

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 718 399**

51 Int. Cl.:

C07K 16/46 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/32 (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.07.2014 PCT/US2014/046003**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **15.01.2015 WO15006482**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.07.2014 E 14823231 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.01.2019 EP 3019532**

54 Título: **Moléculas que se acoplan a anticuerpos EGFRVIII biespecíficas humanas**

30 Prioridad:

09.07.2013 US 201361844119 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.07.2019

73 Titular/es:

**DUKE UNIVERSITY (50.0%)
2812 Erwin Road, Suite 306 P.O. Box 90083
Durham, North Carolina 27705, US y
THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES, AS
REPRESENTED BY THE SECRETARY OF THE
DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN
SERVICES (50.0%)**

72 Inventor/es:

**BIGNER, DARELL D.;
SAMPSON, JOHN;
KUAN, CHIEN-TSUN;
CAI, MINGQING;
CHOI, BRYAN D.;
GEDEON, PATRICK C. y
PASTAN, IRA H.**

74 Agente/Representante:

DURAN-CORRETJER, S.L.P

ES 2 718 399 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

Moléculas que se acoplan a anticuerpos EGFRVIII biespecíficas humanas

5 SECTOR TÉCNICO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al área de la terapia del cáncer. En particular, se refiere al tratamiento de cánceres que expresan EGFRVIII y agentes para hacerlo.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El tumor cerebral maligno primario más común, el glioblastoma multiforme (GBM), sigue siendo uniformemente fatal a pesar de la resección quirúrgica, terapia de radiación y quimioterapia (1). La inmunoterapia promete inducir respuestas inmunitarias robustas, específicas de tumores, que eliminan células neoplásicas con especificidad no paralela sin añadir toxicidad adicional a la terapia de multimodalidad. Existen pruebas sustanciales que apoyan el papel de las células T en la erradicación del cáncer. Recientemente, el concepto de utilizar anticuerpos específicos para redirigir las células T se ha optimizado en forma de moléculas de acoplamiento de células T biespecíficas recombinantes o moléculas que se acoplan a células T biespecíficas, que consisten en un anticuerpo de cadena única que reconoce el tumor conectado a un anticuerpo de cadena única dirigido contra un ligando de activación de células T, tal como CD3. Estas moléculas que se acoplan a células T biespecíficas puede enlazar las células T a las células tumorales, lo que da lugar a una activación muy localizada y específica de células T con una lisis concomitante de células tumorales. Recientemente, ensayos en humanos utilizando una molécula que se acopla a células T biespecíficas CD19xCD3 confirmaron la potencia de estas construcciones mediante la regresión del tumor observada en 7/7 pacientes con linfoma no Hodgkin a una dosis de solamente 0,06 mg/m² con una depuración del tumor de la sangre, médula ósea e hígado (4). La limitación más significativa de estas construcciones prometedoras, sin embargo, es la falta de dianas específicas de tumor que se expresan con frecuencia y de forma homogénea.

Es menos probable que los antígenos específicos de tumores derivados de las mutaciones en genes somáticos se asocien con la autoinmunidad, pero, a menudo, surgen al azar como resultado de la inestabilidad genética de los tumores y, como tales, tienden a ser específicos del paciente y relacionados con el proceso oncogénico. EGFRVIII, sin embargo, es una mutación específica de tumor frecuente y consistente, central en el proceso neoplásico, que consiste en una delección en el marco de 801 pares de bases del dominio extracelular (ECD) del EGFR que divide un codón y produce una nueva glicina en el punto de fusión. Esta mutación codifica una tirosina quinasa constitutivamente activa que aumenta el crecimiento y la migración de células neoplásicas y confiere resistencia a la radiación y la quimioterapia a las células tumorales. La mutación EGFRVIII se observa con mayor frecuencia en pacientes con GBM, pero se ha encontrado en una amplia variedad de otros cánceres comunes. La nueva glicina insertada en el punto de fusión de las partes normalmente distantes del ECD da lugar a un epítipo específico de tumor que no se encuentra en todos los tejidos normales.

Existe una continua necesidad en la técnica de encontrar tratamientos mejores y más exitosos contra cánceres tales como cánceres de cerebro. Choi y otros, PNAS 2013; 110 (1): 270-5 y Zitron y otros, Cancer BMC 2013; 13:83 dan a conocer ambos anticuerpos biespecíficos dirigidos a EGFR y CD3, pero ninguno da a conocer los anticuerpos específicos de la presente invención.

45 CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

Un aspecto de la presente invención es un polipéptido biespecífico. El polipéptido biespecífico comprende una primera región variable de cadena única humana que se une a EGFRVIII. La primera región variable de cadena única está en serie en orden de extremo amino a carboxilo con una segunda región variable de cadena única humana. La segunda región variable de cadena única se une al ligando CD3 de activación de células T. La primera región variable de cadena única comprende segmentos codificados por las SEQ ID NO: 5 y 6 en orden de extremo amino a carboxilo. La segunda región variable de cadena única comprende segmentos codificados por las SEQ ID NO: 7 y 8 en orden de extremo amino a carboxilo.

Otro aspecto de la presente invención es un polinucleótido que codifica el polipéptido biespecífico. El polipéptido biespecífico comprende una primera región variable de cadena única humana que se une a EGFRVIII. La primera región variable de cadena única está en serie en orden de extremo amino a carboxilo con una segunda región variable de cadena única humana. La segunda región variable de cadena única se une al ligando CD3 de activación de células T. La primera región variable de cadena única comprende segmentos codificados por las SEQ ID NO: 5 y 6 en orden de extremo amino a carboxilo. La segunda región variable de cadena única comprende segmentos codificados por las SEQ ID NO: 7 y 8 en orden de extremo amino a carboxilo. En la SEQ ID NO: 1 se muestra un polinucleótido particular que codifica el polipéptido biespecífico.

Otro aspecto de la presente invención es el polipéptido biespecífico para utilizar en el tratamiento de un paciente con un tumor que expresa EGFRVIII, mediante el cual se induce una respuesta de las células T citolíticas al tumor. El polipéptido biespecífico comprende una primera región variable de cadena única humana que se une a EGFRVIII. La

primera región variable de cadena única está en serie en orden de extremo amino a carboxilo con una segunda región variable de cadena única humana. La segunda región variable de cadena única se une al ligando CD3 de activación de células T. La primera región variable de cadena única comprende segmentos codificados por las SEQ ID NO: 5 y 6 en orden de extremo amino a carboxilo. La segunda región variable de cadena única comprende segmentos codificados por las SEQ ID NO: 7 y 8 en orden de extremo amino a carboxilo.

Aún otro aspecto de la presente invención es un procedimiento de producir el polipéptido biespecífico. Se cultiva una célula en un medio de cultivo. La célula comprende un polinucleótido que codifica el polipéptido biespecífico. El polipéptido biespecífico comprende una primera región variable de cadena única humana que se une a EGFRvIII. La primera región variable de cadena única está en serie en orden de extremo amino a carboxilo con una segunda región variable de cadena única humana. La segunda región variable de cadena única se une al ligando CD3 de activación de células T. La primera región variable de cadena única comprende segmentos codificados por las SEQ ID NO: 5 y 6 en orden de extremo amino a carboxilo. La segunda región variable de cadena única comprende segmentos codificados por las SEQ ID NO: 7 y 8 en orden de extremo amino a carboxilo. Después del cultivo, el polipéptido biespecífico se recoge de las células o del medio de cultivo.

Estas y otras realizaciones serán evidentes para un experto en la materia al leer la memoria descriptiva.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los inventores de la presente invención han desarrollado moléculas que se acoplan a células T biespecíficas humanas que se dirigen tanto a EGFRvIII como al ligando de activación de células T CD3. Se ha encontrado que reclutan células T citotóxicas para una célula cancerosa que expresa EGFRvIII y activan células T citotóxicas, eliminando de este modo la célula cancerosa que expresa la molécula EGFRvIII. Las moléculas que se acoplan a células T biespecíficas son reactivas de forma selectiva con EGFRvIII y el ligando de activación de células T CD3 expresados en la superficie de células de mamífero que son accesibles al anticuerpo desde el medio extracelular. De particular interés son las moléculas que se acoplan a células T biespecíficas humanas en las que el segmento de V_L precede al segmento de V_H de la región variable que se une a EGFRvIII. De interés adicional son proteínas de fusión que contienen un péptido señal. Además, los polinucleótidos que codifican las moléculas que se acoplan a células T biespecíficas humanas se pueden optimizar en los codones para la expresión en células de ovario de hámster chino (CHO).

Las proteínas de fusión que son moléculas que se acoplan a células T biespecíficas humanas pueden contener o no moléculas enlazadoras entre dominios variables individuales y entre regiones variables. El enlazador puede seleccionarse entre los que se muestran en las SEQ ID NO: 9 y 10, o los que tienen un número diferente de monómeros, tal como se muestran en la SEQ ID NO: 10, que varían de 1 a 5, 5 a 10 o 1 a 10. Pueden utilizarse también otros enlazadores que son conocidos en la técnica.

Se puede utilizar una secuencia señal en el extremo amino terminal de la proteína de fusión para facilitar la secreción de las moléculas que se acoplan a células T biespecíficas humanas de las células productoras en el cultivo. La secreción es ventajosa, ya que evita la necesidad de romper las células para recoger el producto de proteína de fusión de las células. Aunque se ha demostrado que la secuencia señal que se muestra en la SEQ ID NO: 4 guía con éxito la secreción de las moléculas que se acoplan a células T biespecíficas humanas, como alternativas se pueden utilizar otras secuencias señal conocidas en la técnica.

Aunque el ácido nucleico que codifica las moléculas que se acoplan a células T biespecíficas humanas mostrado en la SEQ ID NO: 1 se ha optimizado en codones para células CHO, se pueden producir las mismas moléculas que se acoplan a células T biespecíficas humanas a partir de otros ácidos nucleicos que codifican los mismos aminoácidos pero utilizan diferentes codones. Estos pueden optimizarse para la producción en diferentes líneas celulares o en diferentes sistemas animales *in vivo*.

Aunque el orden de los dominios variables que se presentan en las SEQ ID NO: 1, 2, y 3 parece ser muy eficaz, se pueden utilizar otros órdenes de los dominios variables para lograr otras moléculas que se acoplan a células T biespecíficas humanas que pueden compartir ciertas propiedades pero tienen otras propiedades beneficiosas que son únicas. Por ejemplo, la producción puede optimizarse con un orden de dominios, mientras que la avidéz o citotoxicidad se pueden optimizar con otro orden. Entre los posibles órdenes de los dominios variables se incluyen: SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8; SEQ ID NO: 8, 7, 6, 5; SEQ ID NO: 6, 5, 7, 8; SEQ ID NO: 5, 6, 8, 7; SEQ ID NO: 8, 7, 5, 6; y SEQ ID NO: 6, 5, 8, 7. Se pueden utilizar enlazadores entre cualquiera de estos segmentos. Las secuencias señal pueden preceder de forma N-terminal cualquiera de estas secuencias de dominios.

Pueden construirse y utilizarse muchos tipos de anticuerpos biespecíficos. Estos incluyen, sin limitación, F(ab')₂ derivado de cuádrima, scFv heterodimérico, Fab heterodimérico, diacuerpos, diacuerpos en tándem y moléculas scFv en tándem. Los anticuerpos biespecíficos también se pueden producir utilizando anticuerpos trifuncionales, es decir, anticuerpos que tienen una tercera especificidad, así como las dos iniciales para EGFRvIII y un ligando de activación de células T. Las diversas formas son bien conocidas en la técnica.

Una vez que se han construido las moléculas que se acoplan a células T biespecíficas, pueden producirse en

células recombinantes. Se puede utilizar cualquier tipo de célula. Si se secretan las moléculas que se acoplan a células T biespecíficas, pueden recogerse del medio de cultivo. Si permanecen de forma intracelular, las células se pueden recoger y romper en condiciones adecuadas para recoger las moléculas que se acoplan a células T biespecíficas de la fracción celular apropiada. Se puede utilizar cualquier célula huésped conveniente para la producción de moléculas que se acoplan a células T biespecíficas, incluyendo bacterias, levaduras, células de insectos, células vegetales, células de algas, células de mamífero. En un escenario, las moléculas que se acoplan a células T biespecíficas se pueden producir en células CHO transfectadas de forma estable y el sobrenadante contendrá las moléculas que se acoplan a células T biespecíficas producidas.

Cualquier tumor que exprese EGFRvIII puede ser objetivo y tratado con las moléculas que se acoplan a células T biespecíficas. Entre los tumores que se han encontrado que expresan el antígeno de EGFRvIII se incluyen tumores cerebrales tales como glioblastoma multiforme, tumores de mama y tumores de pulmón. Cualquiera de estos u otros tumores pueden ser objetivo si expresa el antígeno mutante.

Definiciones

Las unidades, prefijos y símbolos se indican en la forma aceptada por el Sistema Internacional de Unidades (SI). Los intervalos numéricos incluyen los números que definen el intervalo. A menos que se indique lo contrario, los ácidos nucleicos se escriben de izquierda a derecha en orientación 5' a 3'; las secuencias de aminoácidos se escriben de izquierda a derecha en orientación de amino a carboxilo. Los encabezamientos proporcionados en el presente documento no son limitaciones de los diversos aspectos o realizaciones de la descripción que pueden tener por referencia a la memoria descriptiva de forma global. Por consiguiente, los términos definidos inmediatamente a continuación se definen de forma más completa por referencia a la memoria descriptiva en su totalidad.

"EGFRvIII" significa una forma mutante del receptor del factor de crecimiento epidérmico reconocido por scFv MR1 y caracterizado por el par de bases 801 en la delección del marco de los exones 2 a 7 cerca del extremo amino terminal. Esta forma de receptor es conocida en la técnica, tal como se ejemplifica por las referencias de Wickstrand y otros, Moscatello y otros, y Lorimer y otros, citadas en los antecedentes. Debido a un cambio en la terminología, EGFRvIII se denominó originalmente una mutación de tipo II en algunos trabajos anteriores en el sector, tal como se ejemplifica en la patente de los Estados Unidos No. 5,212,290.

El término "CD3" se refiere al complejo de proteínas asociado con el receptor de células T. Los anticuerpos dirigidos contra CD3 son capaces de generar una señal de activación en linfocitos T. Se pueden utilizar también otros ligandos de activación de células T, incluyendo, sin limitaciones, CD28, CD134, CD137 y CD27.

Tal como se utiliza en el presente documento, "anticuerpo" incluye la referencia a una molécula de inmunoglobulina inmunológicamente reactiva con un antígeno particular e incluye anticuerpos tanto policlonales como monoclonales. El término también incluye formas modificadas genéticamente, tales como anticuerpos quiméricos (por ejemplo, anticuerpos murinos humanizados), anticuerpos heteroconjugados (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos Fv de cadena única recombinante (scFv), fragmentos Fv estabilizados con puente disulfuro (dsFv) (véase, el documento US Serie N° 08/077,252) o fragmentos de pFv (véanse las solicitudes de patente provisional de Estados Unidos 60/042,350 y 60/048,848). El término "anticuerpo" también incluye formas de unión a antígeno de los anticuerpos (por ejemplo, Fab', F(ab')₂, Fab, Fv y rIgG (véase también, Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, Ill)).

Se puede generar un anticuerpo inmunológicamente reactivo con un antígeno particular mediante procedimientos recombinantes, tales como la selección de bibliotecas de anticuerpos recombinantes en fagos o vectores similares (véase, por ejemplo, Huse y otros, Science 246: 1275-1281 (1989); Ward y otros, Nature 341: 544-546 (1989); y Vaughan y otros, Nature Biotech. 14: 309-314 (1996)).

Habitualmente, una inmunoglobulina tiene una cadena pesada y una cadena ligera. Cada cadena pesada y cada cadena ligera contienen una región constante y una región variable. Las regiones variables de la cadena ligera y la cadena pesada contienen una región "estructural" interrumpida por tres regiones hipervariables, también denominadas regiones determinantes de complementariedad o CDR. La extensión de la región estructural y las CDR se han definido (véase, SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, Kabat, E. y otros, U.S. Department of Health and Human Services, (1987)). Las secuencias de las regiones estructurales de diferentes cadenas ligeras o pesadas se conservan relativamente dentro de una especie. La región estructural de un anticuerpo, es decir las regiones estructurales de las cadenas ligera y pesada constituyentes, sirve para posicionar y alinear las CDR en el espacio tridimensional. Las CDR son principalmente responsables de la unión a un epítipo de un antígeno. Las CDR se denominan habitualmente como CDR1, CDR2 y CDR3, numeradas secuencialmente empezando por el extremo N-terminal.

La frase "Fv de cadena única" o "scFv" se refiere a un anticuerpo en el que la cadena pesada y la cadena ligera de un anticuerpo tradicional de dos cadenas se han unido para formar una cadena. Habitualmente, se inserta un péptido enlazador entre las dos cadenas para permitir el plegamiento apropiado y la creación de un sitio de unión activo.

El término “péptido enlazador” incluye la referencia a un péptido dentro de un fragmento de unión a anticuerpo (por ejemplo, fragmento Fv), que sirve para unir indirectamente la cadena pesada variable a la cadena ligera variable. El enlazador puede ser una serie de un único aminoácido o un patrón alternante de aminoácidos, por ejemplo.

- 5 El término “poner en contacto” incluye la referencia a la colocación en asociación física directa. Con respecto a la presente invención, el término se refiere a la unión anticuerpo-antígeno.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término “molécula que se acopla a células T biespecífica” se refiere a una molécula diseñada para emplear las células T de un sujeto para matar las células cancerosas mediante el direccionamiento a las células tumorales que expresan una molécula deseada. En ciertas realizaciones, la molécula deseada es EGFRvIII humano. En otras realizaciones, las moléculas que se acoplan a células T biespecíficas comprenden dos dominios Fv. En otras realizaciones, la molécula que se acopla a células T biespecífica comprende un primer dominio Fv dirigido a EGFRvIII y un segundo dominio Fv dirigido a CD3. Los dominios Fv pueden ser dominios scFv.

15 La expresión “reactivo de forma selectiva” incluye la referencia a la asociación preferente de un anticuerpo, en su totalidad o en parte, con una célula o tejido que contiene EGFRvIII o CD3 y no a células o tejidos que carecen de EGFRvIII o CD3. Naturalmente, se reconoce que se puede producir un cierto grado de interacción no específica entre una molécula y una célula o tejido no diana. No obstante, la reactividad selectiva se puede distinguir según se media a través del reconocimiento específico de EGFRvIII y CD3. Aunque los anticuerpos reactivos de forma selectiva se unen al antígeno, pueden hacerlo con baja afinidad. Por otra parte, la unión específica da lugar a una asociación mucho más fuerte entre el anticuerpo y las células que contienen EGFRvIII o CD3 que entre el anticuerpo unido y las células que carecen de EGFRvIII o CD3 o la unión anticuerpo-antígeno de baja afinidad. La unión específica habitualmente da lugar a más de dos veces, de manera preferente, más de 5 veces, de manera más preferente, más de 10 veces y, de la manera más preferente, más de 100 veces de incremento en la cantidad de anticuerpo unido (por unidad de tiempo) a una célula o tejido que contienen EGFRvIII o CD3 en comparación con una célula o tejido que carecen de EGFRvIII o CD3. La unión específica a una proteína bajo dichas condiciones requiere un anticuerpo que se selecciona por su especificidad para una proteína particular. Son apropiados un conjunto de formatos de inmunoensayo para seleccionar anticuerpos inmunorreactivos de manera específica con una proteína particular. Por ejemplo, los inmunoensayos ELISA en fase sólida se usan de forma rutinaria para seleccionar anticuerpos monoclonales inmunorreactivos de manera específica con una proteína. Véase Harlow y Lane, ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Publications, Nueva York (1988), para una descripción de formatos y condiciones de inmunoensayo que se pueden utilizar para determinar la inmunorreactividad específica. En algunas realizaciones de la presente invención, el anticuerpo se unirá a EGFRvIII mejor que al EGFR de tipo salvaje. En algunos casos, un anticuerpo se unirá a ambos. La unión diferencial se puede reflejar en una unión más fuerte, o en una unión más rápida, o en más unión a una cantidad fija de antígeno con una cantidad fija de tiempo. La mejor unión puede ser por un factor, como mínimo, de 2, 4, 6, 8 o 10. En algunas condiciones de la enfermedad, puede ser ventajoso tener un cierto grado de unión a ambas formas mutante y de tipo salvaje de EGFR, por ejemplo cuando ambas formas se coexpresan en una diana tumoral. En otras situaciones de la enfermedad, se puede desear tener la máxima cantidad de especificidad disponible para la forma mutante, por ejemplo, para reducir los efectos secundarios adversos.

45 Tal como se utiliza en el presente documento, “polipéptido”, “péptido” y “proteína” se utilizan indistintamente e incluyen la referencia a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos son un análogo químico artificial de un aminoácido natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos naturales. Los términos también se aplican a polímeros que contienen sustituciones conservativas de aminoácidos, de manera que la proteína sigue siendo funcional.

50 El término “residuo” o “residuo de aminoácido” o “aminoácido” incluye la referencia a un aminoácido que se incorpora en una proteína, polipéptido, o péptido (de forma colectiva “péptido”). El aminoácido puede ser un aminoácido natural y, a menos que se limite de otra manera, puede abarcar análogos conocidos de aminoácidos naturales que pueden funcionar de una manera similar a los aminoácidos naturales.

55 La frase “enlace disulfuro” o “enlace disulfuro cisteína-cisteína” se refiere a una interacción covalente entre dos cisteínas en la que los átomos de azufre de las cisteínas se oxidan para formar un enlace disulfuro. La energía de enlace promedio de un enlace disulfuro es aproximadamente de 60 kcal/mol en comparación con 1-2 kcal/mol para un enlace de hidrógeno. En el contexto de la presente invención, las cisteínas que forman el enlace disulfuro están dentro de las regiones estructurales del anticuerpo de cadena única y sirven para estabilizar la conformación del anticuerpo. Los residuos de cisteína se pueden introducir, por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida al sitio, de manera que se pueden producir enlaces disulfuro estabilizantes dentro de la molécula.

65 Tal como se utiliza en el presente documento, “recombinante” incluye la referencia a una proteína producida utilizando células que no tienen, en su estado nativo, una copia endógena del ADN capaz de expresar la proteína. Las células producen la proteína recombinante porque se han alterado genéticamente mediante la introducción de la secuencia de ácido nucleico aislada apropiada. El término también incluye la referencia a una célula, o ácido nucleico, o vector, que

han sido modificados mediante la introducción de un ácido nucleico heterólogo o la alteración de un ácido nucleico nativo a una forma no nativa para esa célula, o que la célula deriva de una célula modificada de este modo. De este modo, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no se encuentran dentro de la forma nativa (no recombinante) de la célula, expresan mutantes de genes que se encuentran dentro de la forma nativa o expresan genes nativos que, en cualquier caso, se expresan de forma anormal, se subexpresan o no se expresan en absoluto.

Tal como se utiliza en el presente documento, “ácido nucleico” o “secuencia de ácido nucleico” incluye la referencia a un polímero de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos en forma monocatenaria o bicatenaria y, a menos que se limite de otro modo, abarca análogos conocidos de nucleótidos naturales que se hibridan con los ácidos nucleicos de manera similar a nucleótidos naturales. A menos que se indique lo contrario, una secuencia de ácido nucleico particular incluye la secuencia complementaria de la misma, así como las variantes conservativas, es decir, ácidos nucleicos presentes en posiciones de variación de codones y variantes que, cuando se traduce en una proteína, dan lugar a una sustitución conservativa de un aminoácido.

Tal como se utiliza en el presente documento, “que codifica” con respecto a un ácido nucleico especificado, incluye la referencia a ácidos nucleicos que comprenden la información para la traducción en la proteína especificada. La información se especifica mediante la utilización de codones. Habitualmente, la secuencia de aminoácidos es codificada por el ácido nucleico utilizando el código genético “universal”. Sin embargo, se pueden utilizar variantes del código universal, tales como las presentes en las mitocondrias de algunas plantas, animales y hongos, la bacteria *Mycoplasma capricolum* (Proc Nat'l Acad Sci USA 82: 2306-2309 (1985)) o el macronúcleo de los ciliados, cuando el ácido nucleico se expresa en la utilización de la maquinaria de traducción de estos organismos. Cualquier codón para un aminoácido puede sustituirse por otro codón para el mismo aminoácido sin cambiar la proteína codificada. Sin embargo, la eficacia de la traducción puede modificarse.

La frase “la fusión en marco” se refiere a la unión de dos o más secuencias de ácido nucleico que codifican polipéptidos, de manera que la secuencia de ácido nucleico unida se traduce en una proteína de cadena única que comprende las cadenas polipeptídicas originales.

Tal como se utiliza en el presente documento, “expresado” incluye la referencia a la traducción de un ácido nucleico en una proteína. Las proteínas pueden expresarse y permanecer intracelulares, convertirse en un componente de la membrana de superficie celular o secretarse en la matriz extracelular o medio.

Por “célula huésped” se entiende una célula que puede apoyar la replicación o expresión del vector de expresión. Las células huésped pueden ser células procariontas, tales como *E. coli*, o células eucariotas, tales como células de levadura, insecto, anfibio o mamífero.

La frase “biblioteca de expresión en fagos” se refiere a una población de bacteriófagos, cada uno de los cuales contiene un ADNc exógeno fusionado de manera recombinante en el marco a una proteína de superficie. El fago expresa la proteína exógena codificada por el ADNc en su superficie. Después de la replicación en un huésped bacteriano, habitualmente *E. coli*, se selecciona el fago que contiene el ADNc exógeno de interés mediante la expresión de la proteína exógena en la superficie del fago.

“Identidad de secuencia” en el contexto de dos secuencias de ácidos nucleicos o de polipéptidos incluye la referencia a los nucleótidos (o residuos) en las dos secuencias que son iguales cuando se alinean para una correspondencia máxima sobre una ventana de comparación especificada. Cuando se utiliza el porcentaje de identidad de secuencia en referencia a proteínas se reconoce que las posiciones de los residuos que no son idénticos a menudo difieren por sustituciones conservativas de aminoácidos, en las que los residuos de aminoácidos son sustituidos por otros residuos de aminoácidos con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobicidad) y, por lo tanto, no cambian las propiedades funcionales de la molécula. Cuando las secuencias difieren en sustituciones conservativas, el porcentaje de identidad de secuencia se puede ajustar al alza para corregir la naturaleza conservativa de la sustitución. Los medios para realizar este ajuste son bien conocidos por los expertos en la materia. Habitualmente, esto implica puntuar una sustitución conservativa como parcial en lugar de una falta de coincidencia completa, aumentando de este modo el porcentaje de identidad de secuencia. De este modo, por ejemplo, cuando a un aminoácido idéntico se le da una puntuación de 1 y a una sustitución no conservativa se le da una puntuación de cero, a una sustitución conservativa se le da una puntuación entre cero y 1. La puntuación de las sustituciones conservativas se calcula, por ejemplo, según el algoritmo de Meyers y Miller, Computer Applic. Biol. Sci. 4: 11-17 (1988), por ejemplo, tal como se implementa en el programa PC/GENE (Intelligenetics, Mountain View, California, Estados Unidos). Una indicación de que dos secuencias de péptidos son sustancialmente similares es que un péptido es inmunológicamente reactivo con anticuerpos producidos contra el segundo péptido. De este modo, un péptido es sustancialmente similar a un segundo péptido, por ejemplo, cuando los dos péptidos difieren sólo por una sustitución conservativa.

Una “ventana de comparación”, tal como se utiliza en el presente documento, incluye la referencia a un segmento de aproximadamente 10-20 residuos en la que una secuencia puede compararse con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias se alineen de manera óptima. Los procedimientos de alineación de secuencias para comparación son bien conocidos en la técnica. El alineamiento

5 óptimo de secuencias para comparación puede realizarse mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981); mediante el algoritmo de alineamiento por homología de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 (1970); mediante la búsqueda de un procedimiento de similitud de Pearson y Lipman, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 85: 2444 (1988); mediante implementaciones computerizadas de estos algoritmos (incluyendo, pero sin limitarse a estos, CLUSTAL en el programa PC/Gene de Intelligenetics, Mountain View, Calif., GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA y TFASTA en el paquete de software de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wis., Estados Unidos); el programa CLUSTAL está bien descrito por Higgins y Sharp, Gene 73: 237-244 (1988) y Higgins y Sharp, CABIOS 5: 151-153 (1989); Corpet, y otros, Nucl. Acids Res. 16: 10881-90 (1988); Huang, y otros, Computer Applications in the Biosciences 8: 155-65 (1992); y Pearson, y otros, Meth. in Molec. Biol. 24: 307-31 (1994).

15 Las expresiones "cantidad eficaz" o "cantidad eficaz para" o "cantidad terapéuticamente eficaz" incluyen la referencia a una dosificación de un agente terapéutico suficiente para producir un resultado deseado, tal como la inhibición de la síntesis de proteínas celulares, como mínimo, en un 50%, o matar la célula.

20 La expresión "agente terapéutico" incluye cualquier número de compuestos conocidos actualmente o desarrollados posteriormente que actúen como antineoplásicos, antiinflamatorios, citocinas, antiinfecciosos, activadores o inhibidores de enzimas, modificadores alostéricos, antibióticos u otros agentes administrados para inducir un efecto terapéutico deseado en un paciente.

La expresión "in vivo" incluye la referencia al interior del cuerpo del organismo del que se obtuvo la célula. "Ex vivo" e "in vitro" significan fuera del cuerpo del organismo del que se obtuvo la célula.

25 Una vez que se aíslan y clonan los ácidos nucleicos que codifican una molécula que se acopla a células T biespecífica de la presente descripción, se puede expresar la proteína deseada en una célula modificada de forma recombinante, tal como células de bacterias, plantas, levaduras, insectos y mamíferos. Se espera que los expertos en la materia sean conocedores de los numerosos sistemas de expresión disponibles para la expresión de proteínas, que incluyen *E. coli*, otros huéspedes bacterianos, levadura y varias células eucarióticas superiores, tales como COS, CHO, HeLa y líneas celulares de mieloma. No se hará ningún intento por describir en detalle los diversos procedimientos conocidos para la expresión de proteínas en procariontas o eucariotas. En resumen, la expresión de ácidos nucleicos naturales o sintéticos que codifican las proteínas aisladas de la presente invención normalmente se logrará mediante la unión operativa del ADN o del ADNc a un promotor (que es constitutivo o inducible), seguido de la incorporación en un casete de expresión. Los casetes pueden ser adecuados para la replicación e integración en procariontas o eucariotas. Los casetes de expresión habituales contienen terminadores de la transcripción y la traducción, secuencias de iniciación y promotores útiles para la regulación de la expresión del ADN que codifica la proteína. Para obtener una expresión de alto nivel de un gen clonado, se puede desear construir casetes de expresión que contienen, como mínimo, un promotor fuerte para dirigir la transcripción, un sitio de unión a ribosoma para la iniciación de la traducción y un terminador de la transcripción/traducción. Para *E. coli* esto incluye un promotor, tal como los promotores T7, trp, lac o lambda, un sitio de unión a ribosoma y, de manera preferente, una señal de terminación de la transcripción. Para las células eucariotas, las secuencias de control pueden incluir un promotor y, de manera preferente, un potenciador derivado de genes de inmunoglobulina, SV40, citomegalovirus y una secuencia de poliadenilación, y pueden incluir secuencias de empalme donantes yceptoras. Los casetes de la invención se pueden transferir en la célula huésped elegida mediante procedimientos bien conocidos, tales como transformación con cloruro de calcio o electroporación para *E. coli* y tratamiento con fosfato de calcio, electroporación o lipofección para células de mamífero. Las células transformadas por los casetes se pueden seleccionar por la resistencia a antibióticos conferida por los genes contenidos en los casetes, tales como los genes amp, gpt, neo e hyg. También se contempla que el ADN puede administrarse a un paciente receptor, por ejemplo, en nanopartículas u otro sistema de suministro de ADN, y que el paciente puede producir su propias moléculas que se acoplan a células T biespecíficas *in vivo*.

50 Un experto entendería que se pueden realizar modificaciones a un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la presente descripción (es decir, contra EGFRvIII o contra CD3) sin disminuir su actividad biológica. Algunas modificaciones pueden realizarse para facilitar la clonación, expresión o incorporación de la molécula diana en una proteína de fusión. Dichas modificaciones son bien conocidas por los expertos en la materia e incluyen, por ejemplo, una metionina añadida en el extremo amino terminal para proporcionar un sitio de iniciación, o aminoácidos adicionales (por ejemplo, poli His) colocados en cualquiera de los extremos terminales para crear sitios de restricción convenientemente situados o codones de terminación o secuencias de purificación.

60 La frase "célula maligna" o "tumor maligno" se refiere a tumores o células tumorales que son invasivas y/o son capaces de experimentar metástasis, es decir, una célula cancerosa.

65 Además de los procedimientos recombinantes, las moléculas que se acoplan a células T biespecíficas de la presente descripción también se puede construir, totalmente o en parte, utilizando la síntesis de péptidos estándar. La síntesis en fase sólida de los polipéptidos de la presente invención de menos de aproximadamente 50 aminoácidos de longitud se puede realizar mediante la unión del aminoácido C-terminal de la secuencia a un soporte insoluble, seguido por la adición secuencial de los aminoácidos restantes en la secuencia. Las técnicas para la

síntesis en fase sólida se han descrito por Barany y Merrifield, THE PEPTIDES: ANALYSIS, SYNTHESIS, BIOLOGY. VOLUMEN 2: SPECIAL METHODS IN PEPTIDE SYNTHESIS, PART A. págs. 3-284; Merrifield y otros, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149-2156 (1963) y Stewart y otros, SOLID PHASE PEPTIDE SYNTHESIS, 2ª Ed, Pierce Chem. Co., Rockford, Ill. (1984). Las proteínas de mayor longitud se pueden sintetizar mediante condensación de los extremos terminales amino y carboxilo de fragmentos más cortos. Los procedimientos para formar enlaces peptídicos mediante la activación de un extremo carboxilo terminal (por ejemplo, mediante la utilización del reactivo de acoplamiento N, N'-diciclohexilcarbodiimida) son conocidos por los expertos.

Además de redirigir las células T a antígenos específicos de tumores, las moléculas que se acoplan a células T biespecíficas también se pueden utilizar para transportar otros compuestos de diagnóstico o terapéuticos a células que expresan EGFRvIII en su superficie. De este modo, una molécula que se acopla a células T biespecífica puede unirse directa o indirectamente, por ejemplo, a través de un enlazador, a un fármaco, de manera que se suministrará directamente a las células que transportan EGFRvIII. Entre los agentes terapéuticos se incluyen compuestos, tales como ácidos nucleicos, proteínas, péptidos, aminoácidos o derivados, glicoproteínas, radioisótopos, lípidos, carbohidratos o virus recombinantes. Entre los restos terapéuticos y de diagnóstico de ácidos nucleicos se incluyen ácidos nucleicos antisentido, oligonucleótidos derivatizados para reticulación covalente con ADN simple o de doble cadena y oligonucleótidos que forman una triple cadena.

Alternativamente, la molécula unida a la molécula que se acopla a células T biespecífica puede ser un sistema de encapsulación, tal como un liposoma o micela que contiene una composición terapéutica, tal como un fármaco, un ácido nucleico (por ejemplo, un ácido nucleico antisentido) u otro resto terapéutico que está protegido, de manera preferente, de la exposición directa al sistema circulatorio. Los medios para preparar liposomas unidos a anticuerpos son bien conocidos por un experto en la materia. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 4,957,735; y Connor, y otros, Pharm. Ther. 28:341-365 (1985).

Las moléculas que se acoplan a células T biespecíficas de la presente descripción son particularmente útiles para administración parenteral, tal como administración intravenosa o administración en una cavidad corporal o lumen de un órgano. Por ejemplo, los tumores ováricos se pueden tratar mediante administración intravenosa o mediante administración localizada en el tejido que rodea el tumor. Para el tratamiento de tumores en el cerebro, las moléculas se pueden administrar directamente al cerebro, por ejemplo, mediante inyección, o las moléculas se pueden administrar por vía intravenosa y, a continuación, atraviesan la barrera hematoencefálica.

Las composiciones para administración comprenderán habitualmente una solución de las moléculas que se acoplan a células T biespecíficas disueltas en un portador farmacéuticamente aceptable, de manera preferente, un portador acuoso. Se puede utilizar una variedad de portadores acuosos, por ejemplo, solución salina tamponada y similares. Estas soluciones son estériles y, en general, libres de materia indeseable. Estas composiciones se pueden esterilizar mediante técnicas de esterilización convencionales bien conocidas. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables, según se requiera, para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes de ajuste del pH y agentes tampón, agentes de ajuste de la toxicidad y similares, por ejemplo, acetato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, lactato de sodio y similares. La concentración de la proteína de fusión en estas formulaciones puede variar ampliamente y se seleccionará, principalmente, en base a los volúmenes de fluido, viscosidades, peso corporal y similares, según el modo particular de administración seleccionado y las necesidades del paciente.

De este modo, una composición farmacéutica habitual de la presente invención para la administración intravenosa sería de aproximadamente 0,1 a 10 mg por paciente por día. Se pueden utilizar dosificaciones desde 0,1 hasta aproximadamente 100 mg por paciente por día, en particular si el fármaco se administra en un sitio aislado y no en el sistema circulatorio o linfático, tal como en una cavidad corporal o en un lumen de un órgano. Los procedimientos reales para preparar composiciones administrables serán conocidos o evidentes para los expertos en la técnica y se describen con más detalle en publicaciones, tales como REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCE, 19ª ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1995).

Las composiciones de la presente invención se pueden administrar para tratamientos terapéuticos. En aplicaciones terapéuticas, las composiciones se administran a un paciente que padece una enfermedad, en una cantidad suficiente para curar o, como mínimo, detener parcialmente la enfermedad y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como una "dosis terapéuticamente eficaz". Las cantidades eficaces para esta utilización dependerán de la gravedad de la enfermedad y del estado general de salud del paciente. Una cantidad eficaz del compuesto es la que proporciona un alivio subjetivo de un síntoma o síntomas o una mejora identificable de forma objetiva, tal como señala el médico u otro observador cualificado.

Las administraciones únicas o múltiples de las composiciones se administran dependiendo de la dosis y la frecuencia requeridas y toleradas por el paciente. En cualquier caso, la composición debe proporcionar una cantidad suficiente de las proteínas de la presente invención para tratar de manera eficaz al paciente. De manera preferente, la dosis se administra una vez, pero se puede aplicar de manera periódica hasta que se consigue un resultado terapéutico o hasta que los efectos secundarios justifican la discontinuidad de la terapia. En general, la dosis es suficiente para tratar o mejorar los síntomas o signos de la enfermedad sin producir una toxicidad inaceptable para el

paciente.

Las formulaciones parenterales de liberación controlada de las composiciones farmacéuticas de la presente descripción se pueden producir como implantes, inyecciones oleosas o como sistemas de partículas. Para una visión general de los sistemas de administraciones de proteínas, véase Banga, A.J., THERAPEUTICS PEPTIDES AND PROTEINS: FORMULATION, PROCESSING, AND DELIVERY SYSTEMS, Technomic Publishing Company, Inc., Lancaster, Pa., (1995), incorporado en el presente documento por referencia. Entre los sistemas de partículas se incluyen microesferas, micropartículas, microcápsulas, nanocápsulas, nanoesferas y nanopartículas. Las microcápsulas contienen la proteína terapéutica como un núcleo central. En las microesferas, el agente terapéutico se dispersa por toda la partícula. Las partículas, microesferas y microcápsulas más pequeñas de aproximadamente 1 μ m se denominan, en general, como nanopartículas, nanoesferas y nanocápsulas, respectivamente. Los capilares tienen un diámetro de aproximadamente 5 μ m, de manera que sólo las nanopartículas se administran por vía intravenosa. Las micropartículas tienen, habitualmente, un diámetro de aproximadamente 100 μ m y se administran por vía subcutánea o intramuscular. Véase, por ejemplo, Kreuter, J., COLLOIDAL DRUG DELIVERY SYSTEMS, J. Kreuter, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., págs. 219-342 (1994); y Tice y Tabibi, TREATISE ON CONTROLLED DRUG DELIVERY, A. Kydonieus, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., págs. 315-339 (1992).

Los polímeros se pueden utilizar para la liberación controlada de iones de composiciones farmacéuticas de la presente invención. En la técnica se conocen varias matrices poliméricas degradables y no degradables para utilizar en la administración controlada de fármacos (Langer, R., Accounts Chem. Res. 26: 537-542 (1993)). Por ejemplo, el copolímero de bloque, polaxámero 407 existe como un líquido viscoso, aunque móvil, a temperaturas bajas, pero forma un gel semisólido a temperatura corporal. Ha demostrado ser un vehículo eficaz para la formulación y la administración sostenida de la interleucina 2 recombinante y la ureasa (Johnston, y otros, Pharm. Res. 9: 425-434 (1992); y Pec y otros, J. Parent. Sci. Tech. 44 (2): 58-65 (1990)). De manera alternativa, la hidroxiapatita se ha utilizado como un microvehículo para la liberación controlada de proteínas (Ijntema, y otros, Int. J. Pharm. 112: 215-224 (1994)). En aún otro aspecto, se utilizan liposomas para la liberación controlada, así como el direccionamiento del fármaco del fármaco encapsulado con lípidos (Betageri, y otros, LIPOSOME DRUG DELIVERY SYSTEMS, Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, Pa. (1993)). Se conocen numerosos sistemas adicionales para la administración controlada de proteínas terapéuticas. Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos. Nº. 5,055,303, 5,188,837, 4,235,871, 4,501,728, 4,837,028, 4,957,735 y 5,019,369, 5,055,303; 5,514,670; 5,413,797; 5,268,164; 5,004,697; 4,902,505; 5,506,206, 5,271,961; 5,254,342 y 5,534,496.

Entre las diversas utilidades de las moléculas que se acoplan a células T biespecíficas de la presente invención se incluyen una variedad de afecciones patológicas causadas por células humanas específicas que pueden eliminarse mediante la acción tóxica de la proteína de fusión. Una aplicación preferente para las moléculas que se acoplan a células T biespecíficas de la presente invención es el tratamiento de células malignas que expresan EGFRvIII. Entre las células malignas de ejemplo se incluyen astrocitomas, glioblastomas, melanoma y similares.

Tal como se utiliza en el presente documento, "células de mamífero" incluyen la referencia a células derivadas de mamíferos que incluyen seres humanos, ratas, ratones, cobayas, chimpancés o macacos. Las células pueden cultivarse in vivo o in vitro.

La descripción anterior describe, en general, la presente invención. Puede obtenerse una comprensión más completa mediante referencia a los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en el presente documento para fines de ilustración solamente y no pretenden limitar el alcance de la presente invención.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

Se construyó la molécula MR1-1XaCD3, que consistía en MR1-1, el Fv de cadena única murino contra EGFRvIII humano, y aCD3, el Fv de cadena única murino contra CD3 humano. MR1-1XaCD3 se expresó en bacterias BL21 (DE3) y se purificó a partir de las mismas, y se confirmó la actividad de esta molécula con doble función mediante FACS que mostró su unión específica a líneas de células que expresaban EGFRvIII, así como a células T humanas. La citotoxicidad de MR1-1XaCD3 en líneas celulares GBM D54MG. EGFRvIII que expresaban EGFRvIII se midió in vitro mediante el ensayo de liberación de cromo estándar. La eficacia de MR1-1XaCD3 se evaluó en ratones NOD/SCID gamma, en los que se implantaron las líneas celulares que expresaban EGFRvIII humano. Los resultados mostraron que la construcción MR1-1XaCD3 era altamente citotóxica y específica de antígeno, con un aumento de 8 veces en la lisis específica para D54MG. EGFRvIII sobre el control de tipo salvaje. En un modelo subcutáneo, el crecimiento tumoral se inhibió de una manera dependiente de la dosis. Aunque se logró una inhibición total a 100 mcg/ratón/día, dosis bajas podrían funcionar de forma eficaz tras la optimización. En resumen, los experimentos mostraron que una molécula que se acopla a células T específicas de EGFRvIII humano, MR1-1XaCD3, es eficaz en un tumor que expresa EGFRvIII.

Se ha demostrado que un scFv de MAb murino MR1-1, específico para EGFRvIII, es un vehículo adecuado para el tratamiento de GBM en el formato de inmunotoxinas recombinantes, que se encuentra ahora en un ensayo clínico en

nuestra institución (BB-IND-12589). Sin embargo, las propiedades innatas de anticuerpos de origen murino podrían inducir anticuerpos neutralizantes que limitan su aplicación más amplia. Por lo tanto, los mAb totalmente humanos son más deseables para la construcción de moléculas que se acoplan a células T biespecíficas recombinantes para ensayos clínicos.

Para obtener MAb y scFv contra EGFRvIII humanos de alta afinidad, (1) se fusionarán células B específicas de EGFRvIII a la pareja de mieloma no secretora HMMa2.5 utilizando una técnica de electrofusión o (2) se clonarán las cadenas pesadas y ligeras variables de bibliotecas de ADN preparadas a partir de los clones de células B secretoras de anticuerpos derivados directamente de los pacientes con GBM que han sido vacunados con un epítipo específico de EGFRvIII.

En el contexto de un ensayo clínico en curso en estos pacientes, se ha demostrado que la vacunación con un péptido específico de EGFRvIII (PEPvIII) indujo anticuerpos con título elevado específicos para EGFRvIII en 32 de 43 pacientes, desarrollando algunos pacientes títulos de $> 1:2.000.000$. La producción de anticuerpos específicos de EGFRvIII de alta afinidad con un promedio de 6 nM (KD) se confirmó mediante el análisis ECD de EGFRvIII utilizando un análisis BIAcore SPR.

A menudo, se ha desafiado clonar MAb monoclonales directamente a partir de células B humanas de una manera eficaz. En nuestros resultados preliminares, el sobrenadante derivado de células B humanas de un paciente con GBM vacunado (ACT II-18) después de la estimulación con PEPvIII, demostró una reactividad positiva en células transfectadas con EGFRvIII (NR6M) y transfectantes EGFRwt de tipo salvaje (NR6W) en días posteriores. Con muestras de nuestros pacientes, se pudo transformar las células B con el virus de Epstein-Barr (EBV) y se demostró que estas células mantienen su capacidad de secretar anticuerpos específicos de EGFRvIII con títulos elevados después de la estimulación de los péptidos durante períodos prolongados como mínimo, de 2 semanas. En los estudios piloto, tres de cada cuatro muestras de pacientes se han transformado con éxito y mostraron una producción de anticuerpos con títulos elevados y alta afinidad.

EJEMPLO 2

Para construir una molécula que se acopla a células T biespecífica recombinante en base a estos scFv específicos de EGFRvIII humano, se subclonaron scFv contra EGFRvIII humanos en un casete existente, que se utilizó previamente para crear una molécula MR1-1xCD3, mediante la sustitución de la parte MR1-1scFv. Se clonó scFv contra CD3 humano de ratón a partir de una línea de hibridoma OKT3 (ATCC, CRL 8001). La proteína que se acopla a células T biespecífica MR1-1 después de la purificación se mostró en gel de SDS-PAGE con un peso molecular de 55 kDa. La molécula que se acopla a células T biespecífica MR1-1 se une a EGFRvIII específicamente y se acopla a células T de forma concomitante a través de la unión a CD3. La capacidad de unión y la especificidad de EGFRvIII se confirmó mediante la utilización de las líneas células NR6M (EGFRvIII) y NR6W (EGFRwt) y una línea celular de GBM transfectada con EGFRvIII (U87MG.ΔEGFR). Del mismo modo, la unión a CD3 se confirmó mediante la tinción de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) y células Jurkat, lo que muestra la unión de anticuerpos contra CD4 o contra CD8 con moléculas que se acoplan a células T biespecíficas en la misma subpoblación de células T de células PBMC o Jurkat humanas. Aunque la utilización de scFv humanos para generar moléculas que se acoplan a células T biespecíficas puede reducir la generación de anticuerpos neutralizantes y permitir administraciones repetidas, también se puede utilizar la molécula que se acopla a células T biespecífica MR1-1 existente.

EJEMPLO 3

A efectos de minimizar las posibles respuestas alogénicas contra las células tumorales, se utilizó un banco de linfocitos de sangre periférica humana (PBL) emparejados existentes y líneas celulares de GBM en estos ensayos. La citotoxicidad de la molécula que se acopla a células T biespecífica MR1-1 se midió mediante un ensayo de liberación de cromo estándar utilizando los PBL no estimulados como células efectoras y la línea celular de GBM humana U87MG, que expresa EGFR de tipo salvaje, y la línea celular U87MG-EGFRvIII transfectada como células diana. Los resultados muestran que la construcción MR1-1 es muy citotóxica y específica de antígeno, con un aumento de casi 25 veces en la lisis específica (%) para U87MGEGFRvIII sobre el control de tipo salvaje, U87MG. Estos resultados repiten, si no superan, los hallazgos que se describieron inicialmente *in vitro* para bscCD19xCD34, una construcción biespecífica que desde entonces ha sido probada en ensayos en humanos y se halló que inducía una regresión del tumor potente en pacientes con linfoma no Hodgkin. La lisis específica por la molécula que se acopla a células T biespecífica MR1-1 estaba al 30% de U87 MG-EGFRvIII en comparación con ~ 1%-2% de células de control a las 18 horas, mostrando una lisis *in vitro* específica dependiente de la dosis mediada por molécula que se acopla a células T biespecífica MR1-1.

EJEMPLO 4

La eficacia de la molécula que se acopla a células T biespecífica MR1-1 se evaluó en ratones NSG. Se determinó la eficacia de la molécula que se acopla a células T biespecífica MR1-1 frente a U87MGEGFRvIII en ratones NSG s.c. De manera breve, se recogieron las células U87 MG-EGFRvIII (70%-80% de confluencia) con tripsina-EDTA al 0,25%. Las

células se lavaron 2 veces con PBS estéril. Se recogieron PBL como la parte no adherente de leucaféresis de PBMC de donantes sanos después de una incubación de 1 hora en AIM-V 2% HABS. Se mezclaron tres $\times 10^5$ células U87MG-EGFRvIII con 3×10^5 PBL humanos (E:T de 1: 1) y se inyectaron s.c. en los flancos derechos de 8 ratones NSG macho por grupo. El tratamiento mediante inyecciones en vena de la cola con 1 μg , 10 μg , 100 μg , y el vehículo de control se inició 1 hora después de la implantación de las células tumorales. El tratamiento se repitió durante cuatro días consecutivos. Los resultados mostraron que la inhibición del crecimiento subcutáneo del tumor U87MG-EGFRvIII en ratones NSG por MR1-1xCD3 era dependiente de la dosis después de 28 días de observación. Los tumores no tratados continuaron creciendo de manera constante. Hubo dos tumores palpables de 8 en el grupo de 1 μg . Hubo un tumor palpable en el grupo tratado con 10 μg . No hubo tumores en el grupo tratado con 100 μg . La eficacia de la molécula que se acopla a células T biespecífica MR1-1 sobre el tratamiento de U87MG-EGFRvIII fue muy significativa y alentadora con respecto a la potencia y dependencia de la dosis.

EJEMPLO 5

Las células B transformadas con EBV sólo proporcionan un depósito transitorio de anticuerpos multiclonales contra EGFRvIII debido a la elevada inestabilidad de la incorporación viral en el genoma humano. Para producir líneas estables que secretan anticuerpo y para clonar scFv específicos de EGFRvIII a partir de estas muestras, se utilizó tecnología de hibridoma humano y electrofusión, tal como se ha descrito previamente (13). De manera breve, se fusionaron PBMC transformadas con EBV con la línea celular de hetermieloma HMMA2.5 mediante la utilización de un sistema de electrofusión Hybrimmune CytoPulse (Cytopulse). Se cribaron clones de células individuales mediante selección con HAT (hipoxantina, aminopterina y timidina) y se confirmaron mediante ELISA del sobrenadante contra el ECD de EGFRvIII recombinante, o mediante citometría de flujo contra líneas de células de expresión de EGFRvIII y un cóctel de marcadores de células B. De manera alternativa, se construyó una biblioteca de expresión de scFv en fagos que expresan genes de inmunoglobulina humana que se pueden cribar en ECD de EGFRvIII y se realizó una afinidad por maduración, cuando fue necesario, tal como se ha descrito previamente. Otra estrategia sería omitir la etapa de cribado mediante la utilización de secuenciación de ADN de alto rendimiento y análisis bioinformático para extraer repertorios de genes de la región variable (V) de anticuerpos de células plasmáticas, tal como se ha descrito (19). Las CDR de VH y VL de los hibridomas que expresaban MAb específico de EGFRvIII seleccionado se amplificaron mediante la utilización de cebadores específicos de isotipo y se construyeron scFv en los que la proteína de scFv se había etiquetado en el extremo carboxi terminal con las secuencias de hexahistidina para la purificación y detección. La expresión, producción y caracterización de scFv se llevó a cabo, tal como se ha descrito mediante la utilización de una columna de afinidad de metal. La unión de scFv se confirmó mediante citometría de flujo sobre células que expresaban EGFRvIII. Como mínimo, se aisló un MAb contra EGFRvIII completamente humano y se espera que su scFv tenga una afinidad superior que MR1-1 (1,5 nM).

EJEMPLO 6

Para producir la molécula que se acopla a células T biespecífica humana completa contra EGFRvIII, se generó un mimotopo de scFv humano de MAb murino OKT3 que reacciona con el antígeno CD3 a través del cribado de una biblioteca de expresión en fagos de scFv humano. La biblioteca de fagémidos de scFv humano (21), obtenida del Laboratorio Nacional de Los Alamos, tiene un tamaño ($7,1 \times 10^{13}$ ufp/ml) y diversidad (3×10^{11}) muy elevados. Durante la selección, el antígeno diana biotinilado, CD3 (Sino Biological Inc.), se incubó con la biblioteca de scFv, y los complejos formados se capturaron sobre perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina. El complejo perla + Ag/scFv se lavó para eliminar el fago de unión no específico o de baja afinidad. El complejo perla + Ag/scFv se trató con ácido (HCl 0,1 M) para recuperar todos los scFv que se unían al antígeno diana. Para recuperar los miméticos de los anticuerpos de ratón, el complejo de perla + Ag/scFv se incubó con la correspondiente IgG OKT3 de ratón para la competición/elución de los anticuerpos scFv de unión. Para generar estos anticuerpos scFv con la afinidad más elevada, se incrementó la presión de selección a través de cada ronda durante 3 rondas. Una vez se recuperaron los scFv que se unían a CD3, se llevó a cabo un ELISA de competición para determinar si son verdaderos miméticos del OKT3 de ratón y se realizó maduración por afinidad, si era necesario. A continuación, se determinó la función de activación de células T de (7) OKT3 de versión humana de scFv contra CD3 mediante la realización de (a) ensayos de proliferación de linfocitos T, (b) ensayos de liberación de citoquinas, y (c) detección de la expresión del marcador temprano de la activación de células T mediante FACS, tal como se ha descrito (22).

EJEMPLO 7

Se construyó un scFv contra EGFRvIII humano y un scFv contra CD3 humano mediante la unión de los fragmentos VH y VL con un enlazador peptídico de $(\text{Gly4Ser})_3$. Se introdujo una etiqueta de hexahistidina en el extremo C-terminal de scFv contra CD3 humano para ayudar a la detección y purificación. La expresión y purificación de la nueva molécula que se acopla a células T biespecífica contra EGFRvIII completamente humana siguió el mismo protocolo que se describió anteriormente para la molécula que se acopla a células T biespecífica MR1-1, según el protocolo anterior.

EJEMPLO 8

Basándose en estos datos preliminares prometedores de los estudios de moléculas que se acoplan a células T biespecíficas MR1-1, se evaluó la actividad citotóxica de las nuevas moléculas que se acoplan a células T

biespecíficas contra EGFRvIII completamente humanas siguiendo el mismo protocolo que se describió anteriormente. Se llevaron a cabo experimentos de control negativo con medio en lugar de la molécula que se acopla a células T biespecífica o a células efectoras. A continuación, se calculó la lisis específica como [(cpm, liberación experimental) - (cpm, liberación espontánea)]/[(cpm, liberación máxima) - (cpm, liberación espontánea)].

5

EJEMPLO 9

La eficacia de las nuevas moléculas que se acoplan a células T biespecíficas de EGFRvIII completamente humanas se evaluó en ratones NSG, tal como se ha descrito anteriormente, así como en los estudios preliminares. El programa tiene a su disposición una serie de xenoinjertos de GBM humanos que expresan EGFRvIII y líneas celulares con linfocitos autólogos emparejados conservados criogénicamente. De manera breve, antes de la administración de las moléculas que se acoplan a células T biespecíficas, las células tumorales y los linfocitos se mezclaron en una proporción de 1:1 y se implantaron en el núcleo caudado de los ratones NSG utilizando un marco estereotáxico de Kopf, tal como se ha descrito previamente (24). El modelo de ratón NSG proporcionó estudios de eficacia de "prueba de concepto" contra un GBM que expresa EGFRvIII en el SNC. Antes de comenzar los experimentos de eficacia, sin embargo, se estableció una dosis máxima tolerada (MTD) de cada molécula que se acopla a células T biespecífica candidata en estos ratones. A cohortes individuales de 40 animales cada uno se administró una molécula candidata con dosis establecidas entre los grupos aumentadas en un medio del log 10 de 0,001 a 1 µg hasta un MTD. Basándose en trabajos anteriores, los ratones se trataron por vía intravenosa (i.v.) con dosis diarias de molécula que se acopla a células T biespecífica durante 5 días. La terapia en la MTD se inició después de aproximadamente un tercio de la mediana del tiempo de supervivencia transcurrido, según la propia experiencia previa con estos tumores. El tratamiento consistió en la administración i.v. de la construcción de moléculas que se acoplan a células T biespecíficas en dosis predeterminadas.

EJEMPLO 10

Diseño de BiTE completamente humano. Se generó ADNc que codificaba un BiTE específico de EGFRvIII completamente humano designado 139x28F11. Los mAb 139 (documento US 2010/0111979 A1) y 28F11 (documento US 7.728.114 B2) son anticuerpos completamente humanos con especificidad para el antígeno tumoral EGFRvIII y el complejo CD3 humano, respectivamente. 28F11 se ha descrito como el análogo completamente humano para el clon de OKT3 murino y se seleccionó en esta estrategia por su capacidad para unirse a CD3 e inducir la activación de células T a través de este receptor de forma similar a OKT3.

Se subclonaron los genes de VH y VL de un mAb contra EGFRvIII completamente humano designados "139" y un mAb contra la activación de CD3 designado "28F11." A través de técnicas bien conocidas, se construyeron scFv de cadena única humanos mediante la unión de los fragmentos de VH y VL de cada anticuerpo con un enlazador peptídico (Gly4Ser)₃. Se realizaron previamente estas mismas manipulaciones para el mAb específico de CD3 humano OKT3 disponible en el mercado y el mAb contra EGFRvIII murino MR1-1 para la fabricación del BiTE MR1-1xOKT3 existente descrito anteriormente. Utilizando esta técnica, se generó un BiTE completamente humano, reduciendo así la generación potencial de anticuerpos neutralizantes y permitiendo la administración repetida, la construcción MR1-1xOKT3 existente pudo investigarse adicionalmente de forma clínica como alternativa dado el éxito anterior en los ensayos clínicos con BiTE derivados de anticuerpos murinos.

La citotoxicidad de la construcción 139x28F11 se midió mediante un ensayo de liberación de cromo estándar utilizando linfocitos de sangre periférica humana (PBL) no estimulados como células efectoras y las líneas celulares GBM humanas U87MG y U87MG.ΔEGFR como células diana.

El sistema de xenoinjerto utilizado para obtener los datos preliminares tiene la clara ventaja de evaluar los candidatos a fármaco por la eficacia en un sistema animal utilizando tejido de tumor humano, con el potencial para traducir directamente la molécula terapéutica de interés en estudios clínicos. Sin embargo, un inconveniente principal de este modelo es la falta de un sistema inmunitario endógeno, lo que impide radicalmente la capacidad de evaluar adecuadamente la seguridad y la toxicidad de la molécula, así como de realizar numerosos estudios mecanísticos que sólo se pueden realizar de forma adecuada en huéspedes singénicos. Es importante destacar que otros anticuerpos que activan células T históricamente se han encontrado con toxicidad imprevista cuando se traduce en los primeros ensayos clínicos, como mínimo, en parte debido a la falta de modelos de roedores inmunocompetentes apropiados que posean moléculas de superficie de afinidades de unión y función equivalentes a las que se encuentran en los seres humanos (25).

La utilización de ratones transgénicos CD3 humanos en la evaluación preclínica del BiTE que se acopla a CD3, EGFRvIIIxCD3, es inusual. Previamente, se ha descrito que estos ratones tienen ~ 3 copias del transgén CD3 humano integrado cromosómicamente en localizaciones desconocidas (26). Cuando son heterocigotos, los ratones tg^ε600± poseen números casi normales de células T periféricas que expresan CD3 tanto humanos como murinos. De forma destacada, la cepa de ratón tg^ε600± se ha utilizado con éxito para probar la función de inmunotoxinas contra CD3 humano en modelos preclínicos de agotamiento de células T y supervivencia del injerto (27).

65

Se importó con éxito la cepa de ratón tge600± como embriones del Dr. Cox Terhorst (Beth Israel Deaconess Medical Center). Se propuso establecer una colonia de tge600± y, utilizando las líneas de células que expresan EGFRvIII murinos preexistentes como dianas, se examinó primero la capacidad de EGFRvIIIxCD3 para redirigir esplenocitos desde ratones tge600± contra células tumorales in vitro mediante el ensayo de liberación de cromo estándar. Después de establecer las dosis mínimas tumorigénicas en el modelo de ratón tge600±, se procedió con una validación de los resultados obtenidos a partir de experimentos que previamente se realizaron en el sistema de xenoinjertos inmunocomprometidos.

EJEMPLO 11

Se optimizaron los codones del ácido nucleico que codifica la molécula que se acopla a células T biespecífica humana para la expresión en células CHO. Las moléculas que se acoplan a células T biespecíficas humanas incluían una secuencia señal y un orden VL-VH para la parte de la molécula dirigida a EGFRvIII. También contenía moléculas enlazadoras entre cada dominio variable. Se descubrió que una molécula con este orden era más eficaz. No se incluyó una etiqueta de polihistidina en la construcción de moléculas que se acoplan a células T biespecíficas humanas, que se había incluido previamente para facilitar la purificación de proteínas.

Referencias

1. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ y otros: Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *New England Journal of Medicine* 352:987-996, 2005
2. Phan GQ, Yang JC, Sherry RM y otros: Cancer regression and autoimmunity induced by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:8372-7, 2003
3. Suntharalingam G, Perry MR, Ward S y otros: Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *New England Journal of Medicine* 355:1018-28, 2006
4. Bargou R, Leo E, Zugmaier G y otros: Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T cell-engaging antibody. *Science* 321:974-7, 2008
5. Wikstrand CJ, Hale LP, Batra SK y otros: Monoclonal antibodies against EGFRvIII are tumor specific and react with breast and lung carcinomas and malignant gliomas. *Cancer Research* 55:3140-8, 1995
6. Baeuerle PA, Reinhardt C: Bispecific T-cell engaging antibodies for cancer therapy. *Cancer Research* 69: 4941-4, 2009
7. Bigner SH, Humphrey PA, Wong AJ y otros: Characterization of the epidermal growth factor receptor in human glioma cell lines and xenografts. *Cancer Research* 50:8017-8022, 1990
8. Batra SK, Castelino-Prabhu S, Wikstrand CJ y otros: Epidermal growth factor ligand-independent, unregulated, cell-transforming potential of a naturally occurring human mutant EGFRvIII gene. *Cell Growth & Differentiation* 6: 1251-1259, 1995
9. Boockvar JA, Kapitonov D, Kapoor G y otros: Constitutive EGFR signaling confers a motile phenotype to neural stem cells. *Molecular & Cellular Neurosciences* 24:1116-30, 2003
10. Lammering G, Hewit TH, Holmes M y otros: Inhibition of the type III epidermal growth factor receptor variant mutant receptor by dominant-negative EGFR-CD533 enhances malignant glioma cell radiosensitivity. *Clinical Cancer Research* 10: 6732-43, 2004
11. Montgomery RB, Guzman J, O'Rourke DM y otros: Expression of oncogenic epidermal growth factor receptor family kinases induces paclitaxel resistance and alters beta-tubulin isotype expression. *Journal of Biological Chemistry* 275:17358-63, 2000
12. Archer GE, Sampson JH, Lorimer IA y otros: Regional treatment of epidermal growth factor receptor vIII-expressing neoplastic meningitis with a single-chain immunotoxin, MR-1. *Clinical Cancer Research* 5: 2646-52, 1999
13. Yu X, Tsibane T, McGraw PA y otros: Neutralizing antibodies derived from the B cells of 1918 influenza pandemic survivors. *Nature* 455: 532-6, 200814.
14. Smith, K., Arman, L., Wrammert, J., Zheng, N.Y., Capra, J.D., Ahmed, R. y Wilson, P.C. 2009. Rapid generation of fully human monoclonal antibodies specific to a vaccinating antigen. *Nature Protocols* 4(3): 372-384.
15. Heimberger A, Sun W, Hussain S y otros: Immunological responses in a patient with glioblastoma multiforme treated with sequential courses of temozolomide and immunotherapy. *Neuro-Oncology* 10: 98-103, 2008
16. Wrammert J, Smith K, Miller J y otros: Rapid cloning of high-affinity human monoclonal antibodies against influenza virus. *Nature* 453: 667-71, 2008
17. Wu X, Yang ZY, Li Y y otros: Rational design of envelope identifies broadly neutralizing human monoclonal antibodies to HIV-1. *Science* 329: 856-61, 2010
18. Beers, R., Chowdhury, P., Bigner, D. y Pastan, I. 2000. Immunotoxins with increased activity against epidermal growth factor receptor vIII-expressing cells produced by antibody phage display. *Clinical Cancer Research* 6: 2835-2843.
19. Reddy ST, Ge X, Miklos AE y otros: Monoclonal antibodies isolated without screening by analyzing the variable-gene repertoire of plasma cells. *Nature Biotechnology* 28: 965-9, 2010
20. Kuan CT, Wikstrand CJ, Archer G y otros: Increased binding affinity enhances targeting of glioma xenografts by EGFRvIII-specific scFv. *International Journal of Cancer* 88: 962-9, 2000
21. Sblattero D, Bradbury A. Exploiting recombination in single bacteria to make large phage antibody libraries.

Nature Biotechnology 18(1): 75-80, 2000.

22. Li B, Wang H, Dai J y otros: Construction and characterization of a humanized anti-human CD3 monoclonal antibody 12F6 with effective immunoregulation functions. Immunology 116: 487-98, 2005

5 23. Kuan CT, Reist CJ, Foulon CF y otros: 125I-labeled anti-epidermal growth factor receptor-vIII single-chain Fv exhibits specific and high-level targeting of glioma xenografts. Clinical Cancer Research 5: 1539-49, 1999

24. Heimberger AB, Learn CA, Archer GE y otros: Brain tumors in mice are susceptible to blockade of epidermal growth factor receptor (EGFR) with the oral, specific, EGFR-tyrosine kinase inhibitor ZD1839 (iressa). Clinical Cancer Research 8:3496-502, 2002

10 25. Attarwala H (2010) TGN1412: From Discovery to Disaster. (Traducido del inglés) Journal of young pharmacists : JYP 2(3): 332-336 (en inglés).

26. Wang 1998

27. Weetal 2002

LISTADO DE SECUENCIAS

15

<110> DUKE UNIVERSITY

<120> CIERTAS MOLÉCULAS QUE SE ACOPLAN A ANTICUERPOS EGFRviii BIESPECÍFICAS HUMANAS MEJORADAS

20

<130> 000250.00174

<160> 10

25

<170> FastSEQ para Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 1506

<212> ADN

30

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> construcción de secuencia humana modificada; optimizada en codones para la expresión en células CHO

35

<400> 1

	atgaagtggg	tgacctttat	tagcctgctg	ttcctgttct	cctccgccta	ttccgacatc	60
	cagatgactc	agagcccttc	ttccctgtca	gcttccgtgg	gcgacagggg	caccatcaca	120
	tgccgggctt	cccagggaat	tagaaacaat	ctggcatggg	accagcagaa	gccaggcaaa	180
40	gcccccaagc	gctgatctca	tgccgcttct	aacctgcaga	gtggagtgcc	ctcacgattc	240
	acaggcagcg	gatctgggac	agagtttact	ctgattgtct	ccagcctgca	gccagaagat	300
	ttcgccactt	actattgcct	gcagcaccat	tcctaccccc	tgacaagcgg	cggagggact	360
	aaagtggaga	tcaaggggtg	aggaggatct	ggtggaggag	gaagtgggtg	aggaggatca	420
	gaggtgcagg	tcttggaaag	cggtggagga	ctggtgcagc	caggagggtc	cctgcgtctg	480
45	agctgtgcag	cctctggctt	caccttttct	agttatgcaa	tgtcctgggt	gcgccaggca	540
	cctggcaagg	gactggaatg	ggtcagcgca	atcagtggct	caggcgggaag	tacaaactac	600
	gccgactcag	tgaaaggaag	gttcaccatt	agtcgcgata	actcaaagaa	tactctgtat	660
	ctgcagatga	atagcctgcg	ggccgaggac	accgctgtgt	actattgcmc	tggctcatcc	720
	ggatggtctg	aatactgggg	acaggggacc	ctggtgacag	tcagctctgg	gggtggcgga	780
50	tctcaggtgc	agctggtcga	gagtggaggt	ggagtgggtc	agccaggaag	gtccctgcga	840
	ctgagctgtg	ctgcatctgg	tttcaaattt	tctggttacg	gcatgcaact	ggtgagacag	900
	gctcccggaa	aggggctgga	atgggtggca	gtcatctggt	atgacggaag	caagaaatac	960
	tatgtggatt	ctgtcaaagg	gcgattcacc	attagtctgt	ataactcaaa	gaataactct	1020
	tacctgcaaa	tgaatagctt	acgggcagag	gacactgccc	tgtactattg	cgctagacag	1080
55	atgggctatt	ggcattttga	tctgtggggg	cgcggcactc	tggtgaccgt	cagttctgga	1140
	ggagggtgat	ccggaggagg	tggaaagcga	gggggtggct	ctgagatcgt	gctgaccagc	1200
	tctccagcaa	caactgtccct	gagccctgga	gaacgcgcca	caactgtcctg	tcgagcttct	1260
	cagagtgtgt	ccagctacct	ggcctggtat	cagcagaagc	ctggccaggc	tccacgactg	1320
	ctgatctacg	acgcttccaa	ccgtgcaact	ggcattcctg	ctaggttctc	aggatccggg	1380
60	agcgggtacc	actttactct	gaccatctct	agtctggagc	cagaagattt	cgcagtgtac	1440
	tattgtcagc	agaggagcaa	ttggccccct	ctgacttttg	gagggggtac	caaagtctgag	1500
	attaag						1506

ES 2 718 399 T3

<210> 2
 <211> 502
 <212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> construcción de secuencia humana modificada; secuencia de aminoácidos completa que incluye un péptido señal

10

<400> 2

	Met	Lys	Trp	Val	Thr	Phe	Ile	Ser	Leu	Leu	Phe	Leu	Phe	Ser	Ser	Ala
	1				5				10					15		
15	Tyr	Ser	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser
			20					25					30			
	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Gly	Ile	Arg
			35					40					45			
20	Asn	Asn	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Arg
		50					55					60				
	Leu	Ile	Tyr	Ala	Ala	Ser	Asn	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe
	65					70					75					80
	Thr	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Glu	Phe	Thr	Leu	Ile	Val	Ser	Ser	Leu
					85					90					95	
25	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Leu	Gln	His	His	Ser	Tyr
				100				105						110		
	Pro	Leu	Thr	Ser	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Gly	Gly	Gly
			115					120					125			
30	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Val
		130					135					140				
	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu
	145					150					155					160
	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	Ala	Met	Ser	Trp
					165					170					175	
35	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ser	Ala	Ile	Ser
				180					185					190		
	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Asn	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe
			195					200					205			
40	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn
		210					215						220			
	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Gly	Ser	Ser
	225					230					235					240
	Gly	Trp	Ser	Glu	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
				245						250					255	
45	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val
				260					265					270		
	Val	Gln	Pro	Gly	Arg	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe
			275					280					285			
50	Lys	Phe	Ser	Gly	Tyr	Gly	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys
		290					295					300				
	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ala	Val	Ile	Trp	Tyr	Asp	Gly	Ser	Lys	Lys	Tyr
	305					310					315					320
	Tyr	Val	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser
					325					330					335	
55	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr
				340					345					350		
	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Gln	Met	Gly	Tyr	Trp	His	Phe	Asp	Leu
				355				360						365		

ES 2 718 399 T3

Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 370 375 380
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln
 385 390 395 400
 5 Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser
 405 410 415
 Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
 420 425 430
 10 Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg
 435 440 445
 Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 450 455 460
 Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr
 465 470 475 480
 15 Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly
 485 490 495
 Thr Lys Val Glu Ile Lys
 500
 20 <210> 3
 <211> 484
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> construcción de secuencia humana modificada; secuencia de aminoácidos madura
 <400> 3
 30 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 Gln Gly Ile Arg Asn Asn
 20 25 30
 35 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Thr Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Ile Val Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 40 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His His Ser Tyr Pro Leu
 85 90 95
 Thr Ser Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser
 100 105 110
 45 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Val Leu Glu
 115 120 125
 Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
 130 135 140
 Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg
 145 150 155 160
 50 Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser
 165 170 175
 Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
 180 185 190
 55 Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
 195 200 205
 Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Gly Ser Ser Gly Trp
 210 215 220
 Ser Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly

ES 2 718 399 T3

225 230 235 240
 Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
 245 250 255
 5 Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Lys Phe
 260 265 270
 Ser Gly Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 275 280 285
 Glu Trp Val Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Lys Tyr Tyr Val
 290 295 300
 10 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 305 310 315 320
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 325 330 335
 15 Tyr Tyr Cys Ala Arg Gln Met Gly Tyr Trp His Phe Asp Leu Trp Gly
 340 345 350
 Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 355 360 365
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro
 370 375 380
 20 Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg
 385 390 395 400
 Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 405 410 415
 25 Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
 420 425 430
 Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 435 440 445
 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
 450 455 460
 30 Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
 465 470 475 480
 Val Glu Ile Lys

35 <210> 4
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> péptido señal

<400> 4

45 Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
 1 5 10 15
 Tyr Ser

50 <210> 5
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> construcción de secuencia humana modificada; secuencia de VL contra EGFRVIII

<400> 5

60 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 Gln Gly Ile Arg Asn Asn

ES 2 718 399 T3

20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
 35 40 45
 5 Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Thr Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Ile Val Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His His Ser Tyr Pro Leu
 85 90 95
 10 Thr Ser Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

15 <210> 6
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> construcción de secuencia humana modificada; secuencia de VH contra EGFRVIII
 <400> 6

Glu Val Gln Val Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 25 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
 30 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 35 Ala Gly Ser Ser Gly Trp Ser Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser
 115

40 <210> 7
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> construcción de secuencia humana modificada; secuencia de VH contra CD3
 <400> 7

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Lys Phe Ser Gly Tyr
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 60 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

ES 2 718 399 T3

Ala Arg Gln Met Gly Tyr Trp His Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 5 115
 <210> 8
 <211> 108
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> construcción de secuencia humana modificada; secuencia VL contra CD3
 15 <400> 8
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 25 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
 85 90 95
 Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 30 100 105
 <210> 9
 <211> 15
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> enlazador 1
 40 <400> 9
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 45 <210> 10
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> enlazador 2
 <400> 10
 55 Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5

REIVINDICACIONES

1. **Polipéptido** biespecífico, que comprende:
- 5 una primera región variable de cadena única humana que se une a EGFRvIII y comprende segmentos codificados por las SEQ ID NO: 5 y 6 en orden de extremo amino a carboxilo; en serie con una segunda región variable de cadena única humana que se une al ligando CD3 de activación de células T y comprende segmentos codificados por las SEQ ID NO: 7 y 8 en orden de extremo amino a carboxilo; en el que las primera y segunda regiones variables de cadena única humanas están en orden de extremo amino a carboxilo.
- 10 2. Polipéptido biespecífico, según la reivindicación 1, que comprende segmentos codificados por las SEQ ID NO: 5, 6, 10, 7 y 8, en orden de extremo amino a carboxilo.
- 15 3. Polipéptido biespecífico, según la reivindicación 1, que comprende segmentos codificados por las SEQ ID NO: 5, 9, 6, 10, 7, 9 y 8, en orden de extremo amino a carboxilo.
4. Polipéptido biespecífico según la reivindicación 1, que comprende segmentos codificados por las SEQ ID NO: 4, 5, 9, 6, 10, 7, 9 y 8, en orden de extremo amino a carboxilo.
- 20 5. **Polinucleótido** que codifica el polipéptido biespecífico según la reivindicación 1.
6. Polinucleótido, según la reivindicación 5, que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1.
- 25 7. **Polipéptido** biespecífico, según la reivindicación 1, para utilizar en el tratamiento de un paciente con un tumor que expresa EGFRvIII, mediante el cual se induce una respuesta de células T citolíticas al tumor.
8. **Polipéptido** biespecífico, según la reivindicación 1, en el que un segmento de polipéptido espaciador une las primera y segunda regiones variables de cadena única.
- 30 9. **Polipéptido** biespecífico, según la reivindicación 8, en el que el segmento de polipéptido espaciador es (G4S)_n, en el que n es 1-5.
10. **Polipéptido** biespecífico, según la reivindicación 1, en el que un segmento de polipéptido espaciador une los dominios V_L y V_H dentro de la primera región variable de cadena única.
- 35 11. **Polipéptido** biespecífico, según la reivindicación 1, en el que un segmento de polipéptido espaciador une los dominios V_L y V_H dentro de la segunda región variable de cadena única.
12. **Polipéptido** biespecífico, según la reivindicación 10, en el que el segmento de polipéptido espaciador es (G4S)_n, en el que n es 1-5.
- 40 13. **Polipéptido** biespecífico, según la reivindicación 11, en el que el segmento de polipéptido espaciador es (G4S)_n, en el que n es 1-5.
- 45 14. **Polipéptido** biespecífico, según la reivindicación 1, en el que cada región variable de cadena única comprende un enlace disulfuro entre el dominio VH y el dominio VL.
- 50 15. Procedimiento de fabricación de un polipéptido biespecífico que comprende: cultivar una célula que comprende el polinucleótido, según la reivindicación 5 o la reivindicación 6, en un medio de cultivo y recoger el polipéptido biespecífico de las células o medio de cultivo.