

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 729 974**

51 Int. Cl.:

C12N 15/13 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.01.2004** E 10176748 (1)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2019** EP 2270051

54 Título: **Anticuerpo específico de PD-1 y CD3 humanas**

30 Prioridad:

23.01.2003 JP 2003014793

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

07.11.2019

73 Titular/es:

ONO PHARMACEUTICAL CO., LTD. (50.0%)
1-5, Doshomachi 2-chome, Chuo-ku
Osaka-shi, Osaka 541-8526, JP y
HONJO, TASUKU (50.0%)

72 Inventor/es:

HONJO, TASUKU;
SHIBAYAMA, SHIRO;
TAKEDA, KAZUHIKO;
MATSUO, MASAYOSHI;
YOSHIDA, TAKAO y
MIYAMOTO, MASAKAZU

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones:

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

ES 2 729 974 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

Anticuerpo específico de PD-1 y CD3 humanas

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a anticuerpos específicos de la PD-1 humana, anticuerpos biespecíficos que comprenden anticuerpos contra el complejo receptor de linfocitos T humanos o el complejo receptor de linfocitos B humanos, polinucleótidos que los codifican y el uso de los anticuerpos biespecíficos.

10

Antecedentes de la invención

El sistema inmunitario adquirió el mecanismo que permite responder a varios antígenos extraños. El mecanismo reconoce la diversidad de un receptor de antígeno mediante la recombinación de los fragmentos V, (D) y J de los linfocitos T y linfocitos B. Aunque este mecanismo produjo un resultado que produce linfocitos autorreactivos, estos linfocitos autorreactivos se eliminan mediante la selección negativa en el timo o la médula ósea, y se controlan adicionalmente mediante el mecanismo de autotolerancia de delección clonal o anergia en la periferia.

15

20

25

30

Aunque se cree que una enfermedad autoinmunitaria se desarrolla por la degradación de la autotolerancia, se han realizado investigaciones que utilizan varios modelos murinos de enfermedades para dilucidar el mecanismo de la patogénesis. Sin embargo, la etiología de una enfermedad autoinmunitaria y el mecanismo molecular de la autotolerancia siguen sin estar claros. En tal situación, la existencia del ratón, que muestra los síntomas de una enfermedad autoinmunitaria causada por un solo gen deficiente, es muy importante para estudiar la etiología de una enfermedad autoinmunitaria desde un punto de vista de la biología molecular. El ratón CTLA4^{-/-} que causa la infiltración de linfocitos sistémicos letales (Waterhouse P., *et al.*, *Science*, 270:985-988, 1995, Tivol E.A., *et al.*, *Immunity*, 3:541-547, 1995), los ratones moth eaten deficientes en SHP-1 (Shultz L.D., *et al.*, *Cell*, 73:1445-1454, 1993), el ratón lyn^{-/-} que muestra los síntomas de nefritis glomerular (Hibbs M.L., *et al.*, *Cell*, 83:301-311, 1995), y el ratón FCRIIB^{-/-} (Bolland S. & Ravetch J.V., *Immunity*, 13:277-285, 2000) son representativos, y se han estudiado las relaciones de estas moléculas y la autotolerancia.

35

El gen PD-1, que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas, codifica una proteína transmembrana de tipo I de 55 kDa. Tanto la PD-1 de ratón como la PD-1 humana consisten en 288 aminoácidos, y tienen un péptido señal en el extremo N (20 aminoácidos) y una región hidrófoba en la parte media, que es una región transmembrana (*The EMBO J.*, 11(11): 3887-3895, 1992); Publicación de patente japonesa N.º 5-336973; EMBL/GenBank/DDJB Acc. N.º X67914, *Genomics*, 23:704, 1994; Publicación de patente japonesa N.º 7-291996 (Patente US-5629204).

40

En el timo, la PD-1 se expresa en la fase de transición entre el estadio CD4⁻/CD8 a CD4⁺/CD8⁺ en timocitos (Nishimura H., *et al.*, *Int. Immunol.*, 8:773-780 (1996), Nishimura H., *et al.*, *J. Exp. Med.*, 191:891-898 (2000)). En la periferia, la PD-1 se expresa en linfocitos T y linfocitos B activados a través del receptor de antígeno (Agata Y., *et al.*, *Int. Immunol.*, 8:765-772 (1996)) y en células de linaje mielóide activadas tales como macrófagos.

45

La PD-1 tiene un ITIM (motivo inhibidor del inmunorreceptor basado en tirosina) en su región intracelular. Por lo tanto, la PD-1 es un regulador negativo en las respuestas inmunitarias. Dado que los ratones con deficiencia de PD-1 desarrollaron nefritis glomerular y artritis tipo lupus (constitución genética C57BL/6) (Nishimura H., *et al.*, *Int. Immunol.*, 10: 1563-1572, 1998, Nishimura H., *et al.*, *Immunity*, 11:141-151, 1999) y enfermedad tipo cardiomiopatía dilatada (constitución genética BALB/c) (Nishimura H., *et al.*, *Science*, 291:319-322 (2001)), quedó claro que PD-1 actúa como un regulador para el desarrollo de enfermedades autoinmunitarias, especialmente para el mantenimiento de la autotolerancia. Además, se ha descrito que el rechazo del injerto está regulado por la inhibición de la señal de PD-1 (*Journal of Immunology*, 169, 11:6543-6553 (2001)).

50

55

El documento WO 01/14557 identifica B7-4 (PD-L1) como un miembro de la familia B7 de moléculas coestimuladoras y describe que PD-1 es un receptor de las moléculas B7-4. El documento WO 01/14557, y de la misma manera el documento WO 02/078731, se dirigen en términos generales a modular una respuesta inmunitaria positiva o negativa mediante la modulación de PD-1, B7-4 y/o la interacción entre B7-4 y PD-1, abarcando así elementos incluso mutuamente excluyentes. Ambos documentos, WO 01/14557 y WO 02/078731, están formulados en términos similares en lo que se refiere a los anticuerpos biespecíficos, lo que explica que dicho anticuerpo pueda comprender, por ejemplo, un sitio de unión a PD-1 y otro sitio de unión, que se dirige a un receptor activador o inhibidor en una célula para dirigir la molécula a una población celular específica.

60 Divulgación de la invención

Se piensa que PD-1 es un regulador de varias enfermedades autoinmunitarias, y que es uno de los genes causantes de enfermedades autoinmunitarias. El control de la función de PD-1 puede contribuir al tratamiento médico y el diagnóstico de supresión o potenciación de la función inmunitaria, infección, rechazo de trasplantes y neoplasias. etc. Como resultado de una exhaustiva investigación, los presentes inventores llegaron a la presente invención que se refiere a las sustancias que controlan la función de PD-1.

65

Los estímulos en los linfocitos, que controlan la inmunidad, se transmiten principalmente a través del receptor de linfocitos T (TCR) en el caso de los linfocitos T, y el receptor de linfocitos B (BCR) en el caso de los linfocitos B, y la posterior fosforilación intracelular juega un papel importante en el mecanismo molecular.

5 Dado que se ha aclarado que PD-1 regula negativamente varias células inmunocompetentes como linfocitos y células mieloides etc., y que PD-1 tiene un ITIM (motivo inhibidor del inmunorreceptor basado en tirosina) en su región intracelular, los presentes inventores consideraron que el reclutamiento de enzimas de desfosforilación (fosfatasa) podría estar involucrado en el mecanismo molecular de la transducción de señales inhibitorias mediada por PD-1. Por lo tanto, se planteó la hipótesis de que al conseguir que la PD-1 se localice junto con el TCR o BCR
10 podría ejercer la función de la PD-1.

Los presentes inventores confirmaron que la señal inhibitoria de PD-1 se transmitía con la sustancia, que entrecruza físicamente PD-1 con TCR o BCR. Primero, los presentes inventores confirmaron que la idea anterior era correcta utilizando anticuerpos anti-PD-1 y anticuerpos anti-CD3. CD3 es una proteína de membrana expresada en linfocitos T y es un componente de los complejos de TCR. Los anticuerpos divalentes se construyeron formando un puente
15 entre los anticuerpos anti-PD-1 y los anticuerpos anti-CD3. La presente invención se completó aislando cada ADNc que codifica el anticuerpo anti-PD-1 humana y el anticuerpo anti-TCR humano y produciendo un anticuerpo biespecífico producido mediante la construcción de vectores de expresión que pueden expresar proteínas de fusión que comprenden cada sitio de reconocimiento de antígeno de ambos anticuerpos.

20 La presente invención se define por las reivindicaciones. En particular, la presente invención proporciona:

[1] Un anticuerpo biespecífico para su uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria, en el que el anticuerpo biespecífico es una proteína de fusión que comprende: (i) una región variable de la cadena pesada de un anticuerpo anti-PD-1 humana, (ii) una región variable de la cadena ligera de un anticuerpo anti-PD-1, (iii) una
25 región variable de la cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 humana, y (iv) una región variable de la cadena ligera de un anticuerpo anti-CD3 humana, y que se une a la PD-1 humana y a la CD3 humana simultáneamente, en el que dicha CD3 humana se expresa en la misma célula que se expresa dicha PD-1 humana; y en el que la enfermedad autoinmunitaria se selecciona del grupo que consiste en nefritis glomerular, artritis, enfermedad tipo miocardiopatía dilatada, colitis ulcerosa, síndrome de Sjögren, enfermedad de Crohn, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide crónica, esclerosis múltiple, psoriasis, dermatitis de contacto alérgica, polimiositis, paquidermia, periarteritis nodosa, fiebre reumática, vitiligo vulgaris, diabetes mellitus dependiente de insulina, enfermedad de Behçet, enfermedad de Hashimoto, enfermedad de Addison, dermatomiositis, miastenia gravis, síndrome de Reiter, enfermedad con de Graves, anemia perniciosa, síndrome de Goodpasture, esterilidad patológica, hepatitis activa crónica, pénfigo, púrpura trombocitopénica autoinmunitaria y anemia hemolítica autoinmunitaria.

[2] El anticuerpo biespecífico para su uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria de acuerdo con [1], en el que la enfermedad autoinmunitaria se selecciona de diabetes mellitus dependiente de insulina, lupus eritematoso sistémico y esclerosis múltiple.

[3] El anticuerpo biespecífico para su uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria de acuerdo con [1], en el que las siguientes regiones variables están unidas por enlaces peptídicos en el siguiente orden: (i) una región variable de la cadena pesada de un anticuerpo anti-PD-1 humana, (ii) una región variable de la cadena ligera de un anticuerpo anti-PD-1 humana, (iii) una región variable de la cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 humana, y (iv) una región variable de la cadena ligera de un anticuerpo anti-CD3 humana.

[4] El anticuerpo biespecífico para su uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria de acuerdo con [1] o [3], en el que (i) la región variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-PD-1 humana comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, (ii) la región variable de la cadena ligera del anticuerpo anti-PD-1 humana comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, (iii) la región variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-CD3 humana comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC. ID NO: 6 y (iv) la región variable de la cadena ligera de un anticuerpo anti-CD3 humana comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8.

[5] El anticuerpo biespecífico para su uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria de acuerdo con [4], en el que el anticuerpo biespecífico comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11.

[6] Un anticuerpo biespecífico que es una proteína de fusión que comprende: (i) una región variable de la cadena pesada de un anticuerpo anti-PD-1 humana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, (ii) una región variable de la cadena ligera de un anticuerpo anti-PD-1 humana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, (iii) una región variable de la cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 humana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, y (iv) una región variable de la cadena ligera del anticuerpo anti-CD3 humana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8, en la que el anticuerpo biespecífico se une a la PD-1 humana y a la CD3 humana simultáneamente, en la que dicha CD3 humana se expresa en la misma célula que se expresa dicha PD-1 humana .

[7] Un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11.

[8] El polinucleótido de acuerdo con [7], que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 9.

[9] Un vector de duplicación o expresión que comprende el polinucleótido de [7].

[10] Una célula hospedadora transformada por el vector de duplicación o expresión de la reivindicación [9].

La presente divulgación se refiere a lo siguiente:

- 5 (1) Una sustancia específica de la PD-1 humana que comprende una parte que reconoce la PD-1 humana, una parte que reconoce una proteína de membrana de la membrana celular de las células que expresan la PD-1 humana, y un enlazador.
- (2) La sustancia específica de la PD-1 humana de acuerdo con (1), en la que la parte que reconoce la PD-1 humana es un anticuerpo contra la PD-1 humana o un fragmento parcial del mismo.
- 10 (3) La sustancia específica de la PD-1 humana de acuerdo con (1), en la que la parte que reconoce una proteína de membrana de la membrana celular de las células humanas que expresan PD-1 es un anticuerpo contra la proteína de membrana o un fragmento parcial del mismo.
- (4) La sustancia específica de la PD-1 humana de acuerdo con (1), que comprende un anticuerpo contra la PD-1 humana o un fragmento parcial del mismo, un anticuerpo contra la proteína de membrana de la membrana celular de células humanas que expresan PD-1 o un fragmento parcial del mismo, y un enlazador.
- 15 (5) La sustancia específica de la PD-1 humana de acuerdo con uno cualquiera de (1), (3) y (4), en la que la proteína de membrana es un complejo receptor de linfocitos T humanos o un complejo receptor de linfocitos B humanos.
- (6) La sustancia específica de la PD-1 humana de acuerdo con (1) o (4), en la que el enlazador es un péptido.
- (7) Un anticuerpo biespecífico que comprende un anticuerpo contra la PD-1 humana o un fragmento parcial del mismo, un anticuerpo contra el complejo receptor de linfocitos T humanos o un fragmento parcial del mismo, y un enlazador.
- 20 (8) Un anticuerpo biespecífico que comprende un anticuerpo contra la PD-1 humana o un fragmento parcial del mismo, un anticuerpo contra el complejo receptor de linfocitos B humano o un fragmento parcial del mismo, y un enlazador.
- (9) El anticuerpo biespecífico de acuerdo con (7) o (8), en el que el enlazador es un péptido.
- 25 (10) Un polipéptido sustancialmente puro que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2, un homólogo del mismo, un fragmento del mismo o un homólogo del fragmento, o un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos en la cual se ha eliminado, sustituido y/o añadido 1-10 aminoácidos del polipéptido, en el que el polipéptido conforma un anticuerpo contra la PD-1 humana.
- 30 (11) Un polipéptido sustancialmente puro que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 4, un homólogo del mismo, un fragmento del mismo o un homólogo del fragmento, o un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos en la cual se ha eliminado, sustituido y/o añadido 1-10 aminoácidos del polipéptido, en el que el polipéptido conforma un anticuerpo contra la PD-1 humana.
- 35 (12) Un complejo polipeptídico que comprende los polipéptidos de acuerdo con (10) y (11).
- (13) Un polipéptido sustancialmente puro que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 11, un homólogo del mismo, un fragmento del mismo o un homólogo del fragmento, o un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos en la cual se ha eliminado, sustituido y/o añadido 1-10 aminoácidos del polipéptido.
- 40 (14) Un polipéptido sustancialmente puro que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 11, un homólogo del mismo, un fragmento del mismo o un homólogo del fragmento, o un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos en la cual se ha eliminado, sustituido y/o añadido 1-10 aminoácidos del polipéptido, que es el anticuerpo biespecífico de acuerdo con uno cualquiera de (7) a (9).
- 45 (15) Un polinucleótido que codifica el polipéptido de acuerdo con uno cualquiera de (10), (11), (13) y (14), un homólogo del mismo o un polinucleótido complementario del mismo, o un fragmento del mismo o un homólogo del fragmento.
- (16) Un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 3 o la SEQ ID NO: 9, un homólogo del mismo o un polinucleótido complementario del mismo, o un fragmento del mismo o un homólogo del fragmento.
- 50 (17) Un vector de duplicación o expresión que comprende el polinucleótido de acuerdo con (15) o (16).
- (18) Una célula hospedadora transformada por el vector de duplicación o expresión de acuerdo con (17).
- (19) Un método de fabricación de la sustancia de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (6), que comprende cultivar la célula hospedadora de acuerdo con (18) en condiciones para expresar la sustancia.
- 55 (20) Un método de fabricación del anticuerpo biespecífico de acuerdo con uno cualquiera de (7) a (9), que comprende cultivar la célula hospedadora de acuerdo con (18) en condiciones para expresar el anticuerpo biespecífico.
- (21) Un método de fabricación del polipéptido de acuerdo con uno cualquiera de (10) a (14), que comprende cultivar la célula hospedadora de acuerdo con (18) en condiciones para expresar el polipéptido.
- 60 (22) Una composición farmacéutica terapéutica y/o preventiva para enfermedades relacionadas con la PD-1 humana, que comprende una cantidad eficaz de la sustancia de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (6), el anticuerpo biespecífico de acuerdo con uno cualquiera de (7) a (9), el complejo polipeptídico de acuerdo con (12), o el polipéptido de acuerdo con (13) o (14).
- (23) La composición farmacéutica terapéutica y/o preventiva de acuerdo con (22), en la que las enfermedades relacionadas con la PD-1 humana son enfermedades seleccionadas de enfermedades neurodegenerativas, enfermedades autoinmunitarias, colagenosis, rechazo de trasplantes de órganos, tumores y enfermedades infecciosas.
- 65 (24) La composición farmacéutica terapéutica y/o preventiva de acuerdo con (22), en la que las enfermedades

neurodegenerativas son enfermedades seleccionadas de geriopsicosis, enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down, enfermedad de Parkinson, neuropatía diabética, síndrome de Parkinson, enfermedad de Huntington, enfermedad de Machado-Joseph, esclerosis lateral amiotrófica, neuropatía diabética y enfermedad de Creutzfeldt-Jakob.

5 (25) La composición farmacéutica terapéutica y/o preventiva de acuerdo con (22), en la que las enfermedades autoinmunitarias son enfermedades seleccionadas de nefritis glomerular, artritis, enfermedad tipo miocardiopatía dilatada, colitis ulcerosa, síndrome de Sjögren, enfermedad de Crohn, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide crónica, esclerosis múltiple, psoriasis, dermatitis alérgica de contacto, polimiosis, paquidermia, periarteritis nodosa, fiebre reumática, vitiligo vulgaris, diabetes mellitus dependiente de insulina, enfermedad de Behcet, enfermedad de Hashimoto, enfermedad de Addison, dermatomiositis, miastenia gravis, síndrome de Reiter, enfermedad de Graves, anemia perniciosa, síndrome de Goodpasture, esterilidad patológica, hepatitis crónica activa, pénfigo, púrpura trombocitopénica autoinmunitaria y anemia hemolítica autoinmunitaria.

15 La parte que reconoce la PD-1 humana solo tiene que ser una sustancia que reconozca la PD-1 humana, por ejemplo, el anticuerpo anti-PD-1 humana o un fragmento del mismo, la propia PD-1 humana o un fragmento del mismo, un ligando de la PD-1 humana o un fragmento del mismo (Freeman, GJ, *et al.*, *Journal of Experimental Medicine*, 192, 7:1027-1034 (2000)), PD-L2 humano y PD-H3 humano etc.), y un compuesto orgánico de bajo peso molecular. etc.

20 Un anticuerpo para la PD-1 humana o un fragmento del mismo puede ser un anticuerpo policlonal o monoclonal completo, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano completo y un anticuerpo acortado del mismo (por ejemplo, F(ab')₂, Fab', Fab, Fv) etc. que contiene un anticuerpo anti-PD-1 humana o un fragmento del mismo.

25 Concretamente, son anticuerpos monoclonales anti-PD-1 humana producidos por hibridomas (número de identificación internacional FERM P-19162) que se depositaron en el Depositario del Organismo Internacional de Patentes del Instituto Nacional de Tecnología y Evaluación en Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki, Japón, el 19 de diciembre de 2002, y que se transfirieron al Depósito Internacional el 5 de junio de 2003 (número de identificación internacional FERM BP-8392), que recibió el nombre de J110. Aunque se prefieren los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂, Fab', Fab y Fv de estos anticuerpos etc., no se limitan a estos.

30 Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂, Fab', Fab y Fv pueden obtenerse procesando anticuerpos completos con enzima proteasa y, opcionalmente, reduciéndolos. Se pueden producir como anticuerpos, fragmentos de los mismos o proteínas de fusión con otras proteínas y los fragmentos, utilizando el vector de expresión creado por reordenamiento génico utilizando el ADNc separado del hibridoma productor de anticuerpos.

35 La proteína de membrana de la membrana celular de las células humanas que expresan PD-1 significa la proteína de membrana que se expresa en la membrana celular de la misma célula que las células humanas que expresan PD-1, e incluye cada una de ellas la proteína de membrana de células de cultivo en primera fase humanas o líneas celulares humanas que expresan la PD-1 humana. Por ejemplo, es preferible el complejo receptor de linfocitos T o el complejo receptor de linfocitos B.

40 La parte que reconoce la proteína de membrana de la membrana celular de las células que expresan la PD-1 humana puede ser una sustancia que reconoce la proteína de membrana que se expresa en la membrana celular de la misma célula que las células que expresan la PD-1 humana, e incluye, por ejemplo, anticuerpos contra la proteína de membrana y fragmentos de los mismos, la propia proteína de membrana y fragmentos de la misma, ligandos para la proteína de membrana y fragmentos de la misma, y compuestos orgánicos de bajo peso molecular que se unen a la proteína de membrana etc.

45 Los anticuerpos o fragmentos parciales de los mismos contra la proteína de membrana de la membrana celular de las células que expresan la PD-1 humana son anticuerpos o fragmentos parciales de los mismos contra la proteína de membrana que se expresa en la membrana celular de la misma célula que las células que expresan la PD-1 humana, y pueden ser de anticuerpos policlonales o monoclonales completos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos completos y fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, F(ab')₂, Fab', Fab, Fv) etc.

50 Un complejo receptor de linfocitos T es al menos un complejo que comprende el receptor de linfocitos T que consiste en una subunidad α y una subunidad β y CD3 que consiste en una subunidad γ, una subunidad δ, una subunidad ε y una subunidad ζ.

55 Un complejo receptor de linfocitos B es al menos un complejo que comprende una inmunoglobulina unida a la membrana, una subunidad CD79α y una subunidad CD79β.

60 Los anticuerpos o fragmentos parciales de los mismos contra un complejo receptor de linfocitos T pueden ser anticuerpos o fragmentos parciales de los mismos que reconocen el complejo receptor de linfocitos T. Estos incluyen anticuerpos o fragmentos parciales de los mismos contra cada subunidad del receptor de linfocitos T y CD3, que compone el complejo del receptor de linfocitos T y pueden ser anticuerpos policlonales o monoclonales completos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos completos y fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, F(ab')₂, Fab',

Fab, Fv) etc. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales contra CD3 pueden producirse utilizando un hibridoma que ya se ha establecido. Se puede adquirir anti-CD3 (α -CD3 ϵ mAb (PharMingen, Inc.)).

Los anticuerpos o fragmentos parciales de los mismos contra un complejo receptor de linfocitos B pueden ser anticuerpos o fragmentos parciales de los mismos que reconocen el complejo receptor de linfocitos B. Incluyen anticuerpos o fragmentos parciales de los mismos contra cada subunidad de inmunoglobulina unida a membrana y CD79, que compone el complejo receptor de linfocitos B, y pueden ser anticuerpos policlonales o monoclonales completos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos completos y fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, F(ab')₂, Fab', Fab, Fv) etc. Concretamente, se pueden usar anticuerpos anti-BCR comerciales y, por ejemplo, se pueden adquirir anticuerpos policlonales anti-IgG (H+L) (Zymed Laboratories).

La sustancia que comprende la parte que reconoce la PD-1 humana y la parte que reconoce la proteína de membrana de la membrana celular de las células que expresan la PD-1 humana significa una sustancia que puede unirse simultáneamente a un dominio extracelular de la PD-1 humana y a un dominio extracelular de la proteína de membrana de la membrana celular de la misma célula. Concretamente, incluyen anticuerpos biespecíficos que comprenden anticuerpos específicos o fragmentos de los mismos contra la PD-1 humana y anticuerpos específicos o fragmentos de los mismos contra la proteína de membrana de la membrana celular de las células que expresan la PD-1 humana.

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos asimétricos que tienen dos sitios de reconocimiento de antígeno independientes con dos especificidades antigénicas diferentes. Un método químico muy conocido (Nisonoff, A., *et al.*, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 90; 460-462 (1961), Brennan, M., *et al.*, *Science*, 299; 81-83 (1985)) es bien conocido como un método de preparación de los anticuerpos biespecíficos. Los anticuerpos biespecíficos pueden obtenerse hidrolizando respectivamente dos tipos de anticuerpos mediante enzimas y cortando los enlaces disulfuro de las cadenas H mediante agentes reductores, y mezclando y reoxidando a continuación los diferentes tipos de anticuerpos. Recientemente, se ha divulgado un método de preparación que utiliza agentes de reticulación, como glutaraldehído y carbodiimida (JP02-01556).

Se conocen tecnologías que producen directamente los anticuerpos biespecíficos mediante el uso de tecnologías de recombinación génica. Por ejemplo, la producción de anticuerpos biespecíficos (llamado diacuerpo de cadena simple) contra el antígeno carcinoembrionario y la beta-galactosidasa de *E. coli* ha sido descrita en Alt, *FEBS Letter*, 454, 90 (1999). Un dominio variable de la cadena pesada (VH) y otro dominio variable de la cadena ligera (VL) del fragmento se conectan con enlazadores para combinarlos entre dos dominios continuos en la misma cadena. Un dominio variable de la cadena pesada (VH) y otro dominio variable de la cadena ligera (VL) del fragmento están conectados con enlazadores para combinarlos entre dos dominios continuos en la misma cadena. Por lo tanto, es inevitable que los dominios VH y VL del fragmento se combinen con los dominios VL y VH complementarios de otro fragmento, y como resultado, se forman dos sitios de unión al antígeno. Aunque se prefieren 3-12 residuos de aminoácidos para los enlazadores peptídicos, la secuencia no está limitada (Hudson, P.J., *et al.*, *Journal of Immunology Medicine*, 231, 1-2; 177-189 (1999)).

Para la fabricación de los anticuerpos biespecíficos que utilizan hibridomas, se puede recurrir al método de Reading *et al.*, es decir, un método para producir hibridomas híbridos mediante la fusión adicional de dos tipos de hibridomas que producen los anticuerpos monoclonales y posterior selección de hibridomas híbridos que producen los anticuerpos biespecíficos diana (US4474893).

Los anticuerpos biespecíficos que comprenden anticuerpos específicos o fragmentos de los mismos contra la PD-1 humana y anticuerpos específicos o fragmentos de los mismos contra la proteína de membrana de la membrana celular de las células que expresan la PD-1 humana son anticuerpos que pueden unirse simultáneamente al dominio extracelular de la PD-1 humana y al dominio extracelular de la proteína de membrana de la membrana celular de la misma célula.

Los anticuerpos biespecíficos se pueden producir mediante el siguiente método:

- (1) los animales son sensibilizados con la PD-1 humana o la proteína de membrana humana como un inmunógeno,
- (2) se fusionan las células esplénicas de los animales sensibilizados y las células de mieloma de animales singénicos,
- (3) las células que producen anticuerpos monoclonales contra el antígeno sensibilizante (PD-1 humana o proteína de membrana humana) se seleccionan a partir de los hibridomas obtenidos,
- (4) se clonan los hibridomas que producen los anticuerpos diana,
- (5) se dejan proliferar los hibridomas que producen anticuerpos clonados,
- (6) se separan y refinan los anticuerpos producidos,
- (7) se producen los anticuerpos biespecíficos mediante la reticulación de los anticuerpos anti-PD-1 humana y los anticuerpos anti-proteína de membrana humana con enlazadores, o
- (8) se digieren adicionalmente con pepsina y se separan, y se refinan para obtener F(ab')₂,
- (9) cada preparado F(ab')₂ se reduce, se separa y se refina.

(10) los anticuerpos biespecíficos se pueden producir mediante la reticulación de cada Fab_{SH} preparado mediante enlazadores.

5 Los enlazadores no están limitados y pueden ser cualquier cosa que pueda unir la parte que reconoce la proteína de membrana de las células que expresan PD-1 con la parte que reconoce la PD-1 humana, manteniendo un rango apropiado. Más concretamente, incluyen péptidos y amidas. etc.

Se pueden usar como enlazadores productos comerciales, por ejemplo, fenilendimaleimida (Aldrich).

10 Cuando ambas o una de las sustancias que reconocen respectivamente la proteína de membrana de las células que expresan PD-1 y la PD-1 humana de bajo peso molecular es(son) un compuesto(s) orgánico de peso molecular,

15 (11) utilizando los anticuerpos producidos por la técnica anterior, se detectan las moléculas de bajo peso molecular que inhiben un enlace entre la proteína de membrana humana o la PD-1 humana y cada anticuerpo midiendo con un detector adecuado,

(12) el anticuerpo puede producirse mediante la reticulación de las moléculas de bajo peso molecular, los anticuerpos o el Fab con enlazadores.

20 Cada proceso se explica concretamente de la siguiente manera.

(1) En la sensibilización, es preferible que la PD-1 humana o la proteína de membrana humana se administren a la cavidad peritoneal o la almohadilla plantar de los animales sensibilizados. Los animales sensibilizados pueden ser animales como el ratón y la rata. etc. de modo que se pueda obtener generalmente el anticuerpo monoclonal, aunque esto no está limitado. Por ejemplo, es suficiente que se administren de una vez de 10 a 200 µg del antígeno al ratón.

30 Se extirpa el bazo del animal sensibilizado cuyo título de anticuerpos ha aumentado lo suficiente entre los animales sensibilizados en el apartado anterior (1). La suspensión de las células esplénicas se prepara de la manera habitual. A continuación, se realiza una fusión celular del apartado (2) anterior agregando polietilenglicol (preferiblemente PEG4000) a la mezcla con las células esplénicas obtenidas y las células de mieloma singénicas a 37 °C. Se conocen varios tipos de células de mieloma de ratón, tales como P3 × 63Ag8, P3/NS1/1-Ag4-1 y SP-2/0-Ag-14 y todas ellas se pueden obtener fácilmente.

35 Es preferible que las células de mieloma sean HGPRT (hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa), se utilizan preferiblemente líneas que no puedan vivir en medios HAT (un medio que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina) y que no secreten anticuerpos. SP-2/0-Ag-Ag- 4.

40 A continuación, las mezclas de fusión celular obtenidas se siembran en placas de 96 micropocillos a baja densidad, las cuales se cultivan en medio HAT. Al cabo de 1 a 2 semanas, las células de mieloma no fusionadas, los hibridomas de células de mieloma, las células esplénicas no fusionadas y los hibridomas de células esplénicas desaparecen, mientras que solo los hibridomas de células esplénicas y las células de mieloma proliferan.

45 Al hacer reaccionar el sobrenadante de cultivo de los hibridomas con antígenos en fase sólida y medir los anticuerpos que adsorben específicamente los antígenos utilizando segundos anticuerpos marcados, la selección de los anteriores (3) determina si los hibridomas producen los anticuerpos contra la proteína de la membrana humana o la PD-1 humana o no.

50 El proceso de (4) se realiza mediante la clonación de hibridomas productores de anticuerpos de acuerdo con el cultivo de agar blando (*Monoclonal Antibodies*, 372 (1980)). En este caso, también es posible utilizar la dilución limitante.

55 En el proceso de (5), para obtener una gran cantidad de anticuerpo de manera más eficiente, se puede usar un método para administrar los hibridomas en la cavidad peritoneal del ratón, y separarlos y refinarlos del líquido peritoneal.

En el proceso de (6) se utilizan los métodos habituales, como la extracción con sal, la cromatografía de intercambio iónico, la filtración en gel, la cromatografía hidrófoba y la cromatografía de afinidad. etc. y más eficazmente, se puede usar la cromatografía de afinidad utilizando la proteína A-sepharose CL-4B (Amersham Biosciences K.K.).

60 Dado que los anticuerpos biespecíficos de la presente divulgación se unen específicamente, se pueden usar para la purificación y la concentración, tal como la cromatografía de afinidad. etc. de la PD-1 humana.

65 En el proceso de (7), por ejemplo, los agentes de reticulación pueden hacer que la sal sódica de sulfo-EMCS (N-(6-maleinimidacaproxi) succinimida) se una a grupos SH (mercapto) o grupos amida de los anticuerpos. Primero, cualquiera de los anticuerpos se somete a reacciones de acoplamiento de amido con sulfo-EMCS. La sulfo-EMCS sin reaccionar se separa por filtración en gel. Los grupos SH (mercapto) del otro anticuerpo que se han reducido por

la 2-mercaptoetilamina etc. se hacen reaccionar con grupos maleimida de la sulfo-EMCS que se han unido al primer anticuerpo. Los dos tipos de anticuerpos reticulados mutuamente se separan por filtración en gel.

5 En el proceso de (8), cada anticuerpo que se obtuvo en el proceso (6) se digirió con pepsina durante 48 horas a 37 °C. Los F(ab')₂ digeridos con pepsina se purifican mediante métodos habituales, tales como extracción en sal, cromatografía de intercambio iónico, filtración en gel, cromatografía hidrófoba y cromatografía de afinidad etc. y más eficazmente, se puede usar la filtración en gel con cefaclor S-200 (Amersham Biosciences K.K.).

10 En el proceso de (9), los F(ab')₂ se reducen con 2-mercaptoetanol durante 30 minutos a 30 °C. Los Fab_{SH} reducidos se purifican por métodos habituales, como la extracción en sal, la cromatografía de intercambio iónico, la filtración en gel, la cromatografía hidrófoba y la cromatografía de afinidad etc. y más efectivamente, se puede usar filtración en gel usando cefaclor S-200.

15 En el proceso de (10), los otros anticuerpos de la fracción de Fab_{SH} se unen con enlazadores. Los agentes de reticulación solo tienen que unir los grupos mercapto (SH) des Fab_{SH}, que se hace reaccionar con fenilendimaleimida durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se hace reaccionar con 1,3 veces más que el otro Fab_{SH} durante 4 horas a temperatura ambiente. La sustancia obtenida que tiene especificidad bivalente se purifica por métodos habituales tales como extracción en sal, cromatografía de intercambio iónico, filtración en gel, cromatografía hidrófoba y cromatografía de afinidad. etc. y más efectivamente, se puede usar filtración en gel usando cefaclor S-200.

20 En el proceso de (11), los anticuerpos obtenidos en el proceso (6) se pueden usar tal cual, o preferiblemente marcados (por ejemplo, marcaje con biotina y marcaje con FITC). etc.) según el procedimiento común. En el ELISA, los anticuerpos se agregan a los antígenos de fase sólida. A continuación, cuando se usa un anticuerpo secundario marcado con enzima y un anticuerpo marcado con biotina, la unión específica entre los anticuerpos y los antígenos se puede medir con un absorciómetro en presencia de una sustancia cromófora, después de agregar estreptavidina marcada con enzima. Las moléculas de bajo peso molecular que reconocen específicamente la PD-1 o la proteína de membrana se pueden obtener usando este sistema de ensayo.

30 En el proceso de (12), cuando el otro es un anticuerpo o Fab, este puede unirse a un anticuerpo o Fab introduciendo grupos funcionales adecuados en las moléculas de bajo peso molecular obtenidas. Por ejemplo, si se introducen grupos maleimida, puede unirse a grupos mercapto (SH) del anticuerpo o Fab. Si ambas son moléculas de bajo peso molecular, se pueden sintetizar ambas moléculas.

35 Por otro lado, el ADNc de cada anticuerpo se puede separar de los hibridomas que producen los anticuerpos monoclonales contra cada antígeno. Mediante la transformación de las células hospedadoras adecuadas usando un vector de expresión que contiene ADN, tanto el ADNc como sus fragmentos parciales se unen mediante métodos de recombinación génica, y las células hospedadoras pueden producir anticuerpos biespecíficos.

40 Concretamente, los anticuerpos biespecíficos que comprenden los anticuerpos contra la PD-1 humana o fragmentos parciales de los mismos y los anticuerpos contra la proteína de membrana de la membrana celular de las células que expresan la PD-1 humana o fragmentos parciales de los mismos se pueden preparar mediante los siguientes métodos;

- 45 (1) Cada gen de anticuerpo se separa de cada hibridoma que produce anticuerpos monoclonales anti-PD-1 humana y anticuerpos monoclonales anti-proteína de membrana respectivamente,
 (2) El ADN de la región variable del gen del anticuerpo monoclonal anti-PD-1 humana y el ADN de la región variable del gen del anticuerpo monoclonal anti-proteína de membrana se enlazan usando un enlazador de ADN. Los vectores de expresión que contienen los fragmentos de ADN enlazados se introducen en células
 50 hospedadoras adecuadas,
 (3) las células se cultivan en condiciones de cultivo adecuadas y las proteínas producidas se separan y se refinan.

55 Cada proceso se explica concretamente de la siguiente manera.

El proceso de (1) comprende un proceso de separación de ARN de hibridomas y un proceso de separación de un gen de anticuerpo o ADNc que codifica su péptido parcial.

60 El proceso de separación del ARN total o del ARNm de los hibridomas puede realizarse de acuerdo con un método bien conocido (un método descrito en Sambrook, J., *et al.*, *Molecular Cloning* (1989), Cold Spring Harbor Laboratory, o F. M. Ausubel., *et al.*, *Current Protocol in Molecular Biology*).

65 Mediante el uso de cebadores de ADN sintéticos que tienen secuencias de nucleótidos parciales de los anticuerpos de la presente divulgación, el ADNc que codifica los genes de los anticuerpos de la presente invención o su péptido parcial se puede amplificar mediante la reacción en cadena de la polimerasa (en lo sucesivo denominada PCR). O, por hibridación con sondas marcadas utilizando fragmentos de ADN o los ADN sintéticos que codifican una parte o

la región completa de los anticuerpos de la presente divulgación, el ADNc puede seleccionarse del ADNc contenido en vectores adecuados. La hibridación se puede realizar de acuerdo con un método bien conocido. El gen del anticuerpo puede amplificarse utilizando el ARN total o el ARNm mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (en lo sucesivo denominada RT-PCR).

5 (2) Como un método para producir los anticuerpos biespecíficos de la presente divulgación, se citan

(i) un método de síntesis de péptidos y

(ii) un método de producción mediante tecnologías de recombinación génica. etc. y el método descrito en (ii) es preferible industrialmente.

10 El sistema de expresión (sistema hospedador-vector) para producir péptidos mediante el uso de tecnologías de recombinación génica incluye, por ejemplo, el sistema de expresión de bacilos, levaduras, células de insectos y células de mamíferos.

15 El sistema vectorial incluye plásmidos de *E. coli* (por ejemplo, pBR322, pBR325, pUC12 y pUC13), plásmidos de *Bacillus subtilis* (por ejemplo, pUB110, pTP5 y pC194), plásmidos de levadura (por ejemplo, pSH19 y pSH15), bacteriófagos tales como el fago lambda, virus animales tales como retrovirus, virus vaccinia y baculovirus, PA1-11, pXT1, pRc/CMV, pRc/RSV y pcDNA1/Neo etc.

20 El promotor debe ser un promotor apropiado correspondiente al hospedador de expresión génica. Por ejemplo, cuando se usan células animales como hospedadores, cabe citar el promotor SR α , el promotor SV40, el promotor LTR, el promotor CMV y el promotor HSV-TK etc. Es preferible utilizar el promotor CMV (citomegalovirus), el promotor SR α . etc. En el caso de *Escherichia coli*, son preferibles el promotor trp, el promotor lac, el promotor recA, el promotor λ PL, el promotor lpp y el promotor T7 etc. En el caso de la bacteria *Bacillus*, son preferibles el promotor SPO1, el promotor SPO2 y el promotor penP etc. En el caso de las levaduras, son preferibles el promotor PHO5, el promotor PGK, el promotor GAP y el promotor ADH, etc.

Además, si es necesario se puede utilizar el vector de expresión que contiene potenciador, señal de corte y empalme, señal poliA, marcador seleccionado y ori de replicación de SV40 (en lo sucesivo se puede denominar SV40ori). etc. El marcador seleccionado incluye, por ejemplo, el gen de la dihidrofolato reductasa (en lo sucesivo se puede denominar dhfr), el gen de resistencia a metotrexato (MTX), el gen de resistencia a ampicilina (en lo sucesivo se puede denominar Ampr), y el gen de resistencia a neomicina (en lo sucesivo se puede denominar Neor), el gen de resistencia a G418, etc. Especialmente, cuando el gen dhfr se usa como un marcador seleccionado utilizando células de hámster chino deficientes en el gen dhfr, se puede seleccionar un gen diana incluso usando el medio sin timidina. Para que la secuencia señal sea adecuada para los hospedadores si es necesario puede agregarse al lado N-terminal de la proteína de la presente invención. Cuando los hospedadores son *Escherichia*, se puede usar la secuencia señal PhoA y la secuencia señal OmpA etc. Cuando los hospedadores son bacilos, se puede usar la secuencia señal de la α -amilasa y la secuencia señal de la subtilisina etc. Cuando los hospedadores son bacilos, se puede usar la secuencia señal MF α , la secuencia señal SUC2 etc. Cuando los hospedadores son células animales, se puede usar la secuencia señal de la α -insulina, la secuencia señal del α -interferón y la secuencia señal de anticuerpo etc., respectivamente. Los transformantes pueden fabricarse utilizando el vector que contiene el ADN que codifica la proteína construida.

45 Mediante el cultivo de *Escherichia* transformada con el vector de expresión en un medio adecuado, se obtiene el péptido diana de las células del cuerpo. Y, si se usa un péptido señal (por ejemplo, un péptido señal de pelB) de bacterias, el péptido diana se secreta en el periplasma. Además, se puede producir como proteína de fusión con otro péptido. En el caso de la expresión en células de mamíferos, por ejemplo, cultivando células de mamífero transformadas con vectores de expresión adecuados que incluyen ADNc que codifica una proteína diana en un medio adecuado, se secretan al medio los péptidos diana.

50 Por ejemplo, se pueden utilizar como células hospedadoras *Escherichia*, bacterias *Bacillus*, levaduras, células de insectos, insectos y células animales. etc. Por ejemplo, pueden utilizarse como ejemplos concretos de *Escherichia*, *Escherichia coli* K12, DH1, JM103, JA221, HB101, C600, JM109, DH5 y DH5 α etc. Por ejemplo, el bacilo *Bacillus subtilis* MI114 etc. puede utilizarse como bacteria *Bacillus*. Por ejemplo, como levaduras pueden utilizarse *Saccharomyces cerevisiae* AH22, AH22R - NA87-11A, DKD-5D o 20B-12, *Saccharomyces pombe* NCYC1913, o NCYC2036, y *Pichia pastoris* KM71 etc. Cuando el virus es el AcNPV, se pueden utilizar como células de insecto por ejemplo, células de *Spodoptera frugiperda* (células SF), células MG1 derivadas del estómago medio de *Trichoplusia ni*, células High FiveTM derivadas del huevo de *Trichoplusia ni*, células derivadas de *Mamestra brassicae*, células derivadas de *Estigmene acrea* etc. Cuando el virus es el BmNPV, se pueden utilizar líneas celulares derivadas del gusano de seda (células N de *Bombyx mori*; células BmN) etc. Por ejemplo, como células Sf se pueden utilizar células Sf9 (ATCC CRL1711) (Vaughn, J. L., *In Vivo*, 13; 213-217 (1977)) y células Sf21 etc. Como insectos se pueden utilizar por ejemplo, larvas de gusano de seda. Por ejemplo, como células animales puede utilizarse COS-1, COS-7, Vero, células de hámster chino CHO (en lo sucesivo, abreviado como células CHO), células de hámster chino CHO deficientes en dhfr (en lo sucesivo, abreviado como células CHO(dhfr-)), células de ratón L, AtT-20 de ratón, células de mieloma de ratón, GH3 de rata, linfocitos T HEK293 y células FL humanas etc. Por ejemplo, la transformación en *Escherichia* se puede realizar de acuerdo con *Proc. Natl Acad Sci. USA*, 69, 2110 (1972). Por

ejemplo, la transformación en *Bacillus* se puede realizar de acuerdo con *Molecular and General Genetic*, 168, 111 (1979). Por ejemplo, la transformación en levaduras se puede realizar de acuerdo con Becker, DM., et al., *Methods in Enzymology*, volumen 194, p.182-187 (1991) o *Proc. Natl Acad Sci USA*, 75, 1929 (1978). La transformación en células de insectos o insectos se puede realizar de acuerdo con *Bio/Technology*, 6; 47-55 (1978). La transformación en células animales puede realizarse de acuerdo con *CELL TECHNOLOGY SUPPLEMENT 8 NEW CELL TECHNOLOGY EXPERIMENTAL PROTOCOL*, Shujunsha, 263 (1995), o *Virology*, 52, 456 (1973).

(3) Los péptidos obtenidos se purifican mediante los métodos habituales, como extracción en sal, cromatografía de intercambio iónico, filtración en gel, cromatografía hidrófoba y cromatografía de afinidad. etc.

10 En general, un polipéptido sustancialmente puro que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 4 o la SEQ ID NO: 11 es un polipéptido que contiene la secuencia de aminoácidos que es 90 % o más, 95, 98, o 99 % o más homóloga con el polipéptido a producir.

15 Un homólogo del polipéptido sustancialmente puro que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 4 o la SEQ ID NO: 11 es un polipéptido que contiene la secuencia de aminoácidos que es al menos el 70 % o más, preferiblemente al menos 80, 90 o 95 % o más homóloga con el polipéptido en una región de al menos 20 aminoácidos contiguos, preferiblemente al menos 30, 40, 60 o 100 aminoácidos.

20 Un fragmento del polipéptido sustancialmente puro que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 4 o la SEQ ID NO: 11 es un polipéptido que contiene al menos 10 aminoácidos, preferiblemente al menos 15, 20, 25, 30, 40, 50 o 60 aminoácidos, y un homólogo del mismo es un polipéptido que contiene la secuencia de aminoácidos que es al menos el 70 %, preferiblemente al menos 80, 90 o 95 % o más homóloga con el polipéptido en una región de al menos 10 aminoácidos contiguos, preferiblemente al menos 15, 20, 25, 30, 40, 50 o 60 aminoácidos contiguos.

25 Un polipéptido sustancialmente puro que comprende una secuencia de aminoácidos en la que se han eliminado uno o varios aminoácidos de un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 4 o la SEQ ID NO: 11 es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos en la que se ha eliminado uno o dos aminoácidos o más (preferiblemente de 1 a aproximadamente 25, más preferiblemente de 1 a aproximadamente 10, además, preferiblemente de 1 a 5) de la secuencia de aminoácidos.

30 Un polipéptido sustancialmente puro que comprende una secuencia de aminoácidos en la que se ha sustituido uno o varios aminoácidos de un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 4 o la SEQ ID NO: 11 es un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos en la que se ha sustituido uno o dos aminoácidos o más (preferiblemente de 1 a aproximadamente 25, más preferiblemente de 1 a aproximadamente 10, además, preferiblemente de 1 a 5).

35 Un homólogo de un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos de ADN representada por la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 3 o la SEQ ID NO: 9 es un polinucleótido que es al menos 70 %, preferiblemente al menos 80, 90 o más preferiblemente 95 % o más homólogo con el polinucleótido en una región de al menos 20, preferiblemente al menos 30, 40, 60 o 100 nucleótidos contiguos.

40 Un fragmento del polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos de ADN representada por la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 3 o la SEQ ID NO: 9 es un polinucleótido que contiene un polinucleótido que comprende al menos 20, preferiblemente al menos 30, 40, 50, 60, o 100 nucleótidos contiguos.

45 Un ADN que hibrida con el ADN que contiene la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 3 o la SEQ ID NO: 9 en condiciones rigurosas incluye, por ejemplo, aproximadamente un ADN que contiene una secuencia de nucleótidos que es aproximadamente 70 % o más, preferiblemente aproximadamente 80 % o más, más preferiblemente aproximadamente 90 % o más, lo más preferiblemente aproximadamente 95 % o más homóloga con la secuencia de nucleótidos representada respectivamente por la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 3 o la SEQ ID NO: 9.

50 La hibridación se puede realizar de acuerdo con un método bien conocido o, por ejemplo, un método descrito en J. Sambrook, *Molecular Cloning*, 2nd Edition, ColdSpring Harbor Laboratory. Cuando se utiliza una biblioteca comercial, es posible realizarla de acuerdo con el método adjunto que se describe en las instrucciones de uso. Más preferiblemente, es posible realizarla en condiciones rigurosas. Las condiciones rigurosas son aproximadamente 19-40 mM, preferiblemente aproximadamente 19-20 mM de concentración de NaCl, a aproximadamente 50-70 °C, preferiblemente aproximadamente 60-65 °C. Especialmente, las condiciones más preferibles son aproximadamente 19 mM de concentración de sodio a aproximadamente 65 °C.

Aplicabilidad industrial

Aplicación a la medicina:

65

El anticuerpo biespecífico de la presente divulgación se puede usar para terapia y/o prevención para las siguientes enfermedades.

5 El anticuerpo biespecífico de la presente divulgación es útil para la terapia y/o prevención de enfermedades neurodegenerativas (geriopsicosis, enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down, enfermedad de Parkinson, neuropatía diabética, síndrome de Parkinson, enfermedad de Huntington, enfermedad de Machado-Joseph), esclerosis lateral amiotrófica, neuropatía diabética y enfermedad de Creutzfeldt-Jakob).

10 El anticuerpo biespecífico de la presente divulgación es útil para la terapia y/o prevención de enfermedades que aceleran la reacción inmunitaria, por ejemplo, enfermedades autoinmunitarias (nefritis glomerular, artritis, enfermedad tipo cardiomiopatía dilatada, colitis ulcerosa, síndrome de Sjögren, enfermedad de Crohn), lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide crónica, esclerosis múltiple, psoriasis, dermatitis alérgica de contacto, polimiosis, paquidermia, periarteritis nodosa, fiebre reumática, vitiligo vulgaris, diabetes mellitus dependiente de insulina, enfermedad de Behcet, enfermedad de Hashimoto, enfermedad de Addison, dermatomiositis, miastenia gravis, síndrome de Reiter, enfermedad de Graves, anemia pernicioso, síndrome de Goodpasture, esterilidad patológica, hepatitis crónica activa, pénfigo, púrpura trombocitopénica autoinmunitaria y anemia hemolítica autoinmunitaria).

20 El anticuerpo biespecífico de la presente divulgación es útil para la terapia y/o prevención de la colagenosis (lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, esclerodermia sistémica, esclerodermia difusa, dermatomiositis, polimiositis, polimiosis, síndrome de Sjögren, enfermedad mixta del tejido conjuntivo, poliarteritis nodosa, y fiebre reumática etc.).

25 El anticuerpo biespecífico de la presente divulgación es útil para la terapia y/o prevención del rechazo de injertos de órganos, enfermedades alérgicas y enfermedades causadas por la atenuación de la reacción inmunitaria, en la que participa la PD-1, por ejemplo, enfermedades tumorales e infecciosas.

30 Cuando se usa el anticuerpo biespecífico de la presente divulgación para el propósito anterior, generalmente se administra sistémicamente o localmente, y por vía oral o parenteral.

35 La dosis es diferente dependiendo de la edad, el peso corporal, los síntomas, el efecto terapéutico, la vía de administración y la duración del tratamiento. etc. Para la administración oral, generalmente, la dosificación varía de 0,1 mg a 100 mg por adulto y se administra por vía oral una vez a varias veces por día, o la dosificación varía de 0,01 mg a 30 mg por adulto y se administra una vez a varias veces por día por vía parenteral, adecuadamente por vía intravenosa, y se administra por vía intravenosa durante 1 a 24 horas por día de forma continua.

Debido a que la dosis cambia de acuerdo con las diversas condiciones descritas anteriormente, hay casos en los que se pueden usar dosis menores o mayores que la dosis anterior.

40 Cuando se administra una composición de la presente divulgación se utiliza como medicamentos sólidos internos y medicamentos líquidos internos para su uso interno e inyecciones, preparaciones externas, supositorios. etc. para la administración parenteral.

45 Los medicamentos sólidos internos para administración oral incluyen comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos dispersantes, gránulos etc. Las cápsulas incluyen cápsulas duras y cápsulas blandas.

50 En el caso de tales medicamentos sólidos, se puede fabricar farmacéuticamente uno o más compuestos activos tal cual o una formulación con excipientes (lactosa, manitol, glucosa, celulosa microcristalina y almidón etc.), aglutinantes (hidroxipropilcelulosa, polivinilpirrolidona y aluminato metasilicato de magnesio etc.), disgregantes (celulosa glicolato cálcico etc.), lubricantes (estearato de magnesio etc.), estabilizadores o solubilizantes (glutamato y ácido aspártico etc.) etc. de acuerdo con los métodos habituales. Además, pueden recubrirse opcionalmente con recubrimientos (sacarosa, gelatina, hidroxipropilcelulosa y ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa). etc.) o recubrirse con dos capas o más. Además, pueden incluirse cápsulas de materiales absorbibles tales como gelatina.

55 Las composiciones líquidas para administración oral incluyen agua, suspensiones, emulsiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. etc. En cuanto a dichos medicamentos líquidos, uno o más compuestos activos pueden disolverse, suspenderse o emulsionarse para obtener un diluyente de uso general (agua purificada, etanol o los líquidos de mezcla). etc. Además, esos medicamentos líquidos pueden contener humectantes, agentes suspensores, agentes emulsionantes, edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes saborizantes, conservantes y tampones. etc.

60 Las inyecciones para administración parenteral incluyen inyecciones sólidas que se disuelven o suspenden en solución, suspensión, emulsión o en el tiempo de uso del disolvente. Las inyecciones se utilizan mediante la disolución, levigación y fusión de uno o más activadores para el disolvente. Como disolvente, se usan, por ejemplo, agua para inyectables, solución salina destilada, aceite vegetal, propilenglicol, polietilenglicol, alcoholes tales como etanol. etc. y se utilizan estas combinaciones. Además, esta inyección puede incluir estabilizadores, solubilizantes

(glutamato, ácido aspártico y polisorbato 80 (marca registrada) etc.), agentes de suspensión, agentes emulsionantes, agentes calmantes, tampones y conservantes etc. Estos se esterilizan en el proceso final o se fabrican a partir de la manipulación aséptica. Los medicamentos sólidos asépticos se pueden fabricar como un producto de secado por congelación y se pueden usar haciéndolos asépticos o disolviéndolos en agua destilada aséptica para inyectables u otros solventes antes de su uso.

Otras composiciones que contienen uno o más activador(es) para administración parenteral incluyen líquido para uso externo, medicamento en pomada, medicamento de recubrimiento, inhalador, aerosol, supositorio y pesario para administración intrarrectal que se prescribe de acuerdo con un procedimiento de rutina.

Los aerosoles pueden contener un estabilizador como el hidrógeno sulfito de sodio además del diluyente generalmente utilizado, un tampón que proporciona isotonicidad y un medicamento isotónico como, por ejemplo, cloruro de sodio, citrato de sodio o citratos. Los métodos de producción de los aerosoles se han descrito en detalle, por ejemplo, en la patente US-2.868.691 y en la patente US-3.095.355.

Dado que la PD-1 se refiere a una reacción inmunitaria, la PD-1 también se puede usar para la detección etc., de la sustancia relacionada con la reacción inmunitaria midiendo la expresión de la PD-1 humana utilizando el anticuerpo biespecífico de la presente divulgación.

El anticuerpo biespecífico de la presente divulgación puede comprender una parte que reconoce la PD-1 humana, una parte que reconoce la proteína de membrana de la membrana celular de las células que expresan la PD-1 humana y un enlazador, y es una sustancia excelente que reconoce específicamente la PD-1 humana y la proteína de membrana, y puede transmitir la señal de la PD-1 humana.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra la construcción de un vector de expresión de anticuerpo biespecífico.

La Figura 2 muestra la reactividad de cada anticuerpo biespecífico contra el antígeno de superficie de células X63 expresado en células CD3(-)/PD-1(+) y el antígeno de superficie de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) como CD3(+)/PD-1(-). En esta figura, las áreas rellenas del histograma representan la IgG de control y las áreas no rellenas representan la distribución de células positivas para PD-1 o CD3.

La Figura 3 muestra el efecto sobre la respuesta proliferativa de linfocitos T de sangre periférica humanos activados del anticuerpo biespecífico. En esta figura, “-” representa el grupo de adición de IgG de control y “BsAb” representa el grupo de adición de anticuerpo biespecífico, el eje representa la absorbancia de la medición y ** representa $P < 0,05$ en la prueba de significación.

Mejor modo de llevar a cabo la invención.

Los siguientes ejemplos explican la presente invención más concretamente, pero no limitan el alcance de la presente invención.

Ejemplo 1:

Para obtener el ADN que codifica el anticuerpo anti-PD-1 humana y el anticuerpo anti-CD3 humana respectivamente, se aisló cada ARN total del hibridoma J110 (número de identificación internacional: FERM BP-8392) y del hibridoma del anticuerpo anti-CD3 (obtenido de ATCC: Número ATCC: CRL-8001). La operación se realizó utilizando el Sistema de aislamiento total SV (nombre comercial: adquirido en Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

La biblioteca de ADNc del hibridoma J110 y la biblioteca de ADNc del hibridoma del anticuerpo anti-CD3 se generaron a partir del ARN total (ARN total) mediante el método de cegado de oligo dT usando Ready-To-Go You-Prime First-Strand Beads (nombre comercial: adquirido en Amersham Pharmacia). La operación y el procedimiento se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Se amplificó el ADNc de la región variable de la cadena pesada de IgG y de la cadena ligera de IgG del anticuerpo anti-PD-1 humana y el anticuerpo anti-CD3 humana por reacción de PCR usando Heavy Primers y Light Primers (nombre comercial: adquirido en Amersham Pharmacia), respectivamente. La PCR se llevó a cabo siguiendo las siguientes etapas; como primera etapa a 95 °C durante 2 minutos y como etapas de ciclo a 95 °C durante 30 segundos, a 50 °C durante 30 segundos, y a 72 °C durante 40 segundos, se repitió 30 veces y se dejó a 72 °C durante 5 minutos como última etapa

El producto de la PCR se separó mediante electroforesis en gel de agarosa. El tamaño esperado del fragmento de ADN se recogió y se clonó en el pGEM-T Easy Vector (nombre comercial: adquirido en Promega). A continuación, DH5 α de *E. coli* se transformó con el plásmido. El ADN de la cadena pesada de IgG (SEQ ID NO: 1 o 5) y la cadena ligera de IgG (SEQ ID NO: 3 o 7) se secuenciaron para determinar la secuencia de consenso.

Ejemplo 2:

Los ADN que codifican los anticuerpos biespecíficos se prepararon conectándolos respectivamente a los ADNc separados en el ejemplo 1. El fragmento 1 se preparó conectando el ADNc de la cadena pesada de la IgG (SEQ ID NO: 1) del anticuerpo anti-PD-1 humana y el ADNc de la cadena ligera de la IgG (SEQ ID NO: 7) del anticuerpo anti-CD3 humana por PCR usando el enlazador N.º 1 (SEQ ID NO: 19), el enlazador N.º 2 (SEQ ID NO: 20), el cebador N.º 1 (SEQ ID NO: 14), y cebador N.º 2 (SEQ ID NO: 15) (Figura 1). El fragmento 2 se preparó conectando el ADNc de la cadena pesada de la IgG (SEQ ID NO: 7) del anticuerpo anti-CD3 humana y el ADNc de la cadena ligera de la IgG (SEQ ID NO: 1) del anticuerpo anti-PD-1 humana mediante PCR utilizando el enlazador N.º 3 (SEQ ID NO: 21), el enlazador N.º 4 (SEQ ID NO: 22), el cebador N.º 3 (SEQ ID NO: 16) y el cebador N.º 4 (SEQ ID NO: 17) (figura 1). El fragmento 3 se preparó (Figura 1) conectando el fragmento 1 y el fragmento 2 mediante PCR utilizando el enlazador N.º 5 (SEQ ID NO: 23), el enlazador N.º 6 (SEQ ID NO: 24), el cebador N.º 5 (SEQ ID NO: 18), y el cebador N.º 4 (SEQ ID NO: 22) y a continuación se decidió la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 9).

Cada reacción de PCR se realizó respectivamente. La primera PCR se realizó repitiendo 20 veces las siguientes etapas; a 94 °C durante 30 segundos, a 40 °C durante 30 segundos y a 72 °C durante 50 segundos. La 2ª PCR se realizó repitiendo 30 veces las siguientes etapas; a 94 °C durante 30 segundos, a 50 °C durante 30 segundos y a 72 °C durante 50 segundos, utilizando la primera solución de PCR como molde.

Cebador N.º 2: 5'-TTTTTTAAGCTTACAGGTCCAGCTGCAGGAGTCA-3' (SEQ ID NO:14)
 Cebador N.º 2: 5'-TTTTTTGCGGCCCGCCGGTTTATTTCCAACCTTTG-3' (SEQ ID NO:15)
 Cebador N.º 3: 5'-TTTTTTAAGCTTACAGGTCCAGCTGCAGCAGTCT-3' (SEQ ID NO:16)
 Cebador N.º 4: 5'-TTTTTTGCGGCCCGCCGGTTGATTTCCAGCTTGG-3' (SEQ ID NO:17)
 Cebador N.º 5: 5'-ATGAACTGGTACCAGCAGAAG-3'(SEQ ID NO:18)
 Enlazador N.º 1:

5'-AGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGAGGCGGTTACAAATTGTT
 CTCACCCAGTCTCCAG-3' (SEQ ID NO:19)

Enlazador N.º 2:
 5'-CTGGGAGACTGGGTGAGAACAATTTGTGAACCGCCTCCACCTGAGGAGAC
 GGTGACCGTGGTCCCT-3' (SEQ ID NO:20)

Enlazador N.º 3:
 5'-AGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAGGTGGAGGCGGTTCCAGACATCCAG
 ATGACCCAGTCTCCAG-3' (SEQ ID NO:21)

Enlazador N.º 4:
 5'-CTGGGAGACTGGGTCATCTGGATGTCTGAACCGCCTCCACCTGAGGAGAC
 TGTGAGAGTGGTGCCT-3' (SEQ ID NO:22)

Enlazador N.º 5:
 5'-GGGGACAAAGTTGGAATAAACCGGGGTGGAGGCGGTTCCAGGCGGAGGT
 GGCTCTGGCGGTGGCGGATCGCAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGGG-3' (SEQ ID
 NO:23)

Enlazador N.º 6:
 5'-CCCCAGACTGCTGCAGCTGGACCTGCGATCCGCCACCGCCAGAGCCACC
 TCCGCCTGAACCGCCTCCACCCCGGTTTATTTCCAACCTTTGTCCCC-3' (SEQ ID
 NO:24)

El ADN que codifica el anticuerpo biespecífico preparado por el método anterior se clonó en el vector de expresión pSecTag2/HygroA (nombre comercial: adquirido en Invitrogen). Primero, cada uno de los fragmentos 1 y 3 fue digerido por la enzima de restricción *HindIII KpnI* y *NotI* y después se purificó por electroforesis en agarosa. A continuación, los fragmentos de ADN se ligaron en un vector pSecTag2/HygroA digerido con *HindIII* y *NotI*. DH5 α de *E. coli* se transformó con el plásmido J110-CD3scDb-pSec/hygroA que codifica el anticuerpo biespecífico, que se amplificó, se extrajo y se purificó (Figura 1).

Ejemplo 3:

La proteína del anticuerpo biespecífico se preparó mediante el plásmido de expresión J110-CD3scDb-pSec/hygroA. La construcción se transfectó de forma transitoria en la línea celular de riñón humano 293T (Número ATCC: CRL-11268) con LipofectAMINE-plus (nombre comercial: adquirido en Invitrogen) y se cultivó durante cuatro días. El sobrenadante se esterilizó con un filtro de PVDF de 0,22 μ m y se concentró utilizando una solución de PEG20000 al 40 %. El sobrenadante concentrado se purificó mediante una columna HiTrap Chelating HP (nombre comercial: adquirido en Amersham Pharmacia).

Ejemplo 4:

La reactividad del anticuerpo biespecífico (PD-1 y CD3) que se une a los antígenos de la superficie celular se analizó mediante FACScan.

Se añadieron 1 o 10 μ g de los anticuerpos biespecíficos respectivamente a las líneas celulares X63 expresadas en PD-1 humana como células PD-1 positivo/CD3 negativo (células CD3(-)/PD-1(+)) y a células mononucleares de sangre periférica humana como células PD-1 negativo/CD3 positivo (células (CD3+)/PD-1(-)), y se incubaron en hielo. Inmediatamente se agregaron segundos anticuerpos y se incubaron en hielo durante 30 min. Se confirmó que los anticuerpos biespecíficos reaccionaron a PD-1 y CD3.

Ejemplo 5:

La actividad del anticuerpo biespecífico se evaluó como un efecto sobre la proliferación de los linfocitos T de sangre periférica humana activados.

Concretamente, se aislaron CMSP a partir de muestras de sangre periférica de donantes sanos mediante Lymphoprep Tube (nombre comercial: adquirido en HYCOMED PHARMA). La operación y el procedimiento se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los eritrocitos se eliminaron de las CMSP mediante lisis con tampón de lisis (NH₄Cl 0,8 %, KCO₃ 0,1 %, EDTA 1 mM). Y los linfocitos T purificados pasados a través de una Nylon Fiber ColumnT (nombre comercial: adquirido en Roche) se resuspendieron en un medio (medio RPMI1640 que incluye 10 % de suero bovino fetal).

Los linfocitos T purificados (2 x 10⁶/ml/pocillo) se cultivaron durante 60 horas con 1 μ g/ml de anticuerpo anti-CD28 humano (el nombre del clon: CD28.2 y fue adquirido en Pharmingen) en una placa de 24 pocillos que se recubrió previamente con 5 μ g/ml de anticuerpo anti- α TCR humano (el nombre del clon: T10B9.1A-31, adquirido en Pharmingen). Los linfocitos T activados se dejaron en reposo durante 12 horas, y los linfocitos T en reposo (1 x 10⁶/100 μ l/pocillo) se reestimularon agregando 1 μ g/pocillo de anticuerpo biespecífico en una placa de 96 pocillos que se recubrió previamente con 0,1 μ g/ml de anticuerpo anti- α TCR. Cuarenta y ocho horas más tarde, se determinó la proliferación de linfocitos T mediante la incorporación de BrdU utilizando ELISA de proliferación celular (nombre comercial: adquirido en Roche). La figura 3 muestra el resultado.

Los anticuerpos biespecíficos han disminuido significativamente la proliferación de linfocitos T de sangre periférica humana activados.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ONO PHARMACEUTICAL CO., LTD.
HONJO, Tasuku

<120> Sustancias que reconocen específicamente la PD-1 humana

<130> ONF-4846PCT

<150> JP 2003-14793

<151> 23-01-2003

<160> 26

ES 2 729 974 T3

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 357

<212> ADN

5 <213> *Mus musculus*

<400> 1

caggtccagc	tgcaggagtc	aggacctggc	ctggtgaaac	cttctcagtc	tctgtccctc	60
acctgcactg	tcactggcca	ctcaatcacc	agtgattatg	cctggaactg	gatccggcag	120
tttccaggag	acaaactgga	gtggatgggc	tacataagct	acagtgggta	cactacctac	180
aacctatctc	tgaaaagtcg	agtctctatc	actcgagaca	catccaagaa	ccagttcttc	240
ctgcagttga	attctgtgac	tactgaggac	acagccacat	acttctgtgc	aagagacctt	300
gattacggcc	cctgggttgc	ttactggggc	caagggacca	cggtcacctg	ctcctca	357

10

<210> 2

<211> 119

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

15

<400> 2

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

20

<210> 3

<211> 324

<212> ADN

<213> *Mus musculus*

25

<400> 3

gacatccaga	tgaccagtc	tccagcctcc	ctatctgcat	ctgtgggaga	aactgtcacc	60
ctcacatgtc	gagcaagtga	gaatattcac	aattatttag	catgggatca	gcagaaacag	120
ggaaaatctc	ctcagctcct	ggtctataat	gtaaaaacct	tagcagatgg	tgtgccatca	180
aggttcagtg	gcagtggatc	aggaacacaa	tattctctca	agatcaacag	cctgcagcct	240
gaagattttg	ggagttatta	ctgtcaacat	ttttggagta	gtccgtggac	gttcggtgga	300
ggaccaaacg	tggaatcaa	acgg				324

30

<210> 4

<211> 108

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

35

<400> 4

ES 2 729 974 T3

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

5 <210> 5
 <211> 357
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

10 <400> 5
 cagggtccagc tgcagcagtc tggggctgaa ctggcaagac ctggggcctc agtgaagatg 60
 tcctgcaagg cttctggcta cacctttact aggtacacga tgcactgggt aaaacagagg 120
 cctggacagg gtctggaatg gattggatac attaatccta gccgtgggta tactaattac 180
 aatcagaagt tcaaggacaa ggccacattg actacagaca aatcctccag cacagcctac 240
 atgcaactga gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aagatattat 300
 gatgatcatt actgccttga ctactggggc caaggcacca ctctcacagt ctctca 357

15 <210> 6
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 6
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr
 20 25 30
 Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr 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 Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115

20 <210> 7
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

25 <400> 7

ES 2 729 974 T3

```

caaattgttc tcacccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc      60
atgacctgca gtgccagctc aagtgtaagt tacatgaact ggtaccagca gaagtcaggc      120
acctccccc  aaagatggat ttatgacaca tccaaactgg cttctggagt ccctgctcac      180
ttcaggggca gtgggtctgg gacctcttac tctctcaca  tcagcggcat ggaggctgaa      240
gatgctgcca cttattactg ccagcagtgg agtagtaacc cattcacgtt cggctcgggg      300
acaaagttgg aaataaacg g                                     321

```

5 <210> 8
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 8

```

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

```

10 <210> 9
 <211> 1982
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <223> Secuencia de polinucleótido que codifica un anticuerpo biespecífico
 <400> 9

ES 2 729 974 T3

```

aatgggagtt  tgttttggca  caaaaatcaa  cgggactttc  caaaatgtcg  taacaactcc      60
gccccattga  cgaaaatggg  cggtaggcgt  gtacggtggg  aggtctatat  aagcagagct     120
ctctggctaa  ctagagaacc  cactgcttac  tggcttatcg  aaattaatac  gactcactat     180
agggagaccc  aagctggcta  gccaccatgg  agacagacac  actcctgcta  tgggtactgc     240
tgctctgggt  tccaggttcc  actggtgacg  cggcccagcc  ggccaggcgc  gccgtacgaa     300
gcttacaggt  ccagctgcag  gagtcaggac  ctggcctggt  gaaaccttct  cagtctctgt     360
ccctcacctg  cactgtcact  ggccactcaa  tcaccagtga  ttatgcctgg  aactggatcc     420
ggcagtttcc  aggagacaaa  ctggagtgga  tgggctacat  aagctacagt  ggttacacta     480
cctacaaccc  atctctgaaa  agtcgagtct  ctatcactcg  agacacatcc  aagaaccagt     540
tcttcctgca  gttgaattct  gtgactactg  aggacacagc  cacatacttc  tgtgcaagag     600
accttgatta  cggccccctg  tttgcttact  ggggccaaag  gaccacggtc  accgtctcct     660
caggtggagg  cggttcacia  attgttctca  ccagctcctc  agcaatcatg  tctgcatctc     720
caggggagaa  ggtcaccatg  acctgcagtg  ccagctcaag  tgtaagttac  atgaactggt     780
accagcagaa  gtcaggcacc  tccccaaaaa  gatggattta  tgacacatcc  aaactggctt     840
ctggagtccc  tgctcacttc  aggggcagtg  ggtctgggac  ctcttactct  ctacaaatca     900
gcgcatgga  ggctgaagat  gctgccactt  attactgcca  gcagtggagt  agtaaccat     960
tcacgttcgg  ctcggggaca  aagttggaaa  taaaccgggg  tggaggcggg  tcaggcggag    1020
gtggtcttg  cggtggcgga  tcgcaggctc  agctgcagca  gtctggggct  gaactggcaa    1080
gacctggggc  ctcagtgaag  atgtcctgca  agcttctgg  ctacaccttt  actaggtaca    1140
cgatgcactg  ggtaaaacag  aggcctggac  agggcttgg  atggattgga  tacattaatc    1200
ctagccgtgg  ttataactaa  tacaatcaga  agttcaagga  caaggccaca  ttgactacag    1260
acaaatcctc  cagcacagcc  tacatgcaac  tgagcagcct  gacatctgag  gactctgcag    1320
tctattactg  tgcaagatat  tatgatgatc  attactgcct  tgactactgg  ggccaaggca    1380
ccactctcac  agtctcctca  ggtggaggcg  gttcagacat  ccagatgacc  cagtctccag    1440
cctccctatc  tgcattctgt  ggagaaactg  tcaccctcac  atgtcgagca  agtgagaata    1500
ttcacaatta  tttagcatgg  tatcagcaga  aacagggaaa  atctcctcag  ctctggtct     1560
ataatgtaaa  aaccttagca  gatggtgtgc  catcaagggt  cagtggcagt  ggatcaggaa    1620
cacaatattc  tctcaagatc  aacagcctgc  agcctgaaga  ttttgggagt  tattactgtc    1680
aacatttttg  gagtagtccg  tggacgttcg  gtggaggcac  caagctggaa  atcaaacggg    1740
cggccgctcg  aggagggccc  gaacaaaaac  tcatctcaga  agaggatctg  aatagcggcc    1800
tcgaccatca  tcatcatcat  cattgagttt  aaaccgctg  atcagcctcg  actgtgcctt    1860
ctagttgcca  gccatctggt  gtttgccctt  cccccgtgcc  ttcttgacc  ctggaagggt    1920
ccactccac  tgtcctttcc  taataaaatg  aggaaattgc  atcgattgt  ctgagtaggt    1980
gt

```

<210> 10
 <211> 1982
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> CDS
 10 <222> (207)..(1823)
 <223> Polinucleótido y secuencia de polipéptido que codifica un anticuerpo biespecífico

<400> 10

ES 2 729 974 T3

aatgggagtt	tgTTTTggca	ccaaaatcaa	cgggactttc	caaaatgtcg	taacaactcc		60
gccccattga	cgaaatggg	cggtagcgt	gtacgggtggg	aggtctatat	aagcagagct		120
ctctggctaa	ctagagaacc	cactgcttac	tggttatcgc	aaattaatac	gactcactat		180
agggagaccc	aagctggcta	gccacc atg	gag aca gac	aca ctc ctg	cta tgg		233
		Met	Glu Thr Asp	Thr Leu Leu	Leu Trp		
		1		5			
gta ctg ctg ctc tgg gtt cca ggt tcc act ggt gac gcg gcc cag ccg							281
Val Leu Leu Leu Trp Val Pro Gly Ser Thr Thr Gly Asp Ala Ala Gln Pro							
10 15 20 25							
gcc agg cgc gcc gta cga agc tta cag gtc cag ctg cag gag tca gga							329
Ala Arg Arg Ala Val Arg Ser Leu Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly							
30 35 40							
cct ggc ctg gtg aaa cct tct cag tct ctg tcc ctc acc tgc act gtc							377
Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val							
45 50 55							
act ggc cac tca atc acc agt gat tat gcc tgg aac tgg atc cgg cag							425
Thr Gly His Ser Ile Thr Ser Asp Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln							
60 65 70							
ttt cca gga gac aaa ctg gag tgg atg ggc tac ata agc tac agt ggt							473
Phe Pro Gly Asp Lys Leu Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly							
75 80 85							
tac act acc tac aac cca tct ctg aaa agt cga gtc tct atc act cga							521
Tyr Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Ser Ile Thr Arg							
90 95 100 105							
gac aca tcc aag aac cag ttc ttc ctg cag ttg aat tct gtg act act							569
Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr							
110 115 120							
gag gac aca gcc aca tac ttc tgt gca aga gac ctt gat tac ggc ccc							617
Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Leu Asp Tyr Gly Pro							
125 130 135							
tgg ttt gct tac tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca ggt							665
Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly							
140 145 150 155							
gga ggc ggt tca caa att gtt ctc acc cag tct cca gca atc atg tct							713
Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser							
160 165 170							
gca tct cca ggg gag aag gtc acc atg acc tgc agt gcc agc tca agt							761
Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser							
175 180 185							
gta agt tac atg aac tgg tac cag cag aag tca ggc acc tcc ccc aaa							809
Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys							
190 195 200							
aga tgg att tat gac aca tcc aaa ctg gct tct gga gtc cct gct cac							857
Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His							
205 210 215							
ttc agg ggc agt ggg tct ggg acc tct tac tct ctc aca atc agc ggc							905
Phe Arg Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly							
220 225 230							
atg gag gct gaa gat gct gcc act tat tac tgc cag cag tgg agt agt							953
Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser							
235 240 245							
aac cca ttc acg ttc ggc tcg ggg aca aag ttg gaa ata aac cgg ggt							1001
Asn Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Arg Gly							
250 255 260 265							
gga ggc ggt tca ggc gga ggt ggc tct ggc ggt ggc gga tcg cag gtc							1049
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val							
270 275 280							
cag ctg cag cag tct ggg gct gaa ctg gca aga cct ggg gcc tca gtg							1097
Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val							
285 290 295							
aag atg tcc tgc aag gct tct ggc tac acc ttt act agg tac acg atg							1145
Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met							
300 305 310							
cac tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt ctg gaa tgg att gga tac							1193
His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr							
315 320 325							
att aat cct agc cgt ggt tat act aat tac aat cag aag ttc aag gac							1241

ES 2 729 974 T3

Ile 330	Asn	Pro	Ser	Arg	Gly 335	Tyr	Thr	Asn	Tyr	Asn 340	Gln	Lys	Phe	Lys	Asp 345	
aag	gcc	aca	ttg	act	aca	gac	aaa	tcc	tcc	agc	aca	gcc	tac	atg	caa	1289
Lys	Ala	Thr	Leu	Thr 350	Thr	Asp	Lys	Ser	Ser 355	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met 360	Gln	
ctg	agc	agc	ctg	aca	tct	gag	gac	tct	gca	gtc	tat	tac	tgt	gca	aga	1337
Leu	Ser	Ser	Leu 365	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser 370	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys 375	Ala	Arg	
tat	tat	gat	gat	cat	tac	tgc	ctt	gac	tac	tgg	ggc	caa	ggc	acc	act	1385
Tyr	Tyr	Asp 380	Asp	His	Tyr	Cys	Leu 385	Asp	Tyr	Trp	Gly 390	Gln	Gly	Thr	Thr	
ctc	aca	gtc	tcc	tca	ggg	gga	ggc	ggg	tca	gac	atc	cag	atg	acc	cag	1433
Leu	Thr 395	Val	Ser	Ser	Gly 400	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile 405	Gln	Met	Thr	Gln	
tct	cca	gcc	tcc	cta	tct	gca	tct	gtg	gga	gaa	act	gtc	acc	ctc	aca	1481
Ser	Pro	Ala	Ser	Leu 415	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Glu 420	Thr	Val	Thr	Leu 425	Thr	
tgt	cga	gca	agt	gag	aat	att	cac	aat	tat	tta	gca	tgg	tat	cag	cag	1529
Cys	Arg	Ala	Ser 430	Glu	Asn	Ile	His	Asn 435	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln 440	Gln	
aaa	cag	gga	aaa	tct	cct	cag	ctc	ctg	gtc	tat	aat	gta	aaa	acc	tta	1577
Lys	Gln	Gly 445	Lys	Ser	Pro	Gln	Leu 450	Leu	Val	Tyr	Asn	Val 455	Lys	Thr	Leu	
gca	gat	ggg	gtg	cca	tca	agg	ttc	agt	ggc	agt	gga	tca	gga	aca	caa	1625
Ala	Asp	Gly 460	Val	Pro	Ser	Arg	Phe 465	Ser	Gly	Ser	Gly 470	Ser	Gly	Thr	Gln	
tat	tct	ctc	aag	atc	aac	agc	ctg	cag	cct	gaa	gat	ttt	ggg	agt	tat	1673
Tyr	Ser 475	Leu	Lys	Ile	Asn 480	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp 485	Phe	Gly	Ser	Tyr	
tac	tgt	caa	cat	ttt	tgg	agt	agc	ccg	tgg	acg	ttc	ggg	gga	ggc	acc	1721
Tyr	Cys	Gln	His	Phe 495	Trp	Ser	Ser	Pro	Trp	Thr 500	Phe	Gly	Gly	Gly 505	Thr	
aag	ctg	gaa	atc	aaa	cgg	gcg	gcc	gct	cga	gga	ggg	ccc	gaa	caa	aaa	1769
Lys	Leu	Glu	Ile 510	Lys	Arg	Ala	Ala	Ala	Arg 515	Gly	Gly	Pro	Glu 520	Gln	Lys	
ctc	atc	tca	gaa	gag	gat	ctg	aat	agc	gcc	gtc	gac	cat	cat	cat	cat	1817
Leu	Ile	Ser	Glu 525	Glu	Asp	Leu	Asn 530	Ser	Ala	Val	Asp	His 535	His	His	His	
cat	cat	tgagtttaaa	cccgctgac	agcctcgact	gtgccttcta	gttgccagcc										1873
His	His															
atctgttggt	tgcccctccc	ccgtgccttc	cttgaccctg	gaaggtgcca	ctcccactgt											1933
cctttcctaa	taaaatgagg	aaattgcatc	gcattgtctg	agtaggtgt												1982

<210> 11

<211> 539

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<223> Secuencia de polipéptido que codifica un anticuerpo biespecifico

<400> 11

5

ES 2 729 974 T3

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

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val
 145 150 155 160
 Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val
 165 170 175
 Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr
 180 185
 Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser
 195 200
 Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His Phe Arg Gly Ser Gly Ser Gly
 210 215 220
 Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala
 225 230 235 240
 Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Ser
 245 250 255
 Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Arg Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 260 265 270
 Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala
 275 280 285
 Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser
 290 295 300
 Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro
 305 310 315 320
 Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr
 325 330 335
 Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp
 340 345 350
 Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu
 355 360 365
 Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys
 370 375 380
 Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly
 385 390 395 400
 Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala
 405 410 415
 Ser Val Gly Glu Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile
 420 425 430
 His Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln
 435 440 445
 Leu Leu Val Tyr Asn Val Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg
 450 455 460
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser
 465 470 475 480
 Leu Gln Pro Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser
 485 490 495
 Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala
 500 505 510
 Ala Ala Arg Gly Gly Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
 515 520 525
 Asn Ser Ala Val Asp His His His His His

<210> 12

<211> 1617

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<223> Secuencia de polinucleótido que codifica un anticuerpo biespecifico

<400> 12

5

10

ES 2 729 974 T3

atggagacag	acacactcct	gctatgggta	ctgctgctct	gggttccagg	ttccactggt	60
gacgcggccc	agccggccag	gcgcgccgta	cgaagcttac	aggtccagct	gcaggagtca	120
ggacctggcc	tggtgaaacc	ttctcagtct	ctgtccctca	cctgcactgt	cactggccac	180
tcaatcacca	gtgattatgc	ctggaactgg	atccggcagt	ttccaggaga	caaactggag	240
tggatgggct	acataagcta	cagtggttac	actacctaca	acccatctct	gaaaagtcca	300
gtctctatca	ctcgagacac	atccaagaac	cagttcttcc	tgcagttgaa	ttctgtgact	360
actgaggaca	cagccacata	cttctgtgca	agagaccttg	attacggccc	ctggtttgct	420
tactggggcc	aagggaccac	ggtcaccgct	tcctcaggtg	gaggcggttc	acaaattggt	480
ctcaccagct	ctccagcaat	catgtctgca	tctccagggg	agaaggtcac	catgacctgc	540
agtgccagct	caagtgtaag	ttacatgaac	tggtagcagc	agaagtcagg	cacctcccc	600
aaaagatgga	tttatgacac	atccaaactg	gcttctggag	tccctgctca	cttcaggggc	660
agtggctctg	ggacctctta	ctctctcaca	atcagcggca	tggaggctga	agatgctgcc	720
acttattact	gccagcagtg	gagtagtaac	ccattcacgt	tcggctcggg	gacaaagttg	780
gaaataaacc	ggggtggagg	cggttcaggc	ggaggtggct	ctggcgggtg	cggatcgag	840
gtccagctgc	agcagtctgg	ggctgaactg	gcaagacctg	gggcctcagt	gaagatgtcc	900
tgcaaggctt	ctggctacac	ctttactagg	tacacgatgc	actgggtaaa	acagaggcct	960
ggacagggtc	tggaatggat	tggatacatt	aatcctagcc	gtggttatac	taattacaat	1020
cagaagttca	aggacaaggc	cacattgact	acagacaaat	cccccagcac	atattatgat	1080
caactgagca	gcctgacatc	tgaggactct	gcagtctatt	actgtgcaag	atattatgat	1140
gatcattact	gccttgacta	ctggggccaa	ggcaccactc	tcacagtctc	ctcaggtgga	1200
ggcggttcag	acatccagat	gaccagctct	ccagcctccc	tatctgcatc	tgtgggagaa	1260
actgtcacc	tcacatgtcg	agcaagtggg	aatattcaca	attatttagc	atggtatcag	1320
cagaaacagg	gaaaatctcc	tcagctctctg	gtctataatg	taaaaacctt	agcagatggt	1380
gtgcatcaaa	ggttcagtg	cagtgatca	ggaacacaa	attctctcaa	gatcaacagc	1440
ctgcagcctg	aagatthtgg	gagttattac	gtcaacatt	tttggagtag	tccgtggagc	1500
ttcgggtggg	gcaccaagct	ggaaatcaaa	cgggcggccg	ctcaggagg	gcccgaacaa	1560
aaactcatct	cagaagagga	tctgaatagc	gccgtcgacc	atcatcatca	tcatcat	1617

- 5 <210> 13
- <211> 1434
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <223> Secuencia de polinucleótido que codifica un anticuerpo biespecifico

10 <400> 13

caggtccagc	tgcaggagtc	aggacctggc	ctggtgaaac	cttctcagtc	tctgtccctc	60
acctgcactg	tcactggcca	ctcaatcacc	agtgattatg	cctggaactg	gatccggcag	120
tttccaggag	acaaactgga	gtggatgggc	tacataagct	acagtggtta	cactacctac	180
aacctatctc	tgaaaagtcg	agtctctatc	actcgagaca	catccaagaa	ccagttcttc	240
ctgcagttga	attctgtgac	tactgaggac	acagccacat	acttctgtgc	aagagacctt	300
gattacggcc	cctggtttgc	ttactggggc	caagggacca	cggtcaccgt	ctcctcaggt	360
ggaggcgggt	cacaaattgt	tctcaccag	tctccagcaa	tcatgtctgc	atctccaggg	420
gagaaggtca	ccatgacctg	cagtgccagc	tcaagtgtaa	gttacatgaa	ctggtagcag	480
cagaagtcag	gcacctcccc	caaaagatgg	atthtatgaca	catccaaact	ggcttctgga	540
gtccctgctc	acttcagggg	cagtgggtct	gggacctctt	actctctcac	aatcagcggc	600
atggaggctg	aagatgctgc	cacttattac	tgccagcagt	ggagtagtaa	cccattcacg	660
ttcggctcgg	ggacaaagtt	ggaaataaac	cggggtggag	gcbggtcagg	cggaggtggc	720
tctggcgggt	gcbggtcagg	ggtagcagtc	cagcagctctg	gggctgaact	ggcaagacct	780
ggggcctcag	tgaagatgtc	ctgcaaggct	tctggctaca	ctttactag	gtacacgatg	840
cactgggttaa	aacagaggcc	tggacagggg	ctggaatgga	ttggatacat	taatcctagc	900
cgtggttata	ctaattacaa	tcagaagttc	aaggacaagg	ccacattgac	tacagacaaa	960
tcctccagca	cagcctacat	gcaactgagc	agcctgacat	ctgaggactc	tgcagtctat	1020
tactgtgcaa	gatattatga	tgatcattac	tgcttctgact	actggggcca	aggcaccact	1080
ctcacagctc	cctcaggtgg	aggcggttca	gacatccaga	tgaccagctc	tccagcctcc	1140
ctatctgcat	ctgtgggaga	aactgtcacc	ctcacatgct	gagcaagtga	gaaatattcac	1200
aattatttag	catgggatca	gcagaaacag	ggaaaatctc	ctcagctcct	ggtctataat	1260
gtaaaaacct	tagcagatgg	tgtgccatca	aggttcagtg	gcagtgatc	aggaacacaa	1320
tattctctca	agatcaacag	cctgcagcct	gaagatthtgg	ggagttatta	ctgtcaacat	1380
ttttqqaqta	qtccqtqqac	qttcqqttqqa	qqcaccaaqc	tqqaaatcaa	acqq	1434

- 15 <210> 14
- <211> 34
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <223> Oligonucleótido cebador de PCR

ES 2 729 974 T3

	<400> 14 ttttttaagc ttacaggtcc agctgcagga gtca	34
5	<210> 15 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<223> Oligonucleótido cebador de PCR <400> 15 ttttttgCGG cGccCGgtt tatttccaac ttG	34
15	<210> 16 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<223> Oligonucleótido cebador de PCR <400> 16 ttttttaagc ttacaggtcc agctgcagca gtct	34
25	<210> 17 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial <223> Oligonucleótido cebador de PCR	
30	<400> 17 ttttttgCGG cGccCGgtt gatttccagc ttG	34
35	<210> 18 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial <223> Oligonucleótido cebador de PCR	
40	<400> 18 atgaactggt accagcagaa g	21
45	<210> 19 <211> 65 <212> ADN <213> Secuencia artificial <223> Oligonucleótido enlazador	
50	<400> 19 agggaccacg gtcaccgtct cctcaggtgg aggcggttca caaattgttc tcaccagtc tccag	60 65
55	<210> 20 <211> 65 <212> ADN <213> Secuencia artificial <223> Oligonucleótido enlazador	
60	<400> 20 ctggagactg ggtgagaaca atttGTgAAC cgCctccacc tgaggagacg gTgaccgtgg tccct	60 65
60	<210> 21 <211> 65	

ES 2 729 974 T3

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <223> Oligonucleótido enlazador

5 <400> 21
 aggcaccact ctcacagtct cctcaggtgg aggcggttca gacatccaga tgaccagtc 60
 tccag 65

10 <210> 22
 <211> 65
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <223> Oligonucleótido enlazador

15 <400> 22
 ctggagactg ggtcatctgg atgtctgaac cgctccacc tgaggagact gtgagagtgg 60
 tgctt 65

20 <210> 23
 <211> 95
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <223> Oligonucleótido enlazador

25 <400> 23
 ggggacaaag ttggaataa accggggtgg aggcggttca ggcggaggtg gctctggcgg 60
 tggcggatcg caggtccagc tgcagcagtc tgggg 95

30 <210> 24
 <211> 95
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <223> Oligonucleótido enlazador

35 <400> 24
 ccccagactg ctgcagctgg acctgcgatc cgccaccgcc agagccacct ccgcctgaac 60
 cgctccacc cggtttatt tccaactttg tcccc 95

40 <210> 25
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <223> Polipéptido enlazador

45 <400> 25
 Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5

50 <210> 26
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <223> Polipéptido enlazador

55 <400> 26
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo biespecífico para su uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria, en donde el anticuerpo biespecífico es una proteína de fusión que comprende:

- (i) una región variable de la cadena pesada de un anticuerpo anti-PD-1 humana,
- (ii) una región variable de la cadena ligera de un anticuerpo anti-PD-1 humana,
- (iii) una región variable de la cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 humana, y
- (iv) una región variable de la cadena ligera de un anticuerpo anti-CD3 humana,

y que se une simultáneamente a la PD-1 humana y a la CD3 humana, en donde dicha CD3 humana se expresa en la misma célula que se expresa dicha PD-1 humana; y

en donde la enfermedad autoinmunitaria se selecciona del grupo que consiste en nefritis glomerular, artritis, enfermedad tipo miocardiopatía dilatada, colitis ulcerosa, síndrome de Sjögren, enfermedad de Crohn, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide crónica, esclerosis múltiple, psoriasis, dermatitis de contacto alérgica, polimiositis, paquidermia, periarteritis nodosa, fiebre reumática, vitiligo vulgaris, diabetes mellitus dependiente de insulina, enfermedad de Behcet, enfermedad de Hashimoto, enfermedad de Addison, dermatomiositis, miastenia gravis, síndrome de Reiter, enfermedad de Graves, anemia perniciosa, síndrome de Goodpasture, esterilidad patológica, hepatitis activa crónica, pénfigo, púrpura trombocitopénica autoinmunitaria y anemia hemolítica autoinmunitaria.

2. El anticuerpo biespecífico para su uso en el tratamiento de la enfermedad autoinmunitaria de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la enfermedad autoinmunitaria se selecciona de diabetes mellitus dependiente de insulina, lupus eritematoso sistémico y esclerosis múltiple.

3. El anticuerpo biespecífico para su uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las siguientes regiones variables están unidas por enlazadores peptídicos en el siguiente orden:

- (i) una región variable de la cadena pesada de un anticuerpo anti-PD-1 humana,
- (ii) una región variable de la cadena ligera de un anticuerpo anti-PD-1 humana,
- (iii) una región variable de la cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 humana, y
- (iv) una región variable de la cadena ligera de un anticuerpo anti-CD3 humana.

4. El anticuerpo biespecífico para su uso en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias de acuerdo con la reivindicación 1 o 3, en el que

- (i) la región variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-PD-1 humana comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2,
- (ii) la región variable de la cadena ligera del anticuerpo anti-PD-1 humana comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4,
- (iii) la región variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-CD3 humana comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 y
- (iv) la región variable de la cadena ligera del anticuerpo anti-CD3 humana comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8.

5. El anticuerpo biespecífico para su uso en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el anticuerpo biespecífico comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11.

6. Un anticuerpo biespecífico que es una proteína de fusión que comprende:

- (i) una región variable de la cadena pesada de un anticuerpo anti-PD-1 humana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2,
- (ii) una región variable de la cadena ligera de un anticuerpo anti-PD-1 humana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4,
- (iii) una región variable de la cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 humana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, y
- (iv) una región variable de la cadena ligera de un anticuerpo anti-CD3 humana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8,

en donde el anticuerpo biespecífico se une simultáneamente a la PD-1 humana y a la CD3 humana, en donde dicha CD3 humana se expresa en la misma célula que se expresa dicha PD-1 humana.

7. Un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11.

8. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 7, que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 9.

9. Un vector de duplicación o expresión que comprende el polinucleótido de la reivindicación 7.

5

10. Una célula hospedadora transformada por el vector de duplicación o expresión de la reivindicación 9.

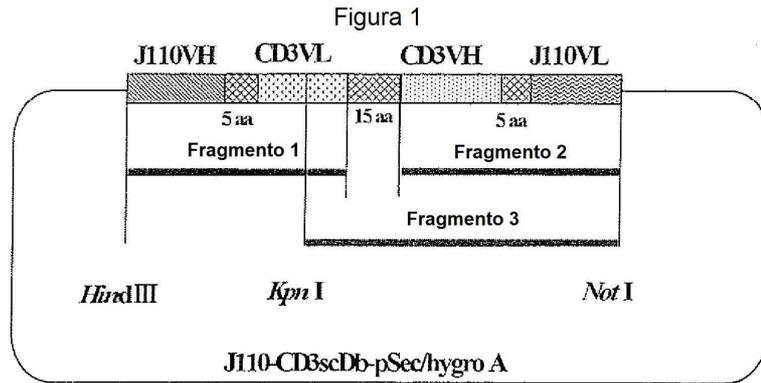


Figura 2

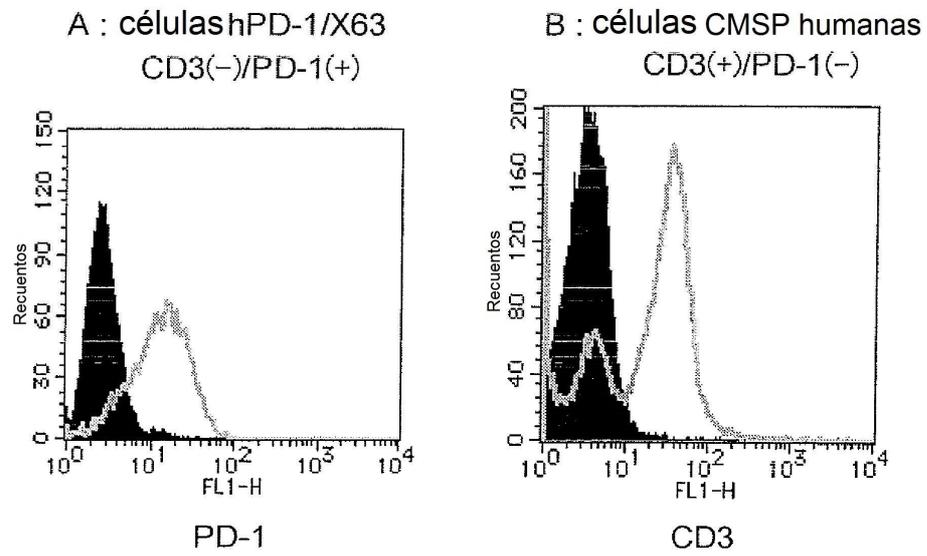


Figura 3

