivos, y se pretende que incluya cualquier disminución medible de la cantidad de IgG, específicamente la reducción de la producción de anticuerpos autoinmunitarios, en comparación con la producción de IgG desde las mismas células cuando no están en contacto con el formato de anticuerpo descrito en la presente memoria, p. ej., la reducción de la IgG en un sistema de análisis que emplea linfocitos B activados hasta al menos aproximadamente el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 99% o 100%.

20 Según una realización específica, los formatos de anticuerpo descritos en la presente memoria tienen actividad apoptótica, a saber, actividad citotóxica directa contra los linfocitos B deseados independientemente de las células efectoras inmunitarias, tales como los linfocitos citolíticos naturales. Específicamente, los formatos de anticuerpo descritos en la presente memoria tienen actividad apoptótica, según se mide en un ensayo estándar de apoptosis, p. ej., según se mide en un ensayo estándar de fragmentación del ADN.

25 La actividad apoptótica se mide preferiblemente con el uso de métodos estándares para determinar las células que se mueren y/o están muertas. Para medir la apoptosis, se pueden emplear ensayos de citotoxicidad. Estos ensayos pueden ser ensayos radioactivos y no radioactivos que miden el incremento en la permeabilidad de la membrana plasmática, ya que las células que mueren empiezan a perder su contenido, o ensayos colorimétricos que miden la reducción en la actividad metabólica de las mitocondrias. Las mitocondrias de las células muertas no pueden metabolizar los colorantes, mientras que sí lo hacen las mitocondrias de las células vivas.

30 También se pueden medir los indicadores del principio de la apoptosis, tales como alteraciones de la asimetría de la membrana, lo que da lugar a la aparición de fosfatidilserina en el exterior de la superficie celular (ensayos basados en la anexina V). Como alternativa, las etapas más tardías de la apoptosis, tales como la activación de las caspasas, se pueden medir en poblaciones de células o en cada una de las células. Además, se puede determinar la medición de la liberación del citocromo c y el AIF en el citoplasma desde las mitocondrias, o la fragmentación del ADN cromosómico.

35 La marcación de extremos libres con dUTP catalizada por la desoxinucleotidiltransferasa terminal (TUNEL) es un método habitual para detectar la fragmentación del ADN que se debe a las cascadas de señalización apoptótica. El ensayo se basa en la presencia de mellas en el ADN que pueden ser identificadas por la desoxinucleotidiltransferasa terminal, una enzima que catalizará la adición de dUTP bromilados que a continuación se detectan con un anticuerpo específico marcado.

40 La actividad apoptótica preferida del formato de anticuerpo descrito en la presente memoria alcanza al menos el 20% de la citólisis, preferiblemente al menos el 30%, más preferiblemente al menos el 40%, incluso más preferiblemente al menos el 50%, según se mide en el correspondiente ensayo de muerte celular *ex vivo*; p. ej., la medición de la supervivencia de los linfocitos B después de la incubación con los anticuerpos biespecíficos mediante citometría de flujo.

45 Debido a la ausencia de la función efectora de Fc, el formato de anticuerpo descrito en la presente memoria no tendría específicamente una actividad citotóxica significativa en presencia de las células efectoras inmunitarias según se mide en un análisis de CCDA o CDC, p. ej., con el empleo de células que expresan el receptor deseado en la superficie celular.

50 En cualquier formato de anticuerpo descrito en la presente memoria se puede demostrar la baja actividad citotóxica que se determina mediante un ensayo de CCDA o bien de CDC, si no hay un incremento significativo del porcentaje de citólisis en comparación con un control. La ausencia de la función efectora de Fc se determina típicamente si la actividad citotóxica que se mide por el incremento del porcentaje absoluto de la actividad de CCDA o de CDC es preferiblemente inferior al 10%, preferiblemente inferior al 5%, más preferiblemente inferior al 3%.

55 Preferiblemente, se utiliza un formato de anticuerpo que se fija a uno o a ambos de los antígenos diana con una gran afinidad, específicamente con una constante de asociación elevada y/o una constante de disociación baja, o gran avidez de fijación. La afinidad de fijación de un anticuerpo se suele caracterizar en términos de la concentración del

anticuerpo a la cual están ocupados la mitad de los sitios de fijación del antígeno, lo que se conoce como la constante de disociación (K_d o KD). Lo normal es que un aglutinante se considere un aglutinante de gran afinidad cuando tiene una $K_d < 10^{-8}$ M, preferiblemente una $K_d < 10^{-9}$ M, incluso más preferida es una $K_d < 10^{-10}$ M.

5 Aún en otra realización preferida alternativa, las afinidades de fijación por cada antígeno son de afinidad media, p. ej., con una K_d de menos de 10^{-6} M y hasta 10^{-8} M, p. ej., cuando se fijan a al menos dos antígenos.

10 Los formatos de anticuerpo biespecífico monoclonal dados a conocer en la presente memoria se pueden producir mediante una serie de técnicas, entre ellas la hibridación química de dos fragmentos Fab que da lugar a fragmentos Fab_2 biespecíficos ($(Fab')_2$, $bsFab_2$) y la tecnología de anticuerpos recombinantes, que optativamente emplea hibridoma o colecciones de secuencias de anticuerpos de humano. Los datos dados a conocer en los ejemplos se obtuvieron con fragmentos $bsFab_2$ ($(Fab')_2$) o el formato $bsFabXsc$ recombinante descrito en la figura 1B. Se prefiere la tecnología de anticuerpos recombinantes ya que permite que la producción sea reproducible desde las células transfectadas y que la purificación sea más simple.

15 Los formatos de anticuerpo dados a conocer en la presente memoria se utilizan preferiblemente en una composición farmacéutica. Se contemplan las composiciones farmacéuticas en las que se formulan el formato de anticuerpo descrito en la presente memoria y uno o varios agentes terapéuticamente activos. Las formulaciones estables de los formatos de anticuerpo descritos en la presente memoria se preparan para la conservación mediante la mezcla del formato de anticuerpo que tiene el grado deseado de pureza, de manera optativa con vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables, en forma de formulaciones liofilizadas, soluciones acuosas o en emulsiones de aceite en agua.

20 Típicamente, tales composiciones comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable que se conoce y que es necesario para la práctica farmacéutica aceptable, véase, p. ej., *Remington Pharmaceutical Sciences*, 16.^a edición (1980) Mack Publishing Co. Los ejemplos de tales vehículos incluyen vehículos esterilizados, tales como solución salina, solución de Ringer o solución de dextrosa, optativamente tamponada con los tampones idóneos para un pH dentro de un margen de 5 a 8.

25 Las formulaciones a ser usadas para la administración *in vivo* necesitarán que sean estériles. Esto se cumple fácilmente mediante la filtración a través de membranas de filtración estériles u otros métodos idóneos.

30 La administración de la composición farmacéutica que comprende los formatos de anticuerpo descritos en la presente memoria se puede realizar en una serie de modos, entre ellos la administración sistémica o parenteral, preferiblemente en forma de una solución acuosa estéril, p. ej., por vía intravenosa, intramuscular o subcutánea, pero también por vía oral, intranasal, intraóptica, transdérmica, en la mucosa, tópica (p. ej., geles, bálsamos, lociones, cremas, etc.), intraperitoneal, intramuscular, intrapulmonar, vaginal, parenteral, rectal o intraocular. Así pues, en la presente memoria se da a conocer un formato de anticuerpo en una formulación correspondiente idónea para tal uso.

35 Se describe adicionalmente en la presente memoria el tratamiento con una preparación farmacéutica, que contiene como sustancia activa los formatos de anticuerpo descritos en la presente memoria en una cantidad terapéuticamente eficaz. Específicamente, una formulación farmacéuticamente aceptable del formato de anticuerpo es compatible con el tratamiento de un sujeto que lo necesita.

40 El término «cantidad terapéuticamente eficaz», utilizada en la presente memoria de manera indistinta con cualquiera de los términos «cantidad eficaz» o «cantidad suficiente» del formato de anticuerpo descrito en la presente memoria, es una cantidad o actividad suficiente para, cuando se administra al sujeto, proporcionar unos resultados beneficiosos o deseados, que incluyen los resultados clínicos y, como tal, una cantidad eficaz o sinónima de la misma depende del contexto en el cual se aplica. Por ejemplo, en el contexto de la producción de IgG o de inhibición de su síntesis, es una cantidad del compuesto suficiente para conseguir una inhibición del incremento de los autoanticuerpos según se determina por los correspondientes niveles de IgG en comparación con la respuesta obtenida sin la administración del compuesto. En el contexto de enfermedad, se utilizan cantidades terapéuticamente eficaces del formato de anticuerpo para tratar, modular, atenuar, revertir o afectar una enfermedad o afección que se beneficia de una inhibición de las reacciones autoinmunitarias, por ejemplo, enfermedades inflamatorias agudas o crónicas asociadas a un trastorno por linfocitos B autorreactivos. Una cantidad eficaz está diseñada que signifique la cantidad de un compuesto que es suficiente para tratar, prevenir o inhibir tales enfermedades o trastorno. La cantidad de formato de anticuerpo que corresponderá a tal cantidad variará en función de diferentes factores, tales como el fármaco o compuesto dado, la formulación farmacéutica, la vía de administración, el tipo de enfermedad o trastorno, la identidad del sujeto o huésped a tratar, y similares, pero el experto en la técnica puede, no obstante, determinarla por norma.

55 Una cantidad terapéuticamente eficaz del formato de anticuerpo tal y como se da a conocer para un paciente humano que lo necesita puede estar de manera específica en el margen de 0,5 a 500 mg, preferiblemente de 1 a 400 mg, incluso más preferiblemente hasta 300 mg, hasta 200 mg, hasta 100 mg o hasta 10 mg, aunque se pueden indicar dosis más altas, p. ej., para tratar situaciones patológicas agudas.

Además, una pauta de tratamiento o prevención de un sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz del formato de anticuerpo descrito en la presente memoria puede consistir de una única administración o, como alternativa, puede comprender una serie de aplicaciones. Por ejemplo, el formato de anticuerpo se puede administrar al menos una vez

al año, al menos una vez cada medio año o al menos una vez al mes. Sin embargo, en otra realización, el formato de anticuerpo se puede administrar al sujeto desde aproximadamente una vez a la semana a aproximadamente una administración diaria para un tratamiento dado. La duración del tratamiento depende de una serie de factores, tales como la intensidad de la enfermedad, bien sea enfermedad aguda o enfermedad crónica, la edad del paciente, la concentración y la actividad del formato de anticuerpo. También se apreciará que la dosis eficaz utilizada para el tratamiento o la profilaxis se puede incrementar o disminuir durante el transcurso de un tratamiento o pauta de profilaxis específicamente. Los cambios en la dosis pueden ser debidos o quedar de manifiesto por los ensayos diagnósticos estándares conocidos en la técnica. En algunos casos, se puede necesitar la administración crónica.

Las formulaciones ejemplares que se utilizan para la administración parenteral incluyen las idóneas para la inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa como, por ejemplo, una solución o suspensión estéril.

El formato de anticuerpo descrito en la presente memoria se utiliza típicamente para reducir los síntomas de una reacción autoinmunitaria, p. ej., al reducir la tasa de recidiva anual de EM con recaídas y remisiones (EMRR), p. ej., por debajo del 50%, preferiblemente por debajo del 40% o por debajo del 30%. Otros ejemplos serían una subida del número de trombocitos por un factor de más de 2 en el caso de la púrpura trombocitopénica idiopática (PTI) o una subida de la concentración de hemoglobina de más de 2 mg/dl en el caso de una anemia hemolítica autoinmunitaria.

En una realización, el formato de anticuerpo descrito en la presente memoria es el único agente terapéuticamente activo administrado a un paciente, p. ej., como una monoterapia modificadora de la enfermedad.

Como alternativa, el formato de anticuerpo descrito en la presente memoria se administra en politerapia con uno o varios agentes terapéuticos diferentes, que incluyen, pero sin limitación, el tratamiento estándar, p. ej., interferón β o corticoesteroides en el caso de la EM o inmunoglobulinas en altas dosis en el caso de la PTI.

Una politerapia emplea una pauta estándar específicamente, p. ej., tal y como se utiliza para tratar la EMRR. Esto puede incluir el interferón β o los corticoesteroides.

En una politerapia, el formato de anticuerpo se puede administrar como una mezcla o, concomitantemente, con una o varias pautas terapéuticas más, p. ej., bien antes, a la vez o después del tratamiento concomitante.

Las propiedades biológicas del formato de anticuerpo descrito en la presente memoria se puede caracterizar *ex vivo* en los experimentos con células, tejidos y el organismo completo. Tal y como se conoce en la técnica, los fármacos se analizan a menudo *in vivo* con animales, entre ellos, pero sin limitarse a ellos, ratones, ratas, conejos, perros, gatos, cerdos y monos, para medir la eficacia de un fármaco para el tratamiento contra una enfermedad o modelo de enfermedad, o para medir la farmacocinética, farmacodinamia, toxicidad y otras propiedades de un fármaco. Los animales se pueden citar como modelos de enfermedad. Los fármacos a menudo se analizan con ratones, entre ellos, pero sin limitarse a ellos, ratones atímicos, ratones IDCG, ratones con xenoinjerto y ratones transgénicos (que incluyen los genosustituidos y los agénicos). Tal experimentación puede dar a conocer datos significativos para determinar el potencial que tiene el formato de anticuerpo para ser utilizado como un fármaco terapéutico con las adecuadas semivida, función efectora, actividad apoptósica y actividad inhibidora de IgG. Para el análisis, se puede utilizar cualquier organismo, preferiblemente mamíferos. Por ejemplo, debido a su similitud genética con los humanos, los primates y los monos pueden ser modelos terapéuticos idóneos y, por lo tanto, se pueden utilizar para analizar la eficacia, toxicidad, farmacocinética, farmacodinamia, semivida u otra propiedad del formato de anticuerpo descrito en la presente memoria. A la larga, se necesitarán ensayos de las sustancias en los humanos para su autorización como fármacos, y estos experimentos están contemplados en la presente memoria. Así pues, el formato de anticuerpo descrito en la presente memoria se puede analizar en los modelos animales o en los humanos para determinar su eficacia terapéutica, toxicidad, inmunogenia, farmacocinética y/u otras propiedades clínicas.

La descripción de más arriba se entenderá mucho mejor con referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, tales ejemplos son meramente representativos de los métodos para poner en práctica una o varias realizaciones de la presente invención, y no se deben entender que limitan el alcance de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1A:

Producción de un formato de anticuerpo de ejemplo mediante la hibridación química de fragmentos Fab:

Se prepararon los anticuerpos biespecíficos (Fab')₂ tal y como está descrito más arriba en la figura 1A y como está descrito en Jung et al. *Eur. J. Immunol.* 21: 2431, 1991. Brevemente, el anticuerpo contra CD20, el rituximab, se compró a Roche Pharma AG (Alemania), el anticuerpo contra CD95 (anticuerpo Apo-1) se purificó de los sobrenadantes de cultivo de hibridomas. El anticuerpo Apo-1 se puede comprar en forma purificada (BMS151) a eBioscience, San Diego. Los anticuerpos CA 92121 se purificaron por cromatografía de afinidad con la proteína A, y el anticuerpo contra myc se obtuvo de los sobrenadantes del clon del hibridoma 9E10 (CLR-1729, ATCC Manassas, VA, EE.UU.). Ambos anticuerpos se digirieron con pepsina, se modificaron y se hibridaron para obtener un fragmento Fab₂ biespecífico (bsFab₂) tal y como está descrito en el artículo mencionado más arriba. Los anticuerpos biespecíficos con la especificidad CD40xCD95 y MycXCD95 se produjeron en consecuencia. Los anticuerpos parentales dirigidos

contra CD40 y la proteína myc se purificaron desde los sobrenadantes de cultivo de las células de hibridoma (ATCC Manassas, VA, EE.UU.).

De manera general, los anticuerpos biespecíficos (Fab')₂ se prepararon por oxidación de los fragmentos F(ab')₂ monovalentes para obtener un fragmento (Fab')₂.

5 Como alternativa, los anticuerpos biespecíficos (Fab')₂ se pueden producir mediante la fusión de dos líneas de células de hibridoma para dar células de cuadroma, o mediante la tecnología de anticuerpos recombinantes.

Ejemplo 1B: Producción de un formato de anticuerpo de ejemplo mediante ingeniería recombinante, cadena única de Fab biespecífico recombinante (en la presente memoria también denominado bsFabXsc o NA-C20):

10 Se prepararon los anticuerpos biespecíficos NA-C20 tal y como se describe más arriba en la figura 1B y se utilizaron las secuencias descritas en la figura 9. La construcción genética que codifica el anticuerpo se transfectó de manera estable en el interior de las células Sp2/0 mediante el uso de técnicas estándares. La proteína se purificó desde los sobrenadantes de células transfectadas mediante el uso de la cromatografía de afinidad con selección de κ, comprada a GE-Healthcare, Life Sciences, Friburgo, Alemania.

Ejemplo 2: Expresión de CD95 en los linfocitos B de humano activados con 1 µg/ml de PWM:

15 Las células mononucleares de la sangre periférica (CMSP) de un donante sano normal, aisladas por centrifugación en gradiente de densidad, se incubaron con el mitógeno de la hierba carmesí (PWM, 1 µg/ml, Sigma Aldrich, Taufkirchen, Alemania) durante 6 días y se lavaron. En los puntos de tiempo indicados, se retiraron las células de los matraces de cultivo y se analizaron por citometría de flujo. Con este fin, las células se tiñeron con un anticuerpo contra CD19 o un anticuerpo de control de isotipo conjugado a azul pacífico, un anticuerpo contra CD95 conjugado a alofocianina
20 (APC), y el colorante 7-aminoactinomicina D (7-ADD) para identificar con claridad las células viables. Se detectaron las células viables que expresan CD19 y se analizaron. Los anticuerpos se compraron a Biolegend, San Diego, CA92121. Los resultados se dan a conocer en la figura 2. Los perfiles brillantes se obtuvieron con un control de isotipo, los perfiles oscuros con el anticuerpo contra CD95.

25 Conclusión: aunque el CD95 no es detectable en los linfocitos B en reposo, su expresión se incrementa después del día 1 de estimulación con PWM, alcanza su máximo el día 3 y permanece alto hasta el día 10, a pesar del lavado de las células del día 6.

Ejemplo 3: Cinética de la producción de IgG desde los linfocitos b activados con PWM:

30 Las CMSP normales se estimularon con PWM (1 µg/ml). Después de distintos tiempos, se retiraron alícuotas del sobrenadante del cultivo y se les analizó por ELISA el contenido de IgG de humano. Los resultados se dan a conocer en la figura 3. La estimulación de las CMSP con el PWM (círculo relleno) induce la producción de la IgG de humano. La producción del anticuerpo se vuelve detectable el día 4 y sube de manera continua hasta el día 10. La medición de la producción del anticuerpo desde las CMSP sin estimular (círculo hueco) sirve de control.

Conclusión: la producción de IgG se vuelve detectable al cabo de 5 días de estimulación con PWM y sube de manera continua hasta el día 10.

35 Ejemplo 4: Reducción de linfocitos B CD19+ y linfocitos T cooperadores/citolíticos naturales CD4+/CD8+ en las CMSP sin estimular:

40 Las CMSP sin estimular se incubaron durante 4 días con los anticuerpos indicados (1 µg/ml), se lavaron y analizaron por citometría de flujo con un anticuerpo contra CD19 conjugado a azul pacífico, un anticuerpo contra CD4 conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC), un anticuerpo contra CD8 conjugado a APC y el colorante de viabilidad 7-AAD (Biolegend, San Diego, CA92121). El NA-C20 es el anticuerpo biespecífico recombinante descrito en la figura 1B. Los resultados se dan a conocer en la figura 4.

Conclusión: Ninguno de los anticuerpos indicados afecta a los linfocitos T ni a los linfocitos B en los cultivos de las CMSP sin estimular.

45 Ejemplo 5: Reducción de los linfocitos B CD19+ y los linfocitos T cooperadores/citolíticos naturales CD4+/CD8+ en las CMSP estimuladas:

Las CMSP se estimularon durante 6 días con el mitógeno de la hierba carmesí (PWM, Sigma-Aldrich, 1 µg/ml), se lavaron y se incubaron durante 4 días con los anticuerpos indicados (1 µg/ml). Las células se analizaron por citometría de flujo el día 10 tal y como se describe en la figura 4. Los resultados se dan a conocer en la figura 5. El NA-C20 es el anticuerpo biespecífico recombinante en el formato bsFabXsc representado en la figura 1B.

50 Conclusión: Los dos anticuerpos biespecíficos CD20XCD95 inducen la reducción de los linfocitos B en las CMSP estimuladas con PWM. Los linfocitos T no se ven afectados. No resulta eficaz un anticuerpo de control hibridado químicamente con especificidad de tipo MycXCD95.

Ejemplo 6: Supresión de la producción de anticuerpos *in vitro*:

5 Las células mononucleares de la sangre periférica humana (CMSP) se aislaron de sangre heparinizada por centrifugación en gradiente de densidad, se inocularon a 1×10^6 células/ml en placas de 6 pocillos y se estimularon con una lectina, tal como el mitógeno de la hierba carmesí (PWM, 1 $\mu\text{g/ml}$, Sigma-Aldrich). El día 6, se lavaron las células y se les añadieron los anticuerpos indicados. El día 10, la cantidad de IgG de humano en el sobrenadante se midió por ELISA. El NA-C20 es el anticuerpo biespecífico recombinante en el formato bsFabXsc representado en la figura 1B. Los resultados se dan a conocer en la figura 6.

Conclusión: Ambos anticuerpos biespecíficos CD20XCD95 suprimen la producción de IgG desde las CMSP humanas estimuladas. Un anticuerpo de control hibridado químicamente con especificidad de tipo MycXCD95 no lo hace.

10 Ejemplo 7: El anticuerpo biespecífico interviene en la supresión de la síntesis *in vitro* de IgG inducida por el PWM:

15 Se aislaron células mononucleares de la sangre periférica humana (CMSP) de tres diferentes donantes sanos (figura 7A-7C) a partir de la sangre heparinizada mediante centrifugación en gradiente de densidad, se inocularon a 1×10^6 células/ml en placas de 6 pocillos y se estimularon con una lectina, tal como el mitógeno de la hierba carmesí (PWM, 1 $\mu\text{g/ml}$, Sigma Aldrich). El día 6, se lavaron las células y se les añadieron los anticuerpos biespecíficos $F(ab')_2$ (a saber, el formato de anticuerpo $F(ab')_2$). El día 10, la cantidad de la IgG de humano en el sobrenadante se midió por ELISA. Los anticuerpos biespecíficos analizados eran específicos de la acción selectiva sobre CD20XCD95 (círculo relleno) o bien sobre CD40xCD95 (triángulos). A modo de comparación, se analizó en paralelo un anticuerpo biespecífico (a saber, el formato de anticuerpo $F(ab')_2$) con especificidad por una diana sin relación dirigido contra la proteína myc intracelular (MycXCD95) (círculo hueco).

20 Conclusión:

Los anticuerpos biespecíficos Fab_2 con especificidad de tipo CD20XCD95 o CD40xCD95 suprimen la producción *in vitro* de IgG desde los linfocitos B activados de humano, y no lo hicieron los anticuerpos con especificidad por MycXCD95.

Ejemplo 8: Supresión de la producción de IgG específica de la toxina del tétanos

25 Las CMSP de un donante recién vacunado con la toxina del tétanos se estimularon con la toxina del tétanos (25 ng/ml, Calbiochem, Merck Darmstadt, Alemania) durante 4 días, se lavaron, y se incubaron con los anticuerpos indicados (1 $\mu\text{g/ml}$) durante 8 días. El día 12, la cantidad de anticuerpos antitetánicos específicos se determinó por ELISA. El NA-C20 es el anticuerpo biespecífico recombinante CD20XCD95 en el formato bsFabXsc representado en la figura 1B. Los resultados se dan a conocer en la figura 8.

30 Conclusión: El NA-C20, anticuerpo biespecífico recombinante CD20XCD95, y el anticuerpo anti-CD20 mono específico rituxan suprimen la producción *in vitro* de los anticuerpos específicos contra la toxina de tétanos. Resultan ineficaces los correspondientes anticuerpos mono específicos y biespecíficos con especificidad por una diana sin relación dirigidos contra el receptor de EGF (Erbix) o contra el CD95 y el proteoglicano asociado al melanoma (NA-CMeI), respectivamente. El NA-CMeI es un anticuerpo biespecífico recombinante del mismo formato que NA-C20.

35 **Listado de secuencias**

<110> Jung, Gundram

<120> ANTICUERPOS BIESPECÍFICOS PARA USO MÉDICO

<130> BA002P

<160> 25

40 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 112

<212> PRT

<213> artificial

45 <220>

<223> Secuencia VL

<400> 1

ES 2 716 823 T3

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr
20 25 30

Gly Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Val Ala Ser Asn Val Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His
65 70 75 80

Pro Val Glu Glu Asp Asp Ile Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Thr
85 90 95

Lys Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

<210> 2
<211> 15
<212> PRT
<213> artificial

5

<220>
<223> Secuencia CDR

<400> 2
Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr Gly Thr Ser Leu Met Gln
1 5 10 15

10

<210> 3
<211> 7
<212> PRT
<213> artificial

15

<220>
<223> Secuencia CDR

<400> 3
Val Ala Ser Asn Val Glu Ser
1 5

20

<210> 4
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia CDR

25

<400> 4
Gln Gln Ser Thr Lys Val Pro Trp Thr
1 5

<210> 5
<211> 115
<212> PRT
<213> artificial

30

<220>
<223> Secuencia VH

ES 2 716 823 T3

<400> 5
 Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Asn
 20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Arg Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
 50 55 60

Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Met
 65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Met Tyr
 85 90 95

Tyr Cys Val Thr Asp Gly Tyr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

5 <210> 6
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> artificial

10 <220>
 <223> Secuencia CDR

<400> 6
 Thr Asn Ala Met Asn
 1 5

15 <210> 7
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> Secuencia CDR

20 <400> 7
 Arg Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser
 1 5 10 15
 Val Lys Asp

25 <210> 8
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> Secuencia CDR

<400> 8
 Asp Gly Tyr Tyr
 1

30 <210> 9
 <211> 111
 <212> PRT

ES 2 716 823 T3

<213> artificial

<220>

<223> Secuencia VL

<400> 9

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr
20 25 30

Gly Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Val Ala Ser Asn Val Glu Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Thr
85 90 95

Lys Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

5

<210> 10

<211> 115

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Secuencia VH

<400> 10

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Asn
20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Arg Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
50 55 60

Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Val Thr Asp Gly Tyr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

15

ES 2 716 823 T3

<210> 11
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> artificial

5 <220>
 <223> Secuencia VL

<400> 11
 Asp Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15

 Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
 35 40 45

 Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu
 65 70 75 80

 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Phe Asn Pro Pro Thr
 85 90 95

 Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105

10 <210> 12
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> Secuencia CDR

15 <400> 12
 Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 1 5

20 <210> 13
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> Secuencia CDR

<400> 13
 Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser
 1 5

25 <210> 14
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> artificial

30 <220>
 <223> Secuencia CDR

<400> 14

ES 2 716 823 T3

Gln Gln Trp Ser Phe Asn Pro Pro Thr
 1 5
 <210> 15
 <211> 122
 <212> PRT
 5 <213> artificial
 <220>
 <223> Secuencia VH
 <400> 15
 Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
 100 105 110
 10 Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 16
 <211> 5
 <212> PRT
 15 <213> artificial
 <220>
 <223> Secuencia CDR
 <400> 16
 Ser Tyr Asn Met His
 1 5
 20 <210> 17
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 25 <223> Secuencia CDR
 <400> 17
 Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 18

ES 2 716 823 T3

<211> 13
 <212> PRT
 <213> artificial

 5 <220>
 <223> Secuencia CDR

 <400> 18
 Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
 1 5 10

 10 <210> 19
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> artificial

 <220>
 <223> Secuencia VL

 <400> 19
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Leu Ile Tyr
 35 40 45

 Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
 65 70 75 80

 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Phe Asn Pro Pro Thr
 85 90 95

 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

 20 <210> 20
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> artificial

 <220>
 <223> Secuencia VH

 <400> 20

ES 2 716 823 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

- 5 <210> 21
- <211> 218
- <212> PRT
- <213> artificial
- <220>
- <223> Secuencia LC
- 10 <400> 21

ES 2 716 823 T3

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr
20 25 30

Gly Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Val Ala Ser Asn Val Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His
65 70 75 80

Pro Val Glu Glu Asp Asp Ile Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Thr
85 90 95

Lys Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

5 <210> 22
<211> 585
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia HC

10 <400> 22

ES 2 716 823 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Asn
 20 25 30
 Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Arg Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
 50 55 60
 Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Met
 65 70 75 80
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Met Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Val Thr Asp Gly Tyr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 115 120 125
 Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140
 Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160
 Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 165 170 175
 Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 180 185 190

ES 2 716 823 T3

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 195 200 205

Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Ser
 210 215 220

Pro Pro Ser Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 245 250 255

Thr Cys Val Val Val Gly Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
 260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 275 280 285

Arg Glu Glu Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 290 295 300

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 305 310 315 320

Ser Asn Lys Gln Leu Pro Ser Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 325 330 335

Lys Gly Gln Pro Ser Gly Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu
 340 345 350

Leu Val Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly
 355 360 365

Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg
 370 375 380

Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr
 385 390 395 400

Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415

Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp
 420 425 430

Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr

ES 2 716 823 T3

435 440 445

Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
450 455 460

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp
465 470 475 480

Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu
485 490 495

Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
500 505 510

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala
515 520 525

Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly
530 535 540

Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp
545 550 555 560

Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe
565 570 575

Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
580 585

<210> 23
<211> 15
<212> PRT
<213> artificial

5

<220>
<223> Enlazador

<400> 23
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

10

<210> 24
<211> 218
<212> PRT
<213> artificial

15

<220>
<223> Secuencia LC
<400> 24

ES 2 716 823 T3

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr
 20 25 30

Gly Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Val Ala Ser Asn Val Glu Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Thr
 85 90 95

Lys Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 25
 <211> 585
 <212> PRT
 <213> artificial

5

<220>
 <223> Secuencia HC

<400> 25

ES 2 716 823 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Asn
 20 25 30
 Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Arg Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
 50 55 60
 Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Val Thr Asp Gly Tyr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 115 120 125
 Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140
 Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160
 Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 165 170 175
 Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 180 185 190
 Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 195 200 205
 Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Ser
 210 215 220
 Pro Pro Ser Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 225 230 235 240

ES 2 716 823 T3

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 245 250 255

Thr Cys Val Val Val Gly Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
 260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 275 280 285

Arg Glu Glu Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 290 295 300

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 305 310 315 320

Ser Asn Lys Gln Leu Pro Ser Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 325 330 335

Lys Gly Gln Pro Ser Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu
 340 345 350

Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
 355 360 365

Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 370 375 380

Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr
 385 390 395 400

Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr
 405 410 415

Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp
 420 425 430

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr
 435 440 445

Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 450 455 460

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp
 465 470 475 480

Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp
 485 490 495

ES 2 716 823 T3

Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
500 505 510

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Leu Ile Tyr Ala
515 520 525

Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
530 535 540

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp
545 550 555 560

Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe
565 570 575

Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
580 585

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo biespecífico para ser usado en el tratamiento o la prevención de una enfermedad autoinmunitaria mediada por los linfocitos B, en donde el anticuerpo es un Fab₂ biespecífico que comprende dos fragmentos Fab con diferente especificidad por un primer antígeno y un segundo antígeno, o en donde el anticuerpo comprende:
- 5 - un fragmento Fab que comprende un primer sitio de fijación para un primer antígeno;
- un fragmento scFv que comprende un segundo sitio de fijación para un segundo antígeno; y
- un dominio CH2, en donde el fragmento Fab y el fragmento scFv están conectados a través del dominio CH2, en donde el primer antígeno es CD95 y el segundo antígeno es CD20 o CD40.
2. Anticuerpo biespecífico para ser usado de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el segundo antígeno es CD20.
- 10 3. Anticuerpo biespecífico para ser usado de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde la enfermedad autoinmunitaria mediada por los linfocitos B se selecciona del grupo que consiste en lupus eritematoso diseminado, síndrome de Sjögren, esclerodermia, artritis reumatoide, artritis idiopática juvenil, enfermedad de injerto contra huésped, dermatomiositis, diabetes sacarina de tipo 1, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Graves, enfermedad de Addison, celiaquía, enfermedad de Crohn, anemia perniciosa, pénfigo vulgar, vitiligo, anemia hemolítica autoinmunitaria, púrpura trombocitopénica idiopática, arteritis de células gigantes, miastenia grave, esclerosis múltiple
- 15 (EM), preferiblemente EM con recaídas y remisiones (EMRR), glomerulonefritis, síndrome de Goodpasture, pénfigo vesicular, colitis ulcerosa, síndrome de Guillain-Barré, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, síndrome antifosfolípido, narcolepsia, sarcoidosis y granulomatosis de Wegener.
- 20 4. Anticuerpo biespecífico para ser usado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el sitio de fijación que se fija a CD20 comprende seis regiones determinantes de la complementariedad de los dominios variables de anticuerpo (CDR1 a CDR6), en donde
- A)
- i) CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos RASSSVSYM (SEQ ID 12);
- ii) CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos APSNLAS (SEQ ID 13);
- 25 iii) CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos QQWSFNPPT (SEQ ID 14);
- iv) CDR4 comprende la secuencia de aminoácidos SYNMH (SEQ ID 16);
- v) CDR5 comprende la secuencia de aminoácidos AIYPGNGDTSYNQKFKG (SEQ ID 17); y
- vi) CDR6 comprende la secuencia de aminoácidos VVYYSNSYWFYFDV (SEQ ID 18);
- o
- 30 B) una variante funcionalmente activa del mismo, en donde al menos una de
- i) CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 70% con la secuencia de aminoácidos RASSSVSYM (SEQ ID 12);
- ii) CDR2 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 70% con la secuencia de aminoácidos APSNLAS (SEQ ID 13);
- 35 iii) CDR3 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 70% con la secuencia de aminoácidos QQWSFNPPT (SEQ ID 14);
- iv) CDR4 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 70% con la secuencia de aminoácidos SYNMH (SEQ ID 16);
- v) CDR5 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 70% con la secuencia de aminoácidos AIYPGNGDTSYNQKFKG (SEQ ID 17); y/o
- 40 vi) CDR6 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 70% con la secuencia de aminoácidos VVYYSNSYWFYFDV (SEQ ID 18).
5. Anticuerpo biespecífico para ser usado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende

un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID 11 y un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID 15, o una variante humanizada funcionalmente activa del mismo.

5 6. Anticuerpo biespecífico para ser usado de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la variante humanizada comprende un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID 19 y un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID 20.

7. Anticuerpo biespecífico para ser usado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el sitio de fijación que se fija a CD95 comprende seis regiones determinantes de la complementariedad de los dominios variables de anticuerpo (CDR1 a CDR6), en donde

A)

10 i) CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos RASESVEYYGTSLMQ (SEQ ID 2);

ii) CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos VASNVES (SEQ ID 3);

iii) CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos QQSTKVPWT (SEQ ID 4);

iv) CDR4 comprende la secuencia de aminoácidos TNAMN (SEQ ID 6);

v) CDR5 comprende la secuencia de aminoácidos RIRSKSNNYATYYAESVKD (SEQ ID 7); y

15 vi) CDR6 comprende la secuencia de aminoácidos DGY Y (SEQ ID 8);

o

B) una variante funcionalmente activa del mismo, en donde al menos una de

i) CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 70% con la secuencia de aminoácidos RASESVEYYGTSLMQ (SEQ ID 2);

20 ii) CDR2 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 70% con la secuencia de aminoácidos VASNVES (SEQ ID 3);

iii) CDR3 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 70% con la secuencia de aminoácidos QQSTKVPWT (SEQ ID 4);

25 iv) CDR4 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 70% con la secuencia de aminoácidos TNAMN (SEQ ID 6);

v) CDR5 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 70% con la secuencia de aminoácidos RIRSKSNNYATYYAESVKD (SEQ ID 7); y/o

vi) CDR6 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 70% con la secuencia de aminoácidos DGY Y (SEQ ID 8).

30 8. Anticuerpo biespecífico para ser usado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID 1 y un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID 5, o una variante humanizada funcionalmente activa del mismo.

35 9. Anticuerpo biespecífico para ser usado de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la variante humanizada comprende un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID 9 y un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID 10.

10. Anticuerpo biespecífico para ser usado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende una secuencia de cadena ligera de SEQ ID 21 y una secuencia de cadena pesada de SEQ ID 22, o una variante humanizada funcionalmente activa del mismo.

40 11. Anticuerpo biespecífico para ser usado de acuerdo con la reivindicación 10, en donde la variante humanizada comprende una secuencia de cadena ligera de SEQ ID 24 y una secuencia de cadena pesada de SEQ ID 25.

12. Anticuerpo biespecífico para ser usado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que se fija a CD20 con una $K_d < 10^{-8}$ M y/o que se fija a CD95 con una $K_d < 10^{-8}$ M.

13. Anticuerpo biespecífico para ser usado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en una politerapia con otro tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria mediada por los linfocitos B, preferiblemente una politerapia

con tratamiento de citocinas, o tratamiento con otros formatos de anticuerpo o agentes.

Fig. 1

Fig. 1A

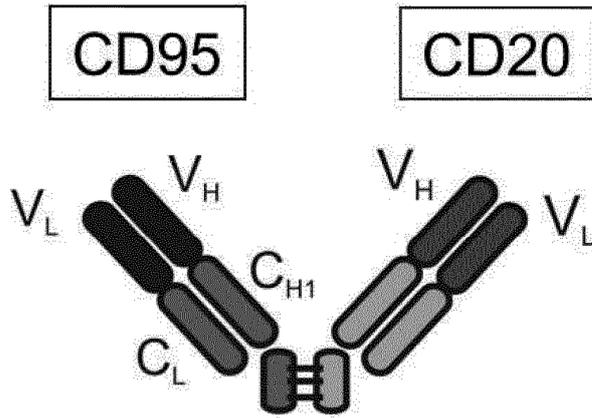


Fig. 1B:

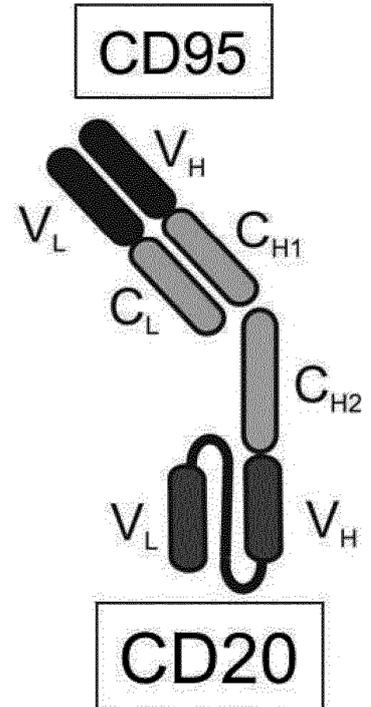


Fig. 2:

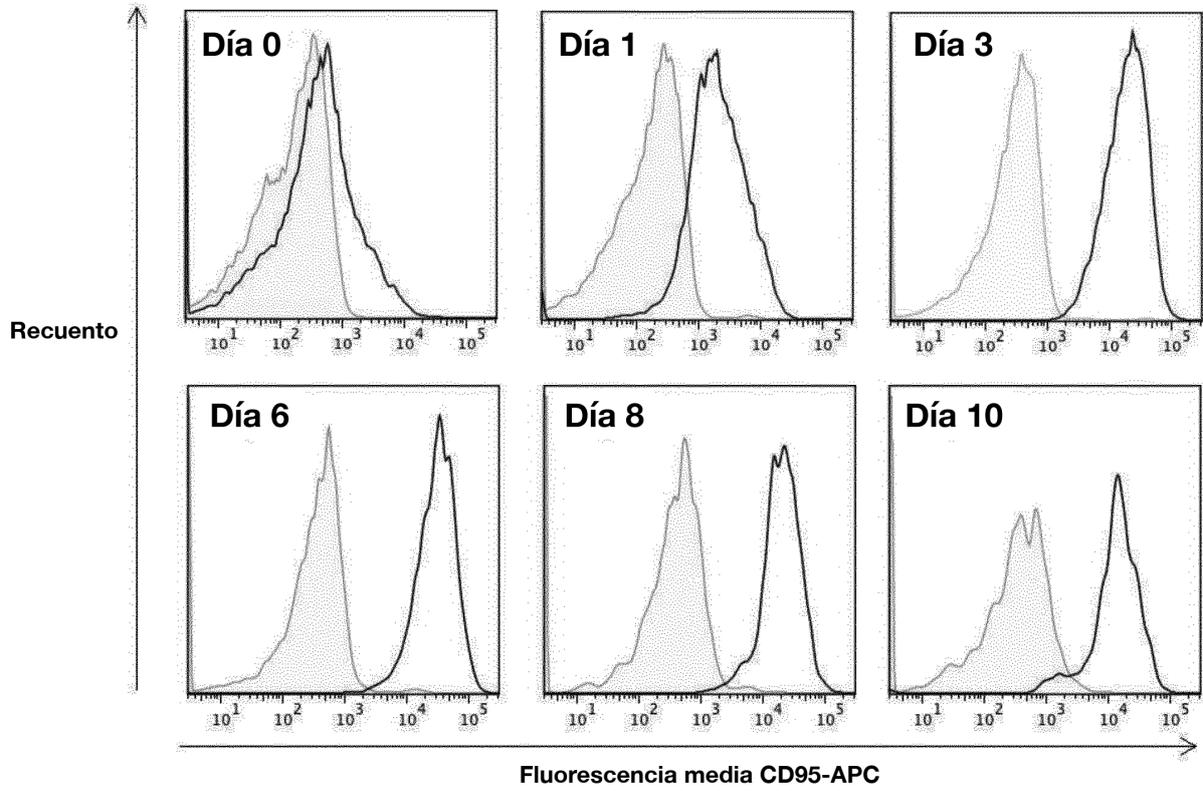


Fig. 3:

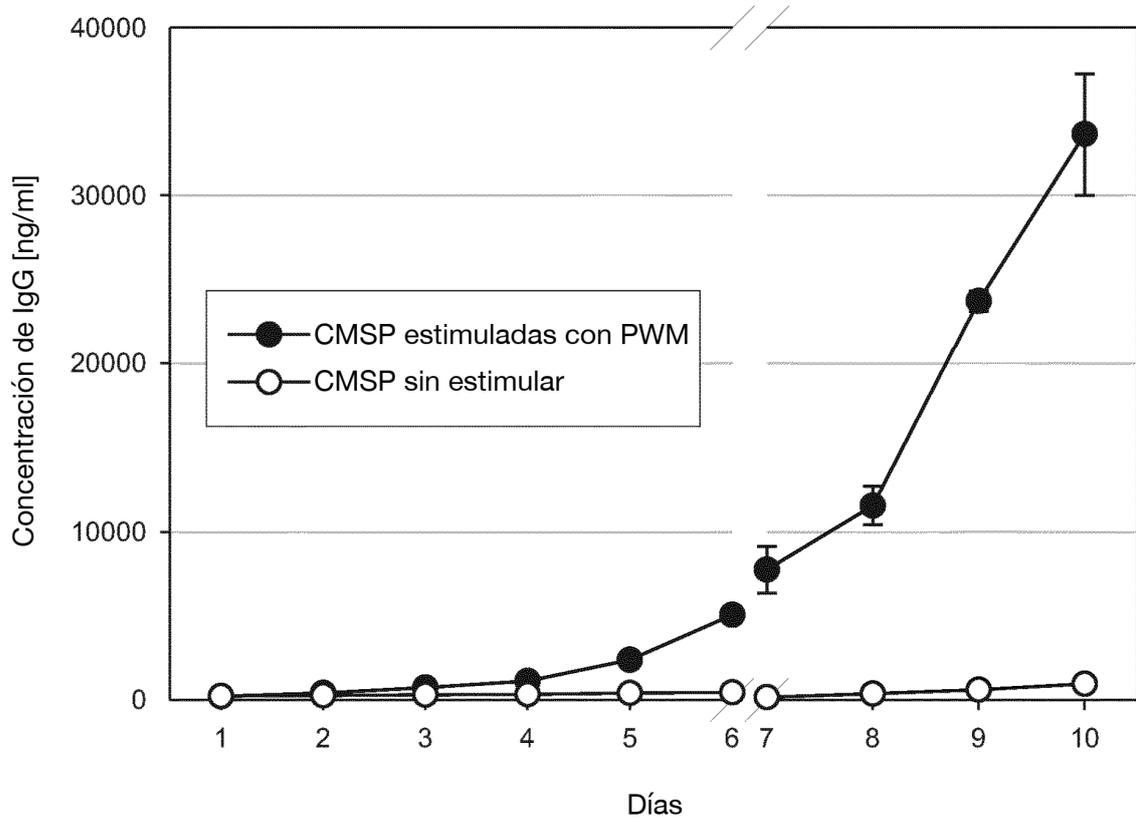


Fig. 4

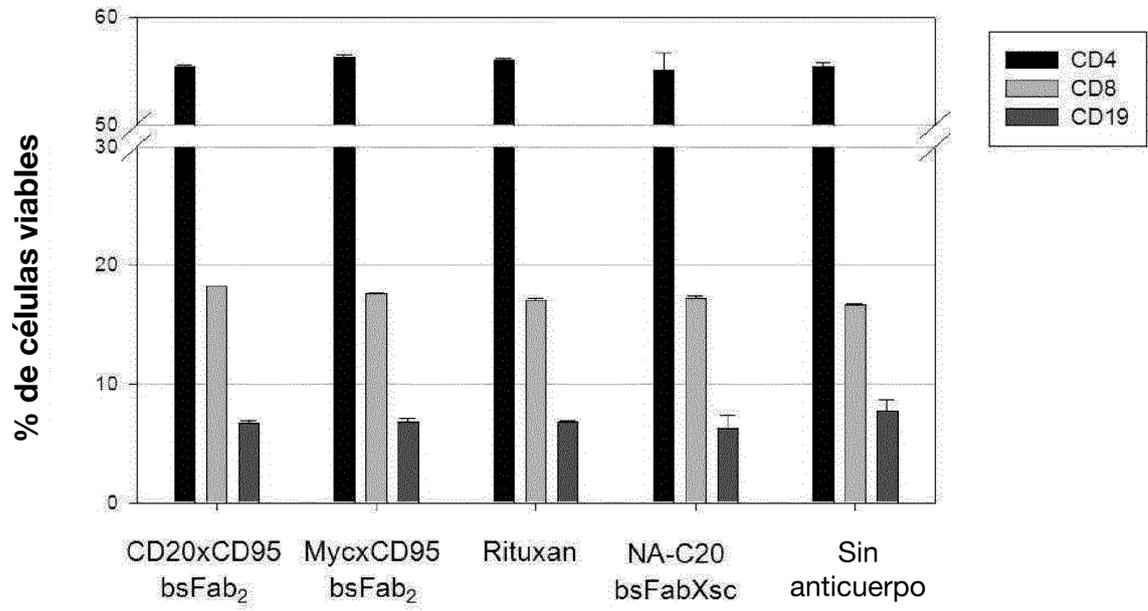


Fig. 5

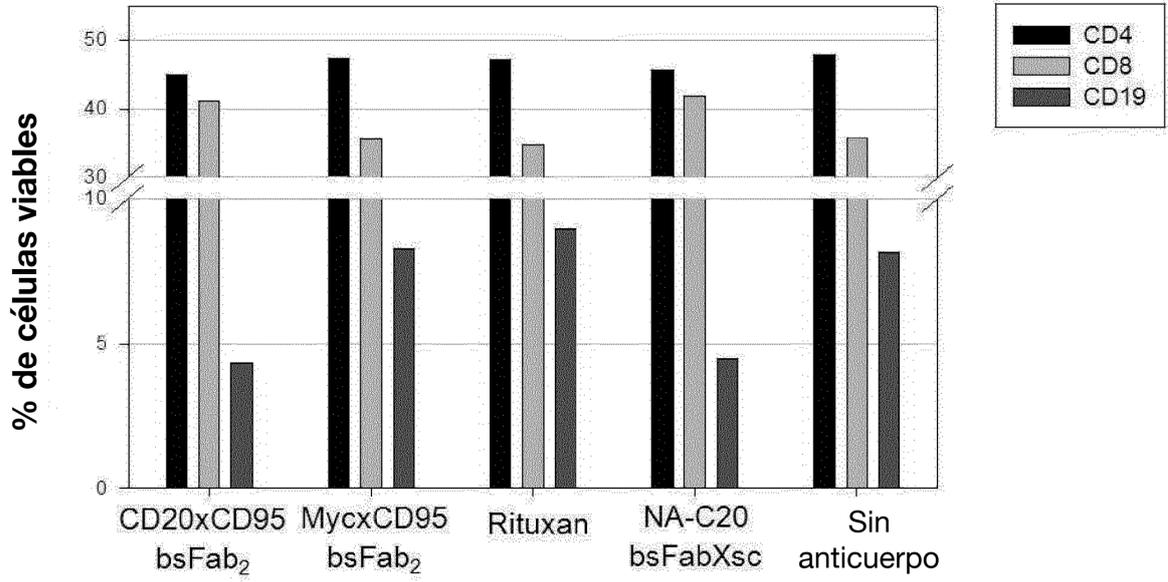


Fig. 6

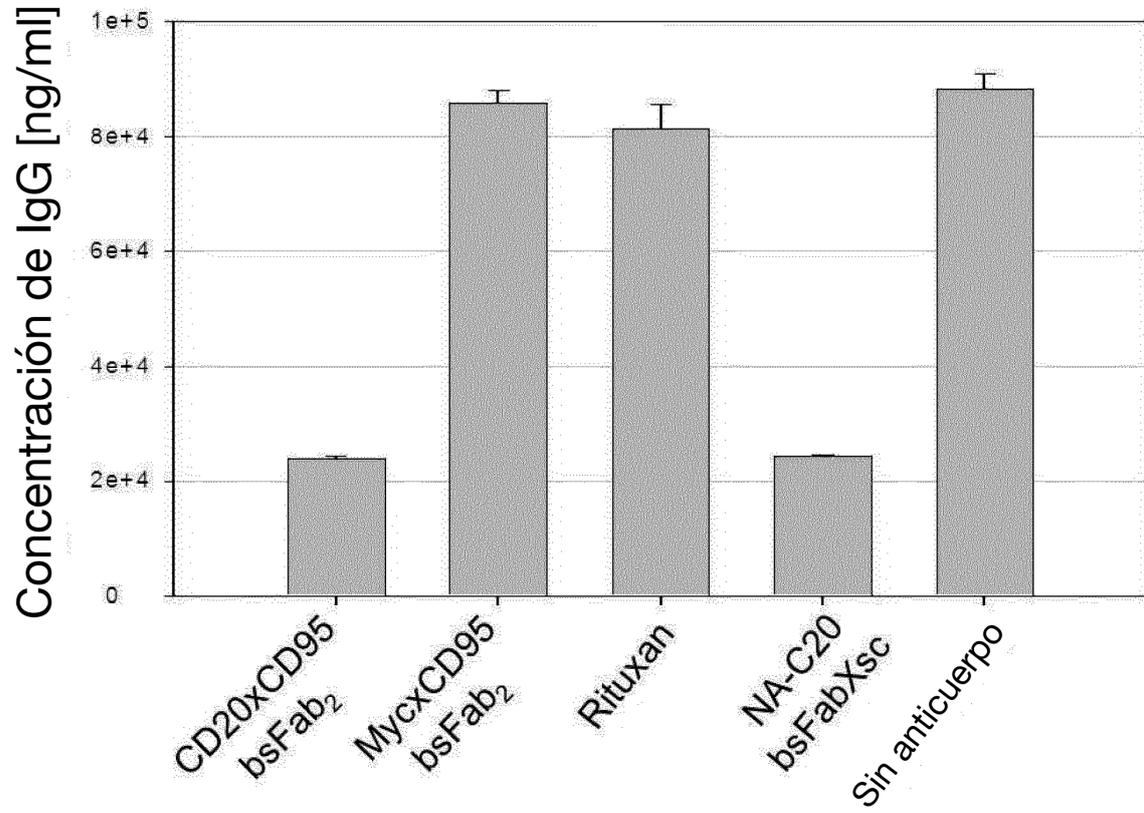


Fig. 7A

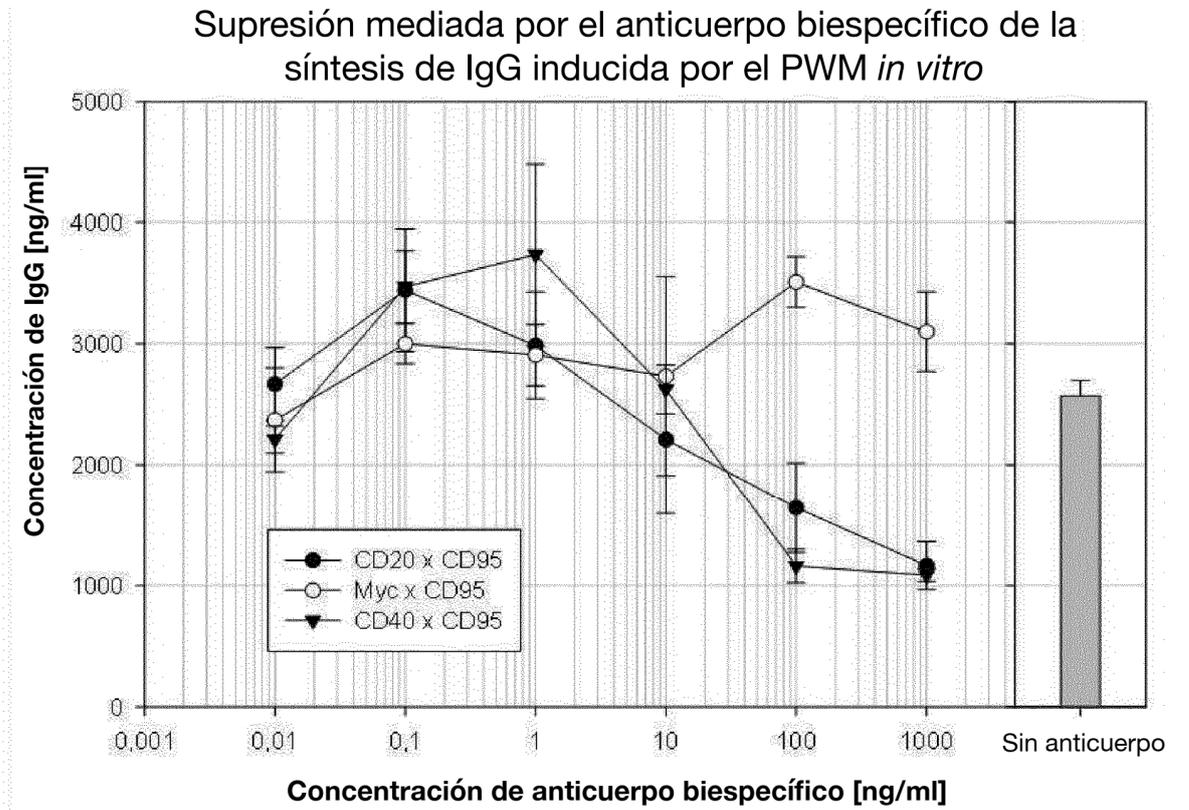


Fig. 7B

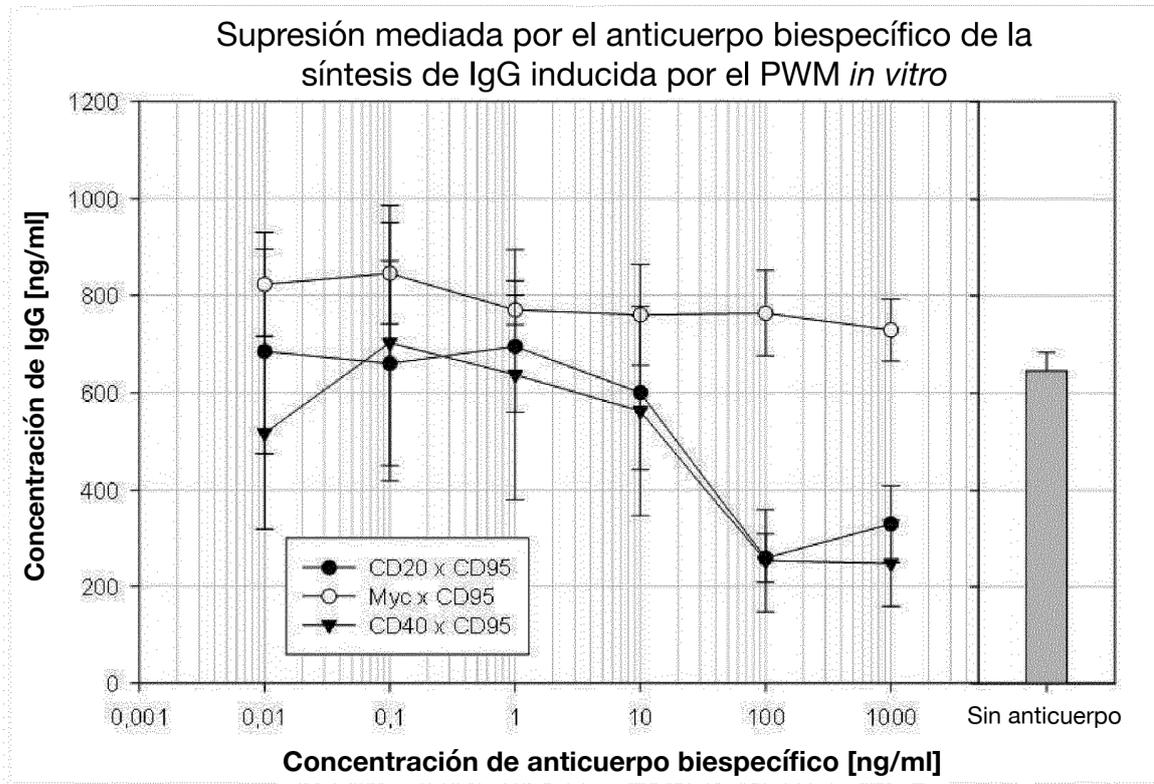
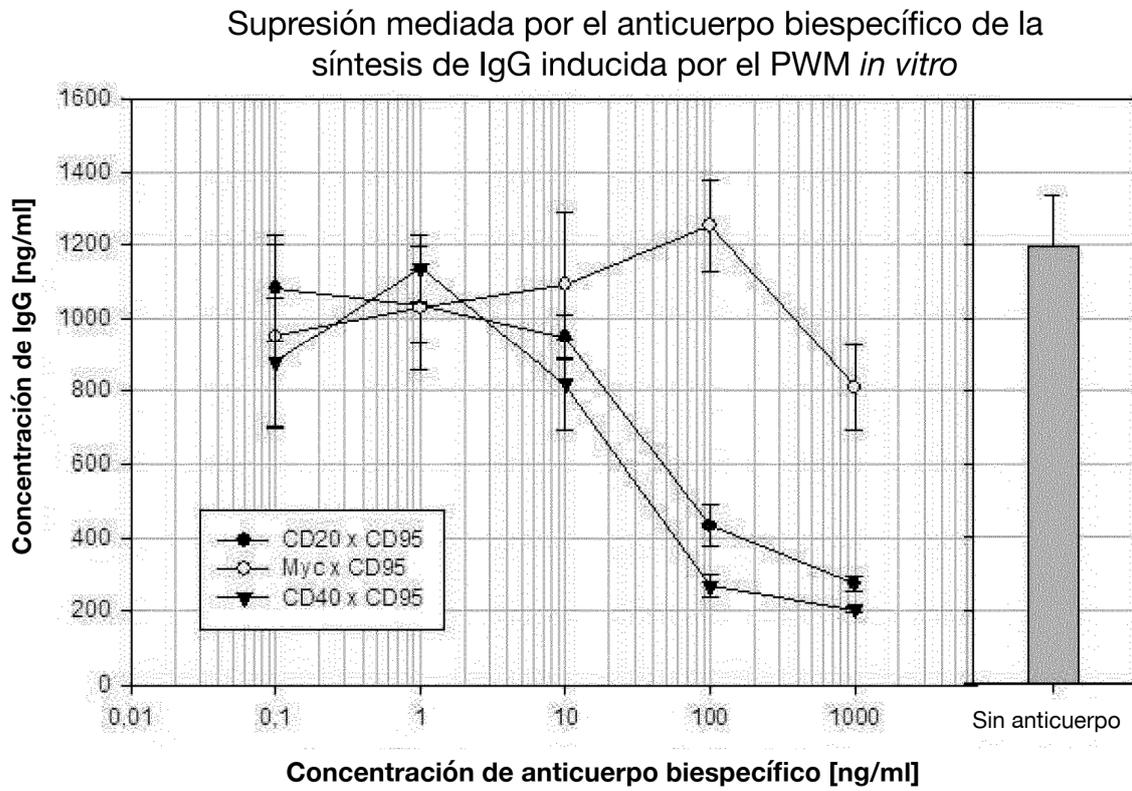


Fig. 7C



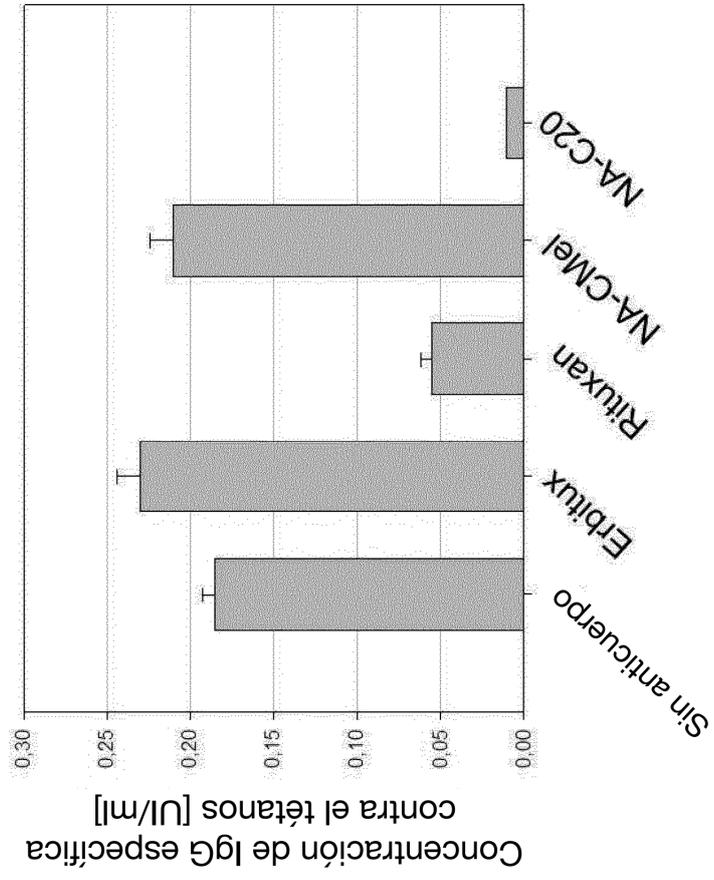


Fig. 8

Fig. 9

Fig. 9A: secuencias murinas de un anticuerpo anti-CD95 (Apo-1)

5

>APO-VL
Subgrupo III κ de ratón

SEQ ID 1:
DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVEYYGTSMLQWYQQKPGQPPKLLIYVASNVES
GVPARFSGSGSGTDFSLNIHPVEEDDIAMYFCQQSTKVPWTFGGGKLEIKR

CDR-L1: RASESVEYYGTSMLQ (SEQ ID 2)
CDR-L2: VASNVES (SEQ ID 3)
CDR-L3: QQSTKVPWT (SEQ ID 4)

10

15

>APO-VH
Subgrupo IIIδ pesada de ratón

SEQ ID 5:
EVQLVETGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNTNAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKSNNYAT
YYAESVKDRFTISRDDSQSMLYLQMNLLKAEDTAMYYCVTDGYYWGQGTTLTVSS

CDR-H1: TNAMN (SEQ ID 6)
CDR-H2: RIRSKSNNYATYYAESVKD (SEQ ID 7)
CDR-H3: DGY (SEQ ID 8)

20

25

30

Fig. 9B: secuencias humanizadas de un anticuerpo anti-CD95 (Apo-1)

>humApo-VL
Subgrupo IV κ de humano

SEQ ID 9:
DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCRASESVEYYGTSMLQWYQQKPGQPPKLLIYVASNVES
GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYFCQQSTKVPWTFGQGTKLEIK

>humApo-VH
Subgrupo III de humano

SEQ ID 10:
EVQLVESGGGLVQPKGSLRSLCAASGFTFNTNAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKSNNYAT
YYAESVKDRFTISRDDSKNTLYLQMNLSLKTEDTAVYYCVTDGYYWGQGTTLTVSS

35

40

45

50

Fig. 9C: secuencias murinas de anticuerpo anti-CD20

5 >CD20-VL (número de acceso M17953)
Subgrupo VI κ de ratón

SEQ ID 11:
DIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYMHWYQOKPGSSPKPWIYAPSNLASGVPARFS
10 GSGSGTYSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSFNPPTFGAGTKLELK

CDR-L1: RASSSVSYM (SEQ ID 12)
CDR-L2: APSNLAS (SEQ ID 13)
CDR-L3: QQWSFNPP (SEQ ID 14)

15 >CD20-VH (número de acceso M17954)
Subgrupo IIb pesada de ratón

SEQ ID 15:
20 QAYLQQSGAELVRPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPRQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQK
EKGKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARVVVYYSNSYWFVDVWGTTVTVSS

CDR-H1: SYNMH (SEQ ID 16)
CDR-H2: AIYPGNGDTSYNQKFKG (SEQ ID 17)
25 CDR-H3: VVYYSNSYWFVDV (SEQ ID 18)

Fig. 9D: secuencias humanizadas de anticuerpo anti-CD20

30 >humCD20-VL
Subgrupo I κ de humano

SEQ ID 19:
35 DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASSSVSYMHWYQOKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFS
GSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWSFNPPTFGQGTKLEIK

>humCD20-VH
40 Subgrupo I de humano

SEQ ID 20:
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAPGQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQK
45 EKGRVTITRDTASASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARVVVYYSNSYWFVDVWGQTLVTVSS

Fig. 9E: Anticuerpo biespecífico CD95xCD20 (formato bsFabXsc, representado en la fig. 1B)

i) versiones quiméricas

5 cadena ligera (versión quimérica):

CD95-VJ + CL de humano (κ); cadena ligera quimérica **sin** péptido líder

SEQ ID 21:

10 1 DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASESVE YYGTSLMQWY QQKPGQPPKL
 51 LIYVASNVES GVPARFSGSG SGTDFSLNIH PVEEDDIAMY FCQQSTKVPW
 101 TFGGGTKLEI KRTVAAPSVE IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV
 151 QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS STLTLKADY EKHKVYACEV
 201 THQGLSSPVT KSFNRGEC*

15 Aminoácidos 1 a 111: anti-CD95 VJ (ratón)
 subrayado: cadena κ constante de humano

20 cadena pesada (versión quimérica):

CD95-VDJ + CH1 de humano + bisagra + CH2 modificado + CD20scFV (VH-VL)

cadena pesada quimérica **sin** péptido líder

25

SEQ ID 22:

1 EVQLVETGGG LVQPKGSLKL SCAASGFTFN TNAMNWRQA PGKGLEWVAR
 51 IRSKSNNYAT YYAESVKDRF TISRDDSQSM LYLQMNLLKA EDTAMYCVT
 101 DGYVWGQGT LTVSSASTKG PSVFPLAPSS KSTSGGTAAL GCLVKDYFPE
 30 151 PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA VLQSSGLYSL SSVVTVPSST LGTQTYICNV
 201 NHKPSNTKVD KKVEPKSCDK THTSPPSPAP PVAGPSVFLF PPKPKDTLMI
 251 SRTPEVTCVV VGVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYQSTYRVV
 301 SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKQLPSPLE KTISKAKGQP SGQAYLQQSG
 351 AELVVRPGASV KMSCKASGYT FTSYMHVVK QTPRQGLEWI GAIYPGNGDT
 35 401 SYNQKFKGKA TLTVDKSSST AYMQLSSLTS EDSAVYFCAR VVYYSNSYWY
 451 FDVWGTGTTV TVSSGGGGSG GGGSGGGGSD IVLSQSPAIL SASPGKVTM
 501 **TCRASSSVSY MHWYQKPGS SPKPWIYAPS NLAGVPARF SGSGSGTSYS**
 551 **LTISRVEAED AATYYCQWS FNPPTFGAGT KLELK****

40

- Aminoácidos 1 a 115: VDJ anti-CD95 (ratón)
 - Aminoácidos subrayados: CH1 de humano, bisagra modificada y CH2 modificado seguido por **GQP** (= primeros tres aminoácidos de CH3) seguido por los aminoácidos SG

45

- En *cursiva*, aminoácidos 343 a 464 anti-CD20 (VH) GenBank n.º M17953
 - GGGSGGGGGSGGGGA (SEQ ID 23) elemento conector entre Vh y Vl
 - En **negrita**, aminoácidos 480 hasta al final (585) anti-CD20 (VL) GenBank n.º M17954

50

Fig. 9E (continúa)

ii) versiones humanizadas

5 CD95-VJ humanizado + CL de humano

SEQ ID 24:

```

10      1  DIVMTQSPDLSLAVSLGERATISCRASESVEYYGTSMLQWYQQKPGQPPKLLIYVSNVES 60
      61  -----+-----+-----+-----+-----+-----+
      61  GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYFCQQSTKVPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVF 120
      15  121  -----+-----+-----+-----+-----+-----+
      121  IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL 180
      181  -----+-----+-----+-----+-----+-----+
      181  STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC* 219
20

```

CD95-VDJ-CH1-H-CH2 humanizado (atenuado) - CD20scFv humanizado (VH-VL)

25 SEQ ID 25:

```

30      1  EVQLVESGGGLVLPKGGSLRLSCAASGFTTFNTNAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKSNNYAT 60
      61  -----+-----+-----+-----+-----+-----+
      30  61  YYAESVKDRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCVTDGYWYWGQGTTLTVSSASTKG 120
      121  -----+-----+-----+-----+-----+-----+
      35  121  PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPEVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL 180
      181  -----+-----+-----+-----+-----+-----+
      181  SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTSPSPSPAPPVAGPSVFLF 240
      241  -----+-----+-----+-----+-----+-----+
      40  241  PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVGVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVV 300
      301  -----+-----+-----+-----+-----+-----+
      301  SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKQLPSPIEKTIKAKGQPSGQVQLVQSGAEVKKPGASV 360
      361  -----+-----+-----+-----+-----+-----+
      45  361  KVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAPGQGLEWIGAIYPNGDTSYNQKFKGRVTITRDTSAST 420
      421  -----+-----+-----+-----+-----+-----+
      421  AYMELSSLRSEDTAVYYCARVVYYSNSYWFYFDVWGQGLVTVSSGGGGSGGGGGGGSD 480
      481  -----+-----+-----+-----+-----+-----+
      50  481  IQMTQSPSSLSASVGRVITICRASSSVSYMHYQQKPKAPKPLIYAPSNLASGVPSRF 540
      541  -----+-----+-----+-----+-----+-----+
      55  541  SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSEFNPPTFGQGTKLEIK** 587

```