

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 773 306**

51 Int. Cl.:

C07K 16/08 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 31/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.09.2014 PCT/EP2014/069675**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.03.2015 WO15036606**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.09.2014 E 14771250 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2019 EP 3046938**

54 Título: **Polipéptidos bi o multiespecíficos de unión a antígenos de superficie de células efectoras inmunitarias y antígenos de VHB para tratar infecciones por VHB y estados asociados**

30 Prioridad:

16.09.2013 EP 13184635

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

10.07.2020

73 Titular/es:

**HELMHOLTZ ZENTRUM MÜNCHEN -
DEUTSCHES FORSCHUNGSZENTRUM FÜR
GESUNDHEIT UND UMWELT (GMBH) (50.0%)
Ingolstädter Landstrasse 1
85764 Neuherberg, DE y
DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**PROTZER, ULRIKE;
BOHNE, FELIX;
MOMBURG, FRANK y
MOLDENHAUER, GERHARD**

74 Agente/Representante:

ILLESCAS TABOADA, Manuel

Observaciones:

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

ES 2 773 306 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

Polipéptidos bi o multiespecíficos de unión a antígenos de superficie de células efectoras inmunitarias y antígenos de VHB para tratar infecciones por VHB y estados asociados

5 La presente invención está definida por las reivindicaciones. Se refiere a una composición que comprende o que consiste en dos polipéptidos, en la que cada polipéptido comprende (1) un primer conjunto de seis regiones determinantes de complementariedad (CDR) comprendidas en un primer fragmento scFv y configuradas para unirse a un primer antígeno; y (2) un segundo conjunto de seis CDR comprendidas en un segundo fragmento scFv y configuradas para unirse a un segundo antígeno; en la que dichos dos polipéptidos son (a) (i) un polipéptido que se une a un antígeno de superficie pequeño o grande de VHB y a CD3; y (ii) un polipéptido que se une a un antígeno de superficie pequeño o grande de VHB y a CD28; o (b) (i) un polipéptido que se une a un antígeno de superficie pequeño o grande de VHB y a CD16; y (ii) un polipéptido que se une a un antígeno de superficie pequeño o grande de VHB y a CD56 y en la que no hay presentes CDR adicionales en dichos polipéptidos.

15 Alrededor de 350 millones de seres humanos presentan infección crónica por el virus de la hepatitis B (VHB). La infección por VHB puede conllevar cirrosis hepática y carcinoma hepatocelular (CHC) que provocan alrededor de un millón de fallecimientos al año (Ganem *et al.*, Hepatitis B virus infection-natural history and clinical consequences. N Engl J Med; 350:1118-29 (2004)). Las infecciones por VHB actualmente no pueden controlarse en aproximadamente el 5% de los pacientes adultos y aproximadamente el 90% de los recién nacidos. En tal caso, la infección por VHB se vuelve crónica. La causa probable es una respuesta inmunitaria celular insuficiente. Los fármacos antivirales disponibles actualmente, que se usan para el tratamiento de la infección por VHB, inhiben la replicación viral. Sin embargo, el ADN circular cerrado de manera covalente (ADNccc) permanece en el núcleo de los hepatocitos infectados y puede provocar una reactivación de la infección por VHB una vez que el paciente deja de tomar el medicamento. Por tanto, sería indispensable eliminar las células infectadas por VHB que portan dicho ADNccc si la infección debe curarse por completo (Protzer *et al.*, Nat Immunol Rev 12: 2013-213 (2012)).

25 Sin embargo, tal eliminación citotóxica de las células infectadas por VHB (ya sea por linfocitos T citotóxicos o linfocitos citolíticos naturales (células NK)) no se produce o no lo hace en un grado suficiente.

30 Las células infectadas que portan un ADNccc de VHB presentan en su superficie proteínas de superficie viral. Se supone que esto sucede aunque el virus se libere en vesículas intracelulares porque varias proteínas de superficie de VHB permanecen integradas en la membrana intracelular del retículo endoplasmático. En el transcurso de los procesos de transporte de vesículas, dicha membrana intracelular puede fusionarse con la membrana celular y, como consecuencia, las proteínas de superficie de VHB se presentan en la superficie de la célula infectada.

35 Bohne *et al.* (T cells redirected against hepatitis B virus surface proteins eliminate infected hepatocytes. Gastroenterology; 134:239-247 (2008)) y Krebs *et al.* (T Cells Expressing a Chimeric Antigen Receptor That Binds Hepatitis B Virus Envelope Proteins Control Virus Replication in Mice. Gastroenterology (2013)) describen receptores de antígenos quiméricos que, cuando se suministran de manera retroviral y se expresan en la superficie de una célula T, permiten que células T humanas y murinas primarias reconozcan los hepatocitos que presentan el antígeno de superficie pequeño de VHB y lisen las células en replicación de VHB.

40 Normalmente se emplean anticuerpos biespecíficos en el campo de la oncología. Como ejemplo, se hace referencia a Hartmann *et al.* (Treatment of refractory Hodgkin's disease with an anti-CD16/CD30 bispecific antibody. Blood; 89:2042-7 (1997)).

45 El documento EP 2 524 699 A1 describe anticuerpos trifuncionales. Estos anticuerpos "tienen una porción Fc funcional" y "deben consistir en cadenas pesadas de inmunoglobulina de diferentes subclases". Hornig und Farber-Schwarz, por otro lado, describen en el capítulo 40 de "Antibody Engineering" (ed. Patrick Channes, Humane Press, 2012) un constructo de scFv que carece de la porción Fc.

50 Liao *et al.* (Oncology Reports 3, 637-644 (1996)) describen anticuerpos monoclonales biespecíficos de redireccionamiento a células efectoras para la lisis de xenoinjertos de hepatoma humano en ratones desnudos. Los anticuerpos biespecíficos descritos se generan mediante la fusión de dos hibridomas, lo que da como resultado una línea celular d hibridoma que expresa las combinaciones de cadena pesada/ligera de dos anticuerpos distintos. Esto puede dar como resultado el apareamiento de las dos cadenas pesadas diferentes, pero también el apareamiento de cadenas pesadas idénticas, dando lugar a una mezcla aleatoria de anticuerpos monoespecíficos parentales y biespecíficos. Los anticuerpos biespecíficos contienen cadenas pesadas y ligeras y se dimerizan para formar una molécula de Ig que no es una cadena polipeptídica sencilla.

55 Bohne *et al.*, Gastroenterology 134, 239 (2008) describen que las células T redirigidas contra proteínas de superficie del virus de la hepatitis B eliminan hepatocitos infectados.

60 En vista de la técnica anterior, el problema técnico podría considerarse como la provisión de medios y métodos alternativos o mejorados de tratamiento de la infección por VHB, así como estados provocados por la infección por

VHB tales como cirrosis hepática o carcinoma hepatocelular. Expresado en términos de biología celular, el problema técnico puede considerarse como la provisión de medios y métodos para la erradicación de células que portan ADNccc de VHB. Este problema técnico se resuelve mediante las reivindicaciones adjuntas.

5 Por consiguiente, la presente invención se refiere, en un primer aspecto, a una composición que comprende o que consiste en dos polipéptidos, en la que cada polipéptido comprende (1) un primer conjunto de seis regiones determinantes de complementariedad (CDR) comprendidas en un primer fragmento scFv y configuradas para unirse a un primer antígeno; y (2) un segundo conjunto de seis CDR comprendidas en un segundo fragmento scFv y configuradas para unirse a un segundo antígeno; en la que dichos dos polipéptidos son (a) (i) un polipéptido que se une a un antígeno de superficie pequeño o grande de VHB y a CD3; y (ii) un polipéptido que se une a un antígeno de superficie pequeño o grande de VHB y a CD28; o (b) (i) un polipéptido que se une a un antígeno de superficie pequeño o grande de VHB y a CD16; y (ii) un polipéptido que se une a un antígeno de superficie pequeño o grande de VHB y a CD56 y en la que no hay presentes CDR adicionales en dichos polipéptidos.

15 Se describe un polipéptido que comprende (a) un primer conjunto de seis regiones determinantes de complementariedad (CDR) configuradas para unirse a un primer antígeno; y (b) (ba) un segundo conjunto de seis CDR configuradas para unirse a un segundo antígeno; o (bb) un ligando que puede unirse a un segundo antígeno; en la que (i) dicho primer antígeno se selecciona de antígeno de superficie pequeño de VHB; antígeno de superficie medio de VHB; y antígeno de superficie grande de VHB; y (ii) dicho segundo antígeno se selecciona de los antígenos de superficie presentados por las células efectoras inmunitarias tales como los linfocitos citolíticos naturales (células NK) y los linfocitos T citotóxicos (CTL, por sus siglas en inglés).

25 El término "polipéptido" define una molécula que es un policondensado de aminoácidos que forman una única cadena con un extremo N-terminal y un extremo C-terminal. Los aminoácidos constituyentes incluyen los 20 aminoácidos proteinogénicos que se producen de manera natural. Preferiblemente, dicho polipéptido consiste exclusivamente en dichos aminoácidos proteinogénicos que se producen de manera natural. Dicho esto, el término se extiende a las moléculas que, además de dichos aminoácidos proteinogénicos que se producen de manera natural, contienen hasta el 20%, el 10%, el 5%, el 2% o el 1% de aminoácidos que se seleccionan de α -aminoácidos que se producen de manera no natural, β -aminoácidos, D-aminoácidos, selenocisteína, selenometionina, hidroxiprolina, pirrolisina y ornitina. Además, se entiende que uno o más de los aminoácidos, tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10, pueden estar fosforilados. Esto último se aplica en particular a serina, treonina y tirosina. También pueden estar presentes otras modificaciones postraduccionales tal como se conoce en la técnica, incluyendo glucosilación. Las glucosilaciones incluyen glucosilaciones con unión a N, normalmente en una asparagina y glucosilaciones con unión a O, normalmente en residuos de serina o treonina. Los extremos N y/o C-terminal pueden protegerse, incluyendo los grupos de protección acetilo para el extremo N-terminal y amina para el extremo C-terminal. El tipo de unión entre los aminoácidos comprendidos en dicho polipéptido se limita a los enlaces amida (CONH). El término "enlace amida" incluye enlaces peptídicos que conectan el α -carboxilato de un aminoácido dado al grupo α -amino del aminoácido posterior. El "enlace amida" también se extiende a los enlaces isopeptídicos, que es un enlace amida que no está presente en la cadena principal del polipéptido. Por ejemplo, en lugar de un grupo α -amino, puede estar implicado el grupo amino de la cadena lateral de la lisina. De manera similar, en lugar del grupo α -carboxilo, puede estar implicado el carboxilato de cadena lateral de glutamato o aspartato. Se prevé la aparición de uno o más enlaces isopeptídicos, tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10. Sin embargo, se da preferencia a polipéptidos en los que los aminoácidos constituyentes están unidos entre sí exclusivamente por enlaces peptídicos.

45 En general, no hay límite superior en el número de aminoácidos en un polipéptido. Tal como puede observarse a partir de las secuencias de polipéptidos a modo de ejemplo comprendidas en la lista de secuencias, los polipéptidos de la presente invención contienen normalmente varios cientos de aminoácidos, preferiblemente entre 250 y 1000, 400 y 900, o entre 700 y 800 aminoácidos. Es habitual distinguir entre péptidos, por un lado, y polipéptidos, por otro lado, en los que los péptidos tienen 30 aminoácidos o menos y los polipéptidos tienen más de 30 aminoácidos.

50 El término "región determinante de complementariedad", abreviado como "CDR" tiene su significado según lo establecido en la técnica. Estas son subsecuencias cortas, normalmente en el intervalo de desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 25 aminoácidos, que confieren a un anticuerpo la capacidad para reconocer específicamente un epítipo de un antígeno. En general, el dominio variable de la cadena ligera de un anticuerpo proporciona tres CDR y el dominio variable de la cadena pesada de un anticuerpo proporciona tres CDR. Aunque las CDR forman parte normalmente de dominios de inmunoglobulina, no hay ningún requisito a ese respecto según la presente invención. Lo que es suficiente es una secuencia de aminoácidos, que comprende dichas CDR siempre que dicha secuencia de aminoácidos, cuando se pliega en condiciones fisiológicas, presente dichas CDR en proximidad espacial y mantenga su capacidad para reconocer el antígeno relacionado. La proximidad espacial y la capacidad de unión a antígeno mencionadas se expresan mediante el término "configurado para unirse a un antígeno" tal como se usa en la realización principal dada a conocer anteriormente. El término "dominio de inmunoglobulina" se conoce en la técnica y se refiere a una secuencia normalmente de 70 a 100 aminoácidos que adopta una estructura tridimensional de un sándwich de 2 capas de entre 7 y 9 hebras β antiparalelas.

65 Dicho primer conjunto de seis CDR así como dicho segundo conjunto de seis CDR definen, cada uno, un sitio de

unión.

Se entiende que más allá de dicho primer conjunto y dicho segundo conjunto no hay CDR adicionales presentes en el polipéptido de la invención.

5 El término "antígeno" tiene su significado establecido en la técnica. Se refiere a una molécula que se reconoce por y a la que se une específicamente un conjunto de seis CDR que se presentan normalmente por dominios de inmunoglobulina. La parte específica de un antígeno reconocida por y a la que se unen dichas CDR también se conoce como epítipo.

10 El término "ligando" tiene su significado establecido en la técnica. Un ligando es la contraestructura de un receptor. Más específicamente, un ligando puede unirse, preferiblemente unirse específicamente a su receptor relacionado. Según la invención, dicho ligando es preferiblemente un inmunoligando. Un inmunoligando es un ligando que puede unirse a un receptor presente en la superficie de una célula efectora inmunitaria. Células efectoras inmunitarias preferidas son, tal como se definieron anteriormente, células NK y CTL. Se prefieren aquellos inmunoligandos que, cuando se unen a su receptor relacionado en la superficie de una célula efectora inmunitaria, ejercen un efecto estimulador y/o coestimulador. Los términos "activar" y "estimular" se usan de manera equivalente en este contexto. Los receptores unidos por inmunoligandos preferidos se especifican más adelante.

20 Las proteínas de superficie S/M/L de VHB son las proteínas de superficie pequeñas, medianas y grandes en la envoltura externa del VHB (Stibbe, W. y W. H. Gerlich. Structural relationships between minor and major proteins of hepatitis B surface antigen. J. Virol. 1983 46:626-628).

25 Los tres antígenos de superficie de VHB se transcriben y traducen desde un marco de lectura y difieren entre sí por la longitud de la parte N-terminal. En consecuencia, el antígeno de superficie grande comprende una parte que no está presente ni en el antígeno de superficie mediano ni en el pequeño, y el antígeno de superficie mediano comprende una parte que, aunque está comprendida en el antígeno grande, no está comprendida en el antígeno pequeño. El antígeno pequeño consiste en una secuencia, que está comprendida en la parte C-terminal del antígeno tanto mediano como grande.

30 El antígeno de superficie grande de VHB puede insertarse de dos maneras en la membrana citoplasmática. O bien el extremo N-terminal o bien el extremo C-terminal puede estar ubicado en el lado extracelular. Ambas configuraciones se encuentran en células infectadas por VHB.

35 El segundo antígeno citado es un antígeno de superficie presentado por células efectoras inmunitarias, preferiblemente presentado específicamente por células NK y/o CTL. Las células efectoras inmunitarias son las células que deben redirigirse a las células infectadas por VHB, presentando dichas células infectadas por VHB los antígenos de superficie de VHB mencionados en su superficie.

40 Se prefiere particularmente que la unión, en particular entre CDR y antígenos, así como entre ligandos y antígenos, sea específica. Los términos "se une específicamente" y "que se une específicamente" (que tiene el mismo significado que "que interacciona específicamente") tal como se usa según la presente invención significa que estas porciones de unión no reaccionan de manera cruzada o esencialmente no lo hacen con un epítipo o una estructura similar al del antígeno diana. La reactividad cruzada de un panel de moléculas en investigación puede someterse a prueba, por ejemplo, evaluando la unión de dicho panel de moléculas en condiciones convencionales al epítipo de interés, así como a varios epítopos relacionados (estructural y/o funcionalmente) más o menos estrechamente. Sólo aquellas moléculas que se unen al epítipo de interés en su contexto relevante (por ejemplo, un motivo específico en la estructura de una proteína) pero que no se unen o esencialmente no lo hacen a ninguno de los otros epítopos se consideran específicas para el epítipo de interés.

50 La infección por VHB crónica se caracteriza por un estado inmunotolerante. Más específicamente, las células NK y CTL del paciente funcionan de tal manera que no se produce una erradicación completa de las células infectadas o un control completo de la replicación de VHB o una eliminación completa de VHB. Los polipéptidos según la invención son moléculas biespecíficas en el sentido de que reconocen específicamente un antígeno de superficie de VHB, por un lado, y un antígeno de superficie de célula efectora inmunitaria, por otro lado. Podría considerarse que tales moléculas biespecíficas confieren una especificidad artificial a las células efectoras inmunitarias. De hecho, las células NK y CTL se redireccionan por los polipéptidos de la invención (también se hace referencia a que son "biespecíficos") de tal manera que son reclutados a las células infectadas por VHB y las destruyen.

60 La unión de los polipéptidos de la invención a células infectadas por VHB, por un lado, y el reclutamiento de células efectoras inmunitarias, por otro lado, pueden producirse en cualquier orden o también simultáneamente.

65 En particular, se pretende aplicar sistemáticamente los polipéptidos de la invención o bien mediante inyección o bien como una forma de aplicación oral y permitirles que se unan a células diana infectadas por VHB o que expresan antígeno de VHB y recluten dichas células efectoras inmunitarias a dichas células diana.

Dicho esto, también se prevé poner en contacto los polipéptidos de la invención con células efectoras inmunitarias (o una población de células mononucleares de sangre periférica que comprende dichas células efectoras) de tal manera que dichas células efectoras se carguen con dichos polipéptidos. Tales células efectoras (o una población de PBMC que comprende tales células efectoras cargadas) que se han cargado *in vitro* o *ex vivo* luego pueden administrarse a un paciente que padece una infección por VHB o un estado asociado a la misma y definido a continuación. Tal administración puede realizarse por vía intravenosa, por ejemplo, a la arteria hepática. Una célula efectora inmunitaria con un polipéptido según la presente invención que se une a un antígeno de superficie de dicha célula efectora inmunitaria también es un aspecto de la presente invención. Este aspecto se describe más adelante.

Esta destrucción, en particular junto con mediadores inmunitarios antivirales (por ejemplo, citocinas) secretadas por las células inmunitarias, proporciona la erradicación de la infección por VHB o el control sostenido de la infección por VHB o la eliminación de células tumorales que expresan antígenos de superficie de VHB. Los polipéptidos biespecíficos preferidos o a modo de ejemplo según la presente invención proporcionan tasas de destrucción sorprendentemente altas de células infectadas por VHB o células tumorales hepáticas (también conocidas como células de hepatoma) que replican VHB o expresan antígenos de superficie de VHB; véanse los ejemplos adjuntos al presente documento.

Dado que los polipéptidos biespecíficos según la presente invención proporcionan especificidades adaptadas a las células efectoras inmunitarias, la especificidad inherente de manera natural de las células efectoras inmunitarias o la presentación de antígenos a las mismas se vuelve irrelevante. Como tal, un gran conjunto de células efectoras candidatas es susceptible de redireccionamiento. Además, los polipéptidos de la invención tienen una biodisponibilidad y semivida que es al menos comparable a la de los anticuerpos monoclonales.

Según la invención, dicho primer conjunto de seis CDR está comprendido en un primer fragmento scFv; y dicho segundo conjunto de seis CDR está comprendido en un segundo fragmento scFv.

Los ligandos descritos pueden ser inmunoligandos, preferiblemente que pueden unirse a NKG2D/CD314 (tal como los ligandos MICA, MICB, ULBP1-6), NKp30/NCR3/CD337 (tal como el ligando B7-H6), 4-1BB/CD137 (tal como el ligando 4-1BB-L/CD137L) u OX40/CD134 (tal como el ligando OX40-L/CD252). Una barra oblicua ("/") separa las designaciones alternativas establecidas en la técnica. Entre paréntesis se proporcionan representantes preferidos de un género dado de antígenos.

El término "scFv" está bien establecido en la técnica. La abreviatura significa "fragmento variable de cadena sencilla" de un anticuerpo y define un polipéptido que puede reconocer y unirse específicamente al epítipo de un antígeno. Tal como se indicó anteriormente, tres CDR se presentan por el dominio variable de una cadena ligera de anticuerpo (V_L) y tres CDR se presentan por el dominio variable de una cadena pesada (V_H) de un anticuerpo. En un scFv, dos dominios variables están conectados entre sí mediante un ligante peptídico. El constructo de fusión obtenido es una cadena polipeptídica única. Esto proporciona una fácil expresión de la molécula de scFv. Puede encontrarse un dibujo esquemático en la figura 1.

Los términos "dominio V_H " y "dominio V_L " se usan según las definiciones proporcionadas en la técnica. Por tanto, se refieren a la región variable de la cadena pesada (V_H) y la región variable de la cadena ligera (V_L) de las inmunoglobulinas, respectivamente. En general, los dominios V_H y V_L comprenden tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) cada una, en los que las CDR son regiones altamente variables responsables principalmente de la unión al antígeno.

Un ligante peptídico se usa preferiblemente para ligar regiones variables del scFv o para ligar el scFv a la región de dimerización y/o espaciadora, preferiblemente al Fc. Normalmente, los ligantes peptídicos tienen una longitud de entre 3 y 30 aminoácidos, preferiblemente entre 5 y 25 ó 10 y 20 aminoácidos. Se da preferencia a aquellos ligantes, que no interfieren o sustancialmente no lo hacen con la estructura y/o función de los dominios o polipéptidos que conectan (la conexión produce una única cadena de polipéptidos continua). Los ligantes incluyen ligantes ricos en Gly tales como el ligante $(Gly_4Ser)_3$ (SEQ ID NO: 47) que se usa en los polipéptidos preferidos de la invención para conectar los dominios V_H/V_L de scFvs específicos de CTL o NK, y el ligante Yol (SEQ ID NO: 48; AKTTPKLEEGEFSEARV, tal como se describe en Sellrie *et al.*, Journal of Biochemistry and Molecular Biology, vol. 40, nº. 6, noviembre de 2007, págs. 875-880) que se usa en los polipéptidos preferidos de la invención para conectar los dominios V_H/V_L de los scFvs específicos para antígenos de superficie de VHB. También el ligante $(Gly_4Ser)_4$ (SEQ ID NO: 49) puede usarse para conectar los dominios V_H/V_L de los scFvs específicos para antígenos de superficie de VHB.

El término "anticuerpo" tal como se usa en el presente documento tiene su significado establecido en la técnica. Preferiblemente, se refiere al anticuerpo monoclonal. Pueden prepararse anticuerpos monoclonales, por ejemplo, mediante las técnicas descritas originariamente en Köhler y Milstein, Nature 256 (1975), 495y Galfre, Meth. Enzymol 73 (1981) 3, que comprenden la fusión de células de mieloma de ratón con células de bazo derivadas de mamíferos inmunizados con modificaciones desarrolladas en la técnica. Además, pueden obtenerse anticuerpos o fragmentos de los mismos dirigidos contra las proteínas de superficie de VHB mencionadas anteriormente usando métodos que se describen, por ejemplo, en Harlow and Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor,

1988. La producción de anticuerpos quiméricos se describe, por ejemplo, en el documento WO89/09622. Una fuente adicional de anticuerpos para utilizarse según la presente invención son los denominados anticuerpos xenogénicos. El principio general para la producción de anticuerpos xenogénicos, tales como anticuerpos humanos en ratones, se describe, por ejemplo, en los documentos WO 91/10741, WO 94/02602, WO 96/34096 y WO 96/33735. Los anticuerpos que van a emplearse según la invención o sus cadenas de inmunoglobulina correspondientes pueden modificarse adicionalmente usando técnicas convencionales conocidas en la técnica, por ejemplo, usando delección/delecciones, inserción/inserciones, sustitución/sustituciones, adición/adiciones y/o recombinación/recombinaciones de aminoácidos y/o cual(es)quier otra(s) modificación/modificaciones conocida(s) en la técnica, o bien sola o bien en combinación. Los métodos para introducir tales modificaciones en la secuencia de ADN o de polipéptido subyacente a la secuencia de aminoácidos de una cadena de inmunoglobulina son bien conocidos por el experto en la técnica; véase, por ejemplo, Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989. Las modificaciones de los polipéptidos incluyen también modificaciones postraduccionales tales como glicosilaciones.
- En una realización preferida adicional, dicho primer conjunto de seis CDR se une a un epítipo de dicho primer antígeno, epítipo que está ubicado (a) en dicho antígeno de superficie pequeño de VHB; o (b) en la parte de dicho antígeno de superficie grande de VHB que no está comprendida por dicho antígeno de superficie pequeño de VHB; o (c) en una parte de dicho antígeno de superficie grande de VHB, parte que varía en cuanto a la estructura con respecto a dicho antígeno de superficie pequeño de VHB.
- El punto (a) se refiere a epítopos presentes en el antígeno de superficie pequeño de VHB. Debido a la relación descrita anteriormente entre los antígenos de superficie pequeño, mediano y grande de VHB, la secuencia completa del antígeno pequeño está comprendida en el antígeno mediano y grande. En general, pero no necesariamente, un epítipo tridimensional presentado por el antígeno de superficie pequeño también lo presentará el antígeno de superficie mediano y/o grande.
- Según el punto (b), se prefiere que dicha parte de dicho antígeno de superficie grande de VHB tampoco esté comprendida por dicho antígeno de superficie mediano de VHB. Con respecto al punto (c), se entiende que "varía en cuanto a la estructura" incluye epítopos de dicho antígeno de superficie grande de VHB que comprenden o consisten en secuencias que forman parte de la secuencia de dicho antígeno de superficie pequeño de VHB, en la que dichos epítopos no están presentes en dicho antígeno de superficie pequeño de VHB. Según el punto (c), se prefiere además que dicho epítipo esté en una parte de dicho antígeno de superficie grande de VHB, parte que también varía en cuanto a la estructura con respecto a dicho antígeno de superficie mediano de VHB.
- Dicho punto (a), es decir, dicho primer antígeno que es dicho antígeno de superficie pequeño de VHB, se prefiere particularmente junto con todos los aspectos y realizaciones de esta invención.
- Según los puntos (b) y (c), el polipéptido reconocerá específicamente el antígeno de superficie grande de VHB.
- Los antígenos de superficie descritos presentados por las células efectoras inmunitarias se seleccionan de CD3, CD28, 4-1BB, OX40, CD16, CD56, NKG2D y NKp30/NCR3. Por consiguiente, se describe un polipéptido que comprende (a) un primer conjunto de seis regiones determinantes de complementariedad (CDR) configuradas para unirse a un primer antígeno; y (b) (ba) un segundo conjunto de seis CDR configuradas para unirse a un segundo antígeno; o (bb) un ligando que puede unirse a un segundo antígeno; en el que (i) dicho primer antígeno se selecciona del antígeno de superficie pequeño del virus de la hepatitis B (VHB); el antígeno de superficie mediano de VHB; y el antígeno de superficie grande de VHB; y (ii) dicho segundo antígeno se selecciona de antígenos de superficie presentados por células efectoras inmunitarias tales como linfocitos citolíticos naturales (células NK) y linfocitos T citotóxicos (CTL), en el que (c) dicho primer conjunto de seis CDR está comprendido en un primer fragmento scFv; y (d) (da) dicho segundo conjunto de seis CDR está comprendido en un segundo fragmento scFv; o (db) dicho ligando es un inmunoligando que puede unirse a NKG2D tal como los ligandos MICA, MICB, ULBP1-6; NKp30 tal como el ligando B7-H6, 4-1BB tal como el ligando 4-1BB-L; u OX40 tal como el ligando OX40-L; y en el que dicho antígeno de superficie presentado por células efectoras inmunitarias se selecciona de CD3, CD28, 4-1BB, OX40, CD16, CD56, NKG2D y NKp30.
- CD3 representa la cadena epsilon de CD3, que forma parte del complejo CD3-receptor de células T. (Borst, J. *et al.*, The delta- and epsilon-chains of the human T3/T-cell receptor complex are distinct polypeptides. *Nature*. 1984. 312: 455-458).
- CD28 es un receptor coestimulador de células T de gran importancia. (Lesslauer, W. *et al.*, T90/44 (9.3 antigen). A cell surface molecule with a function in human T cell activation. *Eur. J. Immunol.* 1986. 16: 1289-1296).
- 4-1BB (CD137) es un receptor coestimulador de células T y células NK activadas. (Kwon, B.S. *et al.*, cDNA sequences of two inducible T-cell genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1989. 86.:1963-1967).
- OX40 (CD134) es un receptor coestimulador secundario. (Arch, R. H. *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 1998. 18: 558-565). 4-1BB y OX40 son miembros de una familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF) que se unen a los

ligandos asociados al receptor de TNF y activan el factor nuclear kappaB.

CD16 (Fc γ R1IIa) es un receptor de Fc de baja afinidad expresado por las células NK, un subconjunto de células T citotóxicas activadas, así como por tipos de células del linaje mielomonocítico, que se unen al dominio Fc de las moléculas de IgG. (Lanier, L.L. *et al.*, Functional properties of a unique subset of cytotoxic CD3+ T lymphocytes that express Fc receptors for IgG (CD16/Leu-11 antigen). *J. Exp. Med.* 1985. 162: 2089-2106).

CD56 (NCAM) es una molécula de adhesión celular expresada por las células NK. (Lanier, L.L. *et al.*, Identity of Leu-19 (CD56) leukocyte differentiation antigen and neural cell adhesion molecule. *J. Exp. Med.* 1989. 169: 2233-2238).

NKG2D es un receptor activador expresado por las células NK (Houchins, J. *et al.*, DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells. 1991. *J. Exp. Med.* 173: 1017-1020).

NKp30 (NCR3) es un receptor expresado por las células NK (Pende, D. *et al.*, Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. 2000. *J. Exp. Med.* 192: 337-346).

CD3, CD28, 4-1BB y OX40 están presentes en la superficie de los CTL. La unión de un polipéptido de la invención a cualquiera de estos antígenos de superficie conlleva la estimulación o coestimulación de CTL.

CD16, CD56, NKG2D, NKp30/NCR3 y 4-1BB están presentes en la superficie de las células NK. La unión de un polipéptido de la invención a cualquiera de estos antígenos de superficie conlleva la estimulación o coestimulación de células NK.

Con respecto a los CTL humanos, la invención usa CD3 y CD28. Con respecto a las células NK humanas, la invención usa CD16 y CD56.

Los antígenos de superficie mencionados se designan mediante nombres establecidos en la técnica (véanse también Kenneth Murphy, *Janeway's Immunobiology*, 7ª edición, Garland Science; William E. Paul, *Fundamental Immunology*, 7ª edición, Lippincott Williams & Wilkins).

En una realización preferida adicional, dicho polipéptido comprende además una región de dimerización. Dicha región de dimerización puede proporcionar dimerización covalente y/o no covalente.

A través de la dimerización, los anticuerpos bivalentes biespecíficos se vuelven tetravalentes biespecíficos (o incluso tetravalentes tetraespecíficos si se coexpresan diferentes anticuerpos biespecíficos en la célula productora). Se espera que los reactivos tetravalentes biespecíficos tal como se describen en el presente documento tengan una avidéz aumentada que es similar a la de los anticuerpos monoespecíficos convencionales, ya que pueden acoplarse a dos moléculas de antígeno del mismo tipo con su lado N-terminal y su lado C-terminal, respectivamente.

Preferiblemente, dicha región de dimerización que conecta dos polipéptidos de la invención consiste en la región bisagra de la cadena pesada de IgG o comprende los residuos de cisteína responsables de la dimerización de las cadenas pesadas de un anticuerpo. Preferiblemente, dicha región de dimerización consiste en una subsecuencia de 32 aminoácidos de longitud, la denominada región bisagra de la cadena pesada (EPKSSDKTHTCPPCPAPEFEGAPSVFLFPPKP, véanse SEQ ID NO: 43 a 46) y comprende los dos residuos de cisteína (subrayados en la secuencia anterior) responsables de la dimerización de las cadenas pesadas. Preferiblemente, el único residuo de cisteína dentro de la región bisagra de la cadena pesada de IgG que media en el enlace disulfuro intermolecular entre los dominios constantes de la cadena pesada y ligera de IgG en un anticuerpo natural se muta a una serina para impedir que haya puentes de disulfuro aberrantes.

Se conocen en la técnica dominios de dimerización adecuados para la dimerización no covalente e incluyen cremalleras de leucina.

En una realización preferida adicional, dicho polipéptido comprende además una región espaciadora, comprendiendo dicha región espaciadora preferiblemente un dominio CH2 y un dominio CH3, estando ubicada dicha región espaciadora entre (i) dicho primer fragmento scFv y (ii) dicho segundo fragmento scFv o dicho ligando recombinante en la secuencia de aminoácidos de dicho polipéptido.

Es ventajosa una región espaciadora que comprenda o consista en un dominio CH2 y un dominio CH3, en particular de IgG. Su capacidad para unirse a la proteína A proporciona una secreción eficiente desde las células productoras y/o la posterior purificación de los reactivos.

Tanto dicho dominio CH2 como CH3, por un lado, y dicha región de dimerización, por otro lado, pueden proporcionarse por la región correspondiente de una molécula de IgG, preferiblemente IgG1 o IgG2, incluso más preferiblemente una molécula de IgG1 o IgG2 humana (hIgG1, hIgG2). Una subsecuencia preferida de una molécula

de hlgG1 que proporciona dominio CH2, dominio CH3 y dominio de dimerización puede observarse en las secuencias 43 a 46. Preferiblemente, y esto se aplica a las secuencias mencionadas, la porción de hlgG1, en particular dicho dominio CH2, se mutagenizó en múltiples posiciones para disminuir o suprimir la unión a los receptores Fc (indicados en negrita y cursiva en las secuencias que se facilitan más adelante). Más generalmente, la región Fc, en particular el dominio CH₂ y/o el dominio CH₃ puede mutarse en una o más posiciones para disminuir o suprimir la unión a los receptores Fc. Tal procedimiento se conoce en la técnica y se describe, por ejemplo, en Armour *et al.*, Recombinant human IgG molecules lacking Fcγ receptor I binding and monocyte triggering activities. Eur. J. Immunol. 1999. 29: 2613-2624 y Lazar *et al.*, Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2006. 103: 4005-4010. Esto es ventajoso porque no se prefiere la activación de la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés) según la invención.

Dicho de otro modo, puede usarse un fragmento Fc de anticuerpo para implementar la región espaciadora y la región de dimerización. El término "fragmento Fc" lo conoce el experto y define un fragmento de IgG que se obtiene mediante escisión con papaína y comprende dominios CH2 y CH3.

Entre dicho primer fragmento scFv y dicha región espaciadora y/o entre dicha región espaciadora y dicho segundo fragmento scFv está(n) presente(s) (una) secuencia(s) ligante(s). Se dieron a conocer secuencias ligantes preferidas en el presente documento anteriormente. Tal como puede observarse a partir de las secuencias preferidas comprendidas en la lista de secuencias, en particular secuencias de SEQ ID NO: 43 a 46, tales secuencias ligantes pueden consistir en glicinas o glicinas y serinas.

La figura 2 ilustra la arquitectura molecular de aquellos polipéptidos preferidos de la invención que comprenden una región de dimerización (región bisagra de hlgG) así como una región CH2 y una CH3 que separan los dos fragmentos scFv entre sí.

Los términos "dominio CH2" y "dominio CH3" tienen su significado establecido en la técnica. Se refieren a los dominios contantes segundo y tercero de las cadenas pesadas de anticuerpo.

Además, se describe un polipéptido que comprende (a) un primer conjunto de seis regiones determinantes de complementariedad (CDR) configuradas para unirse a un primer antígeno; y (b) (ba) un segundo conjunto de seis CDR configuradas para unirse a un segundo antígeno; o (bb) un ligando que puede unirse a un segundo antígeno; en el que (i) dicho primer antígeno se selecciona del antígeno de superficie pequeño del virus de la hepatitis B (VHB); el antígeno de superficie mediano de VHB; y el antígeno de superficie grande de VHB; y (ii) dicho segundo antígeno se selecciona de antígenos de superficie presentados por células efectoras inmunitarias tales como linfocitos citotóxicos naturales (NK) y linfocitos T citotóxicos (CTL), en el que (c) dicho primer conjunto de seis CDR está comprendido en un primer fragmento scFv; y (d) (da) dicho segundo conjunto de seis CDR está comprendido en un segundo fragmento scFv; o (db) dicho ligando es un inmunoligando, preferiblemente que puede unirse a NKG2D tal como los ligandos MICA, MICB, ULBP1-6; NKp30 tal como el ligando B7-H6; 4-1BB tal como el ligando 4-1BB-L; u OX40 tal como el ligando OX40-L, en el que dicho antígeno de superficie presentado por células efectoras inmunitarias se selecciona de CD3, CD28, 4-1BB, OX40, CD16, CD56, NKG2D, NKp30 y 4-1BB, y en el que dicho polipéptido comprende además una región de dimerización y una región espaciadora, siendo dicha región de dimerización y dicha región espaciadora preferiblemente tal como se definió adicionalmente antes.

En una realización preferida adicional, (a) dicho primer conjunto de seis CDR tiene las secuencias de SEQ ID NO: 1 a 6, 7 a 12 ó 13 a 18; y/o (b) dicho segundo conjunto de seis CDR tiene las secuencias de SEQ ID NO: 19 a 24, 25 a 30, 31 a 36 ó 37 a 42.

Como es habitual en la técnica, y además resulta evidente a partir de la lista de secuencias adjunta, el orden de las CDR en cada conjunto de seis CDR tal como se especificó anteriormente es el siguiente: CDR1 de cadena pesada, CDR2 de cadena pesada, CDR3 de cadena pesada, CDR1 de cadena ligera, CDR2 de cadena ligera y CDR3 de cadena ligera.

C8, 5F9, 5A19, OKT3, 9.3, A9 y NCAM29.2, tal como se usan en la lista de secuencias, designan el anticuerpo a partir del que se originan las CDR respectivas y se refieren a un anticuerpo anti-HBs preferido, a un segundo anticuerpo anti-HBs diferente, un anticuerpo contra el antígeno de superficie grande de VHB, un anticuerpo contra CD3 humano, un anticuerpo contra CD28 humano, un anticuerpo contra CD16 humano y un anticuerpo contra CD56 humano, respectivamente. "HBs" designa el antígeno de superficie pequeño de VHB.

Se prefiere particularmente que dicho polipéptido comprenda o consista en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 43 a 46 o una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de al menos el 80% con una cualquiera de las SEQ ID NO: 43 a 46, siempre que las CDR de dicha secuencia de aminoácidos que presentan una identidad de al menos el 80% sean idénticas a las comprendidas en una cualquiera de las SEQ ID NO: 43 a 46, respectivamente. En SEQ ID NO: 43, los últimos tres residuos "GNS" son prescindibles.

Los niveles preferidos de identidad de secuencia incluyen al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 91%, al

menos el 92%, al menos el 93%, al menos el 94%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98% y al menos el 99%. Los medios y métodos para determinar la identidad de secuencia se conocen bien en la técnica. Un algoritmo preferido para determinar la identidad de secuencia por parejas es la herramienta de búsqueda de alineación local básica (BLAST) tal como se describe, por ejemplo, en McGinnis y Madden (Nucleic Acid Research 32, W20-W25 (2004)).

La ubicación de dichas CDR en una secuencia dada, en el presente caso en las secuencias de SEQ ID NO: 43 a 46 puede determinarse con métodos establecidos en la técnica, incluyendo los métodos establecidos conocidos en la técnica los sistemas de Chothia, Kabat y LeFranc/IMGT, respectivamente. En ausencia de cualquier indicación en contra, se entiende que las CDR según la realización particularmente preferida definida anteriormente son las definidas anteriormente, es decir, un primer conjunto que tiene las secuencias de SEQ ID NO: 1 a 6, 7 a 12 ó 13 a 18, y un segundo conjunto que tiene las secuencias de SEQ ID NO: 19 a 24, 25 a 30, 31 a 36 ó 37 a 42. Tal como puede observarse a partir de las secuencias comprendidas en la lista de secuencias adjunta, estas secuencias de CDR específicas (subrayadas en las secuencias reproducidas más adelante) están comprendidas, de hecho, en las secuencias de SEQ ID NO: 43 a 46.

Las secuencias de SEQ ID NO: 1 a 6 definen las CDR y SEQ ID NO: 37 a 40 definen polipéptidos biespecíficos que pueden unirse a un epítipo específico dentro del antígeno de superficie pequeño de VHB. Este epítipo está ubicado en el determinante α , que está expuesto a la superficie de las células infectadas y los viriones, respectivamente. El término "determinante α " se usa para designar una región dentro del antígeno de superficie pequeño de VHB en la que están ubicados los epítopos principales para la inducción de una respuesta inmunitaria humoral protectora. Estas CDR, así como los polipéptidos de SEQ ID NO: 43 a 46 tienen la ventaja de que pueden usarse para todos los serotipos de VHB.

En un segundo aspecto, la presente divulgación se refiere a un ácido nucleico que codifica para los polipéptidos definidos anteriormente. Realizaciones preferidas de los polipéptidos dan lugar a realizaciones preferidas correspondientes de dicho ácido nucleico.

El término "ácido nucleico" tiene su significado establecido en la técnica y no está particularmente limitado. Se prefieren ADN tal como ADN genómico o ADNc, así como ARN tal como ARNm. Aunque no se prefiere, se prevé el uso de derivados de nucleótidos, derivados de nucleótidos que incluyen nucleótidos derivatizados en 2' tales como 2'-metil-nucleótidos; nucleótidos peptídicos como los que se producen en ácidos nucleicos peptídicos y similares.

En un tercer aspecto, la presente divulgación se refiere a un complejo unido covalentemente que comprende o que consiste en unos polipéptidos primero y segundo, en el que hay al menos una unión covalente entre dicho primer y dicho segundo polipéptidos, preferiblemente al menos un puente disulfuro entre un residuo de Cys de dicho primer polipéptido y un residuo de Cys de dicho segundo polipéptido, siendo dichos polipéptidos primero y segundo tal como se definen según la invención.

Se prefieren dos uniones covalentes entre dicho primer y dicho segundo polipéptidos, preferiblemente dos uniones disulfuro tal como se representa en la figura 2.

También se proporciona un complejo que comprende o que consiste en unos polipéptidos primero y segundo, en el que dicho primer y dicho segundo polipéptidos se unen entre sí de manera no covalente.

En la figura 2 se muestra un dibujo a modo de ejemplo de dicho complejo unido covalentemente. Se da preferencia a que dicho complejo sea un dímero.

En un cuarto aspecto, la presente divulgación se refiere a una composición que comprende o que consiste en uno o más polipéptidos según la invención y/o uno o más complejos según la invención, siempre que al menos dos polipéptidos estén comprendidos en dicha composición, dos polipéptidos que son distintos entre sí con respecto al primer antígeno y/o el segundo antígeno al que se unen.

Según la invención, dichos dos polipéptidos son (a) (i) un polipéptido que se une al antígeno de superficie pequeño o grande de VHB y a CD3; y (ii) un polipéptido que se une a un antígeno de superficie pequeño o grande de VHB y a CD28; o (b) (i) un polipéptido que se une a un antígeno de superficie pequeño o grande de VHB y a CD16; y (ii) un polipéptido que se une a un antígeno de superficie pequeño o grande de VHB y a CD56.

Tanto la alternativa (a) como la alternativa (b), en particular en la medida en que se relacionan con polipéptidos que se unen al antígeno de superficie pequeño de VHB, de esta realización preferida, proporcionan tasas de eliminación extraordinariamente altas de hasta el 95% en comparación con el control negativo. Se espera que esto proporcione una erradicación completa de células infectadas por VHB o células tumorales positivas para el antígeno de VHB, especialmente después de la aplicación repetida en una situación *in vivo*.

Se ha encontrado que el uso combinado de moléculas biespecíficas que se unen a dos marcadores de CTL o marcadores de NK distintos proporciona efectos sinérgicos. Las Figuras 3 y 4B muestran una comparación de lisis

de células diana específicas tras la administración de constructos biespecíficos.

En una realización particularmente preferida, dichos dos polipéptidos comprenden o consisten en las secuencias de (a) SEQ ID NO: 43 y 44; o (b) SEQ ID NO: 45 y 46.

Cada una de las secuencias SEQ ID NO: 43 a 46 permite la formación de dos puentes disulfuro cuando se forma un homodímero. Dicho esto, se prevé deliberadamente formar también heterodímeros. Un ejemplo de un heterodímero sería un complejo unido covalentemente de dos polipéptidos de la presente invención, en el que un primer polipéptido se uniría a un antígeno de superficie de VHB y un primer marcador presentado por una célula efectora inmunitario y un segundo polipéptido se uniría a un antígeno de superficie de VHB y un segundo marcador de una célula efectora inmunitaria. Los dos marcadores de una célula efectora inmunitaria pueden ser, por ejemplo, CD3 y CD28 o, como alternativa, CD16 y CD56.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende o que consiste en una o más composiciones de la invención.

La composición farmacéutica puede comprender además portadores, excipientes y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos de portadores, excipientes y/o diluyentes farmacéuticos adecuados se conocen bien en la técnica e incluyen soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones de aceite/agua, diversos tipos de agentes humectantes, disoluciones estériles, etc. Las composiciones que comprenden tales portadores pueden formularse mediante métodos convencionales bien conocidos. Estas composiciones farmacéuticas pueden administrarse al sujeto a una dosis adecuada. La administración de las composiciones adecuadas puede efectuarse de diferentes maneras, por ejemplo, mediante administración intravenosa, subcutánea u oral, prefiriéndose estas tres opciones, y además mediante administración intraperitoneal, intramuscular, tópica, intradérmica, intranasal o intrabronquial. Las formulaciones para administración oral incluyen comprimidos y jarabes. Se prefiere particularmente que dicha administración se realice mediante inyección. Las composiciones también pueden administrarse directamente al sitio diana, por ejemplo, mediante administración biolística a un sitio diana externo o interno. El régimen de dosificación lo determinará el médico que atiende y según factores clínicos. Tal como se conoce bien en las técnicas médicas, las dosificaciones para un paciente cualquiera dependen de muchos factores, incluyendo la talla del paciente, el área de superficie corporal, la edad, el compuesto particular que va a administrarse, el sexo, el momento y la vía de administración, la salud general y otros fármacos que estén administrándose simultáneamente. Puede estar presente material proteico farmacéuticamente activo en cantidades de entre 1 ng y 10 mg/kg de peso corporal por dosis; sin embargo, se prevén dosis inferiores o superiores a este intervalo a modo de ejemplo, especialmente teniendo en cuenta los factores mencionados anteriormente. Si el régimen es una infusión continua, también debe estar en el intervalo de unidades de 1 µg a 10 mg por kilogramo de peso corporal por minuto.

Se prefiere particularmente la administración intravenosa.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una o más composiciones de la invención para su uso en un método de tratamiento o prevención de infección por VHB y/o un estado provocado por dicha infección por VHB, seleccionándose dicho estado provocado por dicha infección por VHB de cirrosis hepática, carcinoma hepatocelular y cáncer de hígado, estando caracterizado dicho cáncer de hígado por la expresión de uno o más antígenos de superficie de VHB. Se prefiere que dicho carcinoma hepatocelular se caracterice por la expresión de uno o más de los antígenos de superficie de VHB definidos anteriormente.

En un aspecto adicional, la presente divulgación se refiere a un método de tratamiento o prevención de infección por VHB y/o un estado provocado por dicha infección por VHB, seleccionándose dicho estado provocado por dicha infección por VHB de cirrosis hepática y carcinoma hepatocelular, comprendiendo dicho método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz o una cantidad preventiva, respectivamente, de uno o más polipéptidos de la invención, uno o más complejos de la invención y/o una o más composiciones de la invención a un paciente que lo necesita.

Se prefiere que dicha composición farmacéutica, dicho polipéptido/complejo/composición para su uso en un método de tratamiento y dicho método de tratamiento, los polipéptidos, complejos y/o composiciones citados sean los únicos agentes farmacéuticamente activos comprendidos o usados.

Dicho esto, también se prevé deliberadamente incorporar uno o más agentes farmacéuticamente activos adicionales en una terapia combinada. Tales agentes farmacéuticamente activos adicionales pueden seleccionarse de interferones u otros inmunomoduladores (tales como, por ejemplo, interferón alfa 2a o 2b, interferón lambda), antivirales de acción directa tales como análogos de nucleós(t)idos (tales como, por ejemplo, lamivudina (EpiVir-HBV, Zeffix o Heptodin), adefovir dipivoxil (Hepsera, Preveon), entecavir (Baraclude, Entaliv), telbivudina (Tyzeka, Sebivo), tenofovir (Viread)), inhibidores de entrada (tales como, por ejemplo, Myrcludex-B), otros antivirales, o citocinas tales como interleucina-2.

En un aspecto adicional, la presente divulgación se refiere a un método *in vitro* para destruir células infectadas por

VHB, comprendiendo dicho método cultivar dichas células infectadas por VHB con (i) células efectoras inmunitarias y (ii) uno o más polipéptidos de la invención, uno o más complejos de la invención y/o una o más composiciones de la invención.

- 5 Dichas células efectoras inmunitarias (i) pueden estar comprendidas en células mononucleares de sangre periférica; o (ii) son o comprenden células NK y/o CTL.

En un aspecto adicional, la presente divulgación se refiere a una célula efectora inmunitaria *in vitro* o *ex vivo*, que tiene un polipéptido de la invención o un complejo según la invención unido a un antígeno de superficie de dicha célula efectora inmunitaria. Las células efectoras inmunitarias preferidas y los antígenos de superficie preferidos presentados por las células efectoras inmunitarias son tal como se definieron anteriormente. Tal célula efectora inmunitaria es útil para la administración a un paciente que padece infección por VHB, cirrosis hepática o carcinoma hepatocelular. Por consiguiente, también se proporciona una composición farmacéutica que comprende o que consiste en una célula efectora inmunitaria que tiene unido a un antígeno de superficie de la misma, un polipéptido de la invención o un complejo según la invención. También se proporciona una célula efectora inmunitaria que tiene unido a un antígeno de superficie de la misma, un polipéptido de la invención o un complejo según la invención para su uso en un método de tratamiento o prevención de infección por VHB, cirrosis hepática o carcinoma hepatocelular.

20 Secuencias dadas a conocer en esta solicitud

SEQ ID NO 1
CDR1 de HC de C8
Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Ala

25 SEQ ID NO 2
CDR2 de HC de C8
Ile Ser Gly Ser Gly Ser Thr

30 SEQ ID NO 3
CDR3 de HC de C8
Ala Lys Pro Gly Arg Gln Glu Tyr Gly Ser Ile Tyr Phe Pro Leu Gly Asn

35 SEQ ID NO 4
CDR1 de LC de C8
Asn Ile Gly Ser Lys Ser

40 SEQ ID NO 5
CDR2 de LC de C8
Asp Asp Ser

SEQ ID NO 6
CDR3 de LC de C8
Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp Leu Val Val

45 SEQ ID NO 7
CDR1 de HC de 5F9
Gly Phe Thr Phe Asn Tyr Ala

50 SEQ ID NO 8
CDR2 de HC de 5F9
Ile Asn Ser Asp Gly Arg Ser Thr

55 SEQ ID NO 9
CDR3 de HC de 5F9
Ala Arg Thr Phe Tyr Ala Asp Tyr

60 SEQ ID NO 10
CDR1 de LC de 5F9
Gln Asn Val Asp Thr Thr

SEQ ID NO 11
CDR2 de LC de 5F9
Trp Ala Ser

65 SEQ ID NO 12
CDR3 de LC de 5F9

Gln Gln Tyr Ser Ile Phe Pro Tyr Thr

SEQ ID NO 13
 CDR1 de HC de 5A19
 5 Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Ala

SEQ ID NO 14
 CDR2 de HC de 5A19
 10 Val Ser Ser Asp Gly Ser Tyr Ala

SEQ ID NO 15
 CDR3 de HC de 5A19
 Ala Ser Phe Asn Trp Asp Val Ala Tyr

15 SEQ ID NO 16
 CDR1 de LC de 5A19
 Gln Ser Leu Leu Asn Thr Arg Thr Arg Lys Ser Tyr

20 SEQ ID NO 17
 CDR2 de LC de 5A19
 Trp Ala Ser

25 SEQ ID NO 18
 CDR3 de LC de 5A19
 Lys Gln Ser Tyr Ser Leu Tyr Thr

30 SEQ ID NO 19
 CDR1 de HC de OKT3
 Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr

35 SEQ ID NO 20
 CDR2 de HC de OKT3
 Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr

40 SEQ ID NO 21
 CDR3 de HC de OKT3
 Ala Arg Tyr Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr

45 SEQ ID NO 22
 CDR1 de LC de OKT3
 Ser Ser Val Ser Tyr

50 SEQ ID NO 23
 CDR2 de LC de OKT3
 Asp Thr Ser

55 SEQ ID NO 24
 CDR3 de LC de OKT3
 Gln Trp Ser Asn Pro Phe Thr

60 SEQ ID NO 25
 CDR1 de HC de 9.3
 Gly Phe Ser Leu Ser Asp Tyr Gly

65 SEQ ID NO 26
 CDR2 de HC de 9.3
 Ile Trp Ala Gly Thr

SEQ ID NO 27
 CDR3 de HC de 9.3
 Ala Arg Asp Lys Gly Tyr Ser Tyr Ser Met Asp Tyr

SEQ ID NO 28
 CDR1 de LC de 9.3
 Glu Ser Val Glu Tyr Tyr Val Thr Ser Leu

ES 2 773 306 T3

SEQ ID NO 29
CDR2 de LC de 9.3
Ala Ala Ser

5 SEQ ID NO 30
CDR3 de LC de 9.3
Gln Ser Arg Lys Val Pro Tyr Thr

10 SEQ ID NO 31
CDR1 de HC de A9
Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp

15 SEQ ID NO 32
CDR2 de HC de A9
Ile Tyr Pro Gly Tyr Thr

20 SEQ ID NO 33
CDR3 de HC de A9
Ala Arg Ser Ala Ser Trp Tyr Phe Asp Val

SEQ ID NO 34
CDR1 de LC de A9
Thr Gly Thr Val Thr Ser Asn Tyr

25 SEQ ID NO 35
CDR2 de LC de A9
His Thr Asn

30 SEQ ID NO 36
CDR3 de LC de A9
Ala Leu Trp Tyr Asn Asn His Trp Val

35 SEQ ID NO 37
CDR1 de HC de NCAM29.2
Gly Phe Thr Phe Ser Phe Gly

40 SEQ ID NO 38
CDR2 de HC de NCAM29.2
Ile Ser Ser Gly Ser Tyr Ala Ile

SEQ ID NO 39
CDR3 de HC de NCAM29.2
Val Arg Gly Arg Leu Gly Glu Gly Tyr Ala Met Asp Tyr

45 SEQ ID NO 40
CDR1 de LC de NCAM29.2
Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr

50 SEQ ID NO 41
CDR2 de LC de NCAM29.2
Trp Ala Ser

55 SEQ ID NO 42
CDR3 de LC de NCAM29.2
Gln Tyr Ser Trp Thr

SEQ ID NO 43

C8-hlgG1Fc_{mut}-OKT3

MDFEVQIFSFLLISASVIMSRMAEVQLVESGGGLLQPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVRQA
PGKGLEWVSSISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTALYYCAKPPGRQ
EYYGSSIIYFPLGNWGQGTLLVTVSSASTKGPKEEGEFSEARVQSALTQPASVSVAPGQTARI
TCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLVVDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEA
DYQCQVWDSDDL~~VV~~FGGGTKLTVLGN~~SGGGGSGGGGSGGGG~~SASEPKS**SDKTHTCPPCPAP**P****
AAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN

STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNK**GLASS**IEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKDPGWSHPQFEKSRGGGQVQLQQSGAELARPGASVKMSC
KASGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSS
LTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSGN~~SGGGGSGGGGSGGGG~~SASQIVLTQSPA
IMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLAGVPAHFRGSGSGTSYSL
TISGMEAEDAATYYCQWSSNPFTFGSGTKLEINGNS

SEQ ID NO 44

C8- hlgG1Fc_{mut}-9.3

MDFEVQIFSFLLISASVIMSRMAEVQLVESGGGLLQPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVRQA
PGKGLEWVSSISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTALYYCAKPPGRQ
EYYGSSIIYFPLGNWGQGTLLVTVSSASTKGPKEEGEFSEARVQSALTQPASVSVAPGQTARI
TCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLVVDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEA
DYQCQVWDSDDL~~VV~~FGGGTKLTVLGN~~SGGGGSGGGGSGGGG~~SASEPKS**SDKTHTCPPCPAP**P****
AAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNK**GLASS**IEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKDPGWSHPQFEKSSGGGQVQLQESGPGLVTPSQSLSITC
TVSGFSLSDYGVHWVRQSPGQGLEWLGVIWAGGGTNYNALMSRKSISKDNSKQVFLKMNSL
QADDTAVYYCARDKGYSYYYSM~~MD~~YWGQGTTVTVSSRGGGSGGGGSGGGGSDIELTQSPASLAV
SLGQRATISCRASESVEYYVTSLMQWYQQKPGQPPKLLIF**AAS**NVESGVPARFSGSGSGTNFS
LNIHPVDEDDVAMYFCQQRKVPYTFGGGTKLEIKR

SEQ ID NO 45

C8- hlgG1Fc_{mut}-A9

MDFEVQIFSFLLISASVIMSRMAEVQLVESGGGLLQPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVRQA
PGKGLEWVSSISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTALYYCAKPPGRQ
EYYGSSIIYFPLGNWGQTLVTVSSASTKGPKEEGEFSEARVQSALTQPASVSVAPGQTARI
TCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLVVDSDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEA
DYICQVWDSSSDLVVFGGGTKLTVLGNSSGGGSGGGGSGGGGSASEPKS**SDK**THTC**PPCPAP****P**
AAGPSVFLFPPKPKD**TLMI**SRTP**EV**TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNK**GLASS**IEKTI**SKAKG**QPREPQVYTLPPSRDELTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK**TPPV**LDSG**SFFLY**SKLTVDKSRWQQGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**DPGWSHPQFEK**SRGGGQVQLQQSGAELVLRPGTSVKIS**C**
KASGY**TF**TNYWLGWVKQRP**GHGLEW**IGDI**Y**PGGGY**T**NYNEK**FKG**KATVTADTSSRTAYVQVRS
LTSEDSAVYFCARSASWYFDVWGAGTTVTVSSGNSSGGGSGGGGSGGGG**SASQ**AVVTQESALT
TSPGETVTLT**CRSNTG**TVTTSNYANWVQEKPDHLFTGL**I**GH**TNNR**APGVPARFSGSLIGDKAA

LTITGAQTEDEAIYFCALWYNNHWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO 46

C8- hlgG1Fc_{mut}-NCAM29.2

MDFEVQIFSFLLISASVIMSRMAEVQLVESGGGLLQPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVRQA
PGKGLEWVSSISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTALYYCAKPPGRQ
EYYGSSIIYFPLGNWGQTLVTVSSASTKGPKEEGEFSEARVQSALTQPASVSVAPGQTARI
TCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLVVDSDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEA
DYICQVWDSSSDLVVFGGGTKLTVLGNSSGGGSGGGGSGGGGSASEPKS**SDK**THTC**PPCPAP****P**
AAGPSVFLFPPKPKD**TLMI**SRTP**EV**TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNK**GLASS**IEKTI**SKAKG**QPREPQVYTLPPSRDELTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK**TPPV**LDSG**SFFLY**SKLTVDKSRWQQGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**DPGWSHPQFEK**SSGGDVQLVESGGGLVQPGGSRKLS**CA**
ASG**FTFSS**FGMHVVRQAPEKGLEWVAYI**SSGSYAI**YYADTVKGRFTISRDN**PENTL**FLQMTSL
RSEDSAMY**Y**CVRGRRLGEGY**AMDY**WGQTSVTVSSGNSSGGGSGGGGSGGGG**SASD**IVMSQSP
SSLAVSVGEKVTMSCKSSQ**SLLYSSNOKNYLAWY**QQKPGQSPKLLI**YWASTR**KSGVPDRFTGS
GSGTDFTLT**ISSVKAEDLAVYYCQ**QYSSW**TF**FGGGTKLEIKR

SEQ ID NO 47

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

SEQ ID NO 48

Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Glu Glu Gly Glu Phe Ser Glu Ala Arg Val

SEQ ID NO 49

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

Las figuras ilustran la invención.

Figura 1:

Se obtienen fragmentos scFv mediante fusión de dos dominios variables. La fusión implica el uso de un ligante peptídico flexible que no interfiere o sustancialmente no lo hace con la estructura de cada dominio variable.

Figura 2:

Dimerización de dos polipéptidos de la invención mediante la formación de enlaces disulfuro. Cada polipéptido comprende un anticuerpo bivalente biespecífico. La dimerización natural de anticuerpos en el retículo endoplasmático de las células productoras puede dar como resultado la formación de un anticuerpo tetravalente biespecífico, o un anticuerpo tetravalente tri o tetraespecífico si dos anticuerpos bivalentes biespecíficos se coexpresan (no se muestra).

Figura 3:

Comparación de la eliminación específica de células diana de hepatoma productoras de antígeno de superficie de VHB después de la administración de anticuerpos biespecíficos únicos y los efectos sinérgicos de la administración simultánea de dos anticuerpos biespecíficos específicos de CTL o dos específicos de células NK. Se usa el ensayo de viabilidad celular CellTiter-Blue.

Figura 4:

A) Secreción de citocinas como una indicación de activación de células efectoras inmunitarias en presencia de anticuerpos biespecíficos de la presente invención. Las células HepaRG infectadas por VHB se cocultivaron con PBMC en presencia o ausencia de anticuerpos biespecíficos indicados.

B) Eliminación específica de células diana infectadas por VHB en cocultivo con células efectoras inmunitarias y anticuerpos biespecíficos.

Figura 5:

Viabilidad de células diana cocultivadas con PBMC en presencia de anticuerpos biespecíficos reactivos con HBs individuales. Los anticuerpos biespecíficos únicos median en la lisis de células diana. A, C, E: Efecto de la estimulación con α HBs x α CD3 (A), α HBs x α CD28 (C) o resumen de ambos (E). B, D, F: Efecto de la estimulación con α HBs x α CD3 [Fc Δ ADCC] (B), α HBs x α CD28 [Fc Δ ADCC] (D) o resumen de ambos (F). La punta de flecha indica la adición de PBMC y anticuerpos biespecíficos. Las curvas con puntos representan células HuH7-S transfectadas con HBs, las curvas con rombos representan células de hepatoma parental HuH7. Se usa el ensayo de citotoxicidad en tiempo real xCELLigence. Tiempo de normalización del índice celular: 0 h.

Figura 6:

Viabilidad de células diana cocultivadas con PBMC en presencia de anticuerpos biespecíficos reactivos con HBs. La combinación de anticuerpos biespecíficos median en la destrucción masiva de células diana. A: Efecto de la estimulación con α HBs x α CD3 y α HBs x α CD28. B: Efecto de la estimulación con α HBs x α CD3 [Fc Δ ADCC] y α HBs x α CD28 [Fc Δ ADCC]. C, D: Efecto de los anticuerpos biespecíficos individuales en comparación con las combinaciones. La punta de flecha indica la adición de PBMC y anticuerpos biespecíficos. Las curvas con puntos representan células HuH7-S, las curvas con rombos células HuH7. Tiempo de normalización del índice celular: 0 h.

Figura 7:

Viabilidad de células diana cocultivadas con PBMC en presencia de diferentes concentraciones de anticuerpos biespecíficos. Mezclas de 50 μ l/50 μ l de sobrenadantes que contienen anticuerpos de α HBs x α CD3/ α HBs x α CD28 (A), o α HBs x α CD3 [Fc Δ ADCC]/ α HBs x α CD28 [Fc Δ ADCC] (B), indujeron la lisis de células diana antes que las mezclas de 25 μ l/25 μ l, lo que indica efectos dependientes de la dosis. La punta de flecha indica la adición de PBMC y anticuerpos biespecíficos. Las curvas con puntos representan células HuH7-S, las curvas con rombos células HuH7. Tiempo de normalización del índice celular: 0 h.

Figura 8:

Viabilidad de células diana cocultivadas con diferentes cantidades de PBMC en presencia de una mezcla de α HBs x α CD3 y α HBs x α CD28. 2×10^5 PBMC median en una eliminación significativamente más temprana de células HuH7-S que 1×10^5 PBMC. La punta de flecha indica la adición de PBMC y anticuerpos biespecíficos. Las curvas con puntos representan células HuH7-S, las curvas con rombos células HuH7. Tiempo de normalización del índice celular: 0 h.

Figura 9:

Viabilidad de células diana cocultivadas con PBMC en presencia de mezclas de α HBs x α CD3/ α HBs x α CD28 durante diversos periodos de tiempo. Se retiraron los sobrenadantes que contenían anticuerpos biespecíficos después de los periodos de estimulación indicados. La estimulación durante 4 h sólo condujo a una pequeña disminución de la viabilidad de células diana (el 78,5% de viabilidad de punto final). La estimulación de PBMC con

anticuerpos biespecíficos durante 8 horas o más indujo la eliminación de las células diana. Después de la estimulación durante 8 h y 12 h, se retrasó la destrucción de células diana en comparación con la estimulación durante 24 h o 48 h, lo que sugiere la activación continua y el redireccionamiento de las células efectoras. Sin embargo, las viabilidades del punto final de HuH7-S a las 48 h fueron comparables: estim. durante 8 h: el 14,7%; estim. durante 12 h: el 11,7%, estim. durante 24 h: el 5,1%, estim. durante 48 h: el 3,2%). La punta de flecha indica la adición de PBMC y constructos biespecíficos. Se muestran las cinéticas de viabilidad para las células HuH7-S. Tiempo de normalización del índice celular: 0 h.

Figura 10:

Secreción de IL-2, IFN- γ y TNF- α de PBMC después del cocultivo con células HuH7-S/HuH7 en presencia de α HBs x α CD3/ α HBs x α CD28 en diferentes puntos de tiempo. A: La concentración de IL-2 aumentó con el tiempo y alcanzó una meseta aproximadamente a las 24 h con una concentración de aproximadamente 1550 pg/ml. B: La secreción de IFN- γ comenzó entre 8 h y 12 h y aumentó hasta 12000 pg/ml (48 h). C: La producción de TNF- α ya era detectable después de 4 h, aumentó continuamente, alcanzó su máximo a las 24 h (1700 pg/ml) y disminuyó hasta 1400 pg/ml después de 48 h. Pudo detectarse una alta secreción de TNF- α de fondo en ausencia de HBs (células HuH7), y disminuyendo la mayor concentración después de 4 h (~70 pg/ml) hasta 9 pg/ml después de 48 h de cocultivo.

Figura 11:

Tinciones de LAMP-1 después del cocultivo de PBMC con células HuH7-S/HuH7 en presencia de anticuerpos biespecíficos. Se detecta la expresión en superficie del marcador de degranulación endosómico LAMP-1 en células T CD4⁺ (A, B) y CD8⁺ (C, D) después del cocultivo con células HuH7-S (línea negra) o HuH7 (línea gris) en presencia de α HBs x α CD3/ α HBs x α CD28 (A, C) o α HBs x α CD3 [Fc Δ ADCC]/ α HBs x α CD28 [Fc Δ ADCC] (B, D)

Figura 12:

Análisis mediante FACS de PBMC cocultivadas con células HuH7-S o HuH7 en presencia de α HBs x α CD3/ α HBs x α CD28 después de 8 h, 12 h y 24 h. A, B; Porcentajes de células T IFN γ ⁺/IL-2⁺/TNF α ⁺/CD154⁺ CD4⁺ (A) o células T IFN γ ⁺/IL-2⁺/TNF α ⁺/CD154⁺ CD8⁺ (B). C, D: Puertas combinadas booleanas de células T IFN γ ⁺, IL-2⁺ y/o TNF α ⁺ CD4⁺ (C) o IFN γ ⁺, IL-2⁺ y/o TNF α ⁺ CD8⁺ (D).

Figura 13:

Análisis mediante FACS de PBMC cocultivadas con HBsAg inmovilizado o soluble en presencia de α HBs x α CD3 [Fc Δ ADCC]/ α HBs x α CD28 [Fc Δ ADCC] después de 24 h y 48 h. A, B; Porcentajes de células T IFN γ ⁺/IL-2⁺/TNF α ⁺/CD154⁺ CD4⁺ (A) o células T IFN γ ⁺/IL-2⁺/TNF α ⁺/CD154⁺ CD8⁺ (B). C, D: Puertas combinadas booleanas de células T IFN γ ⁺, IL-2⁺ y/o TNF α ⁺ CD4⁺ (C) o IFN γ ⁺, IL-2⁺ y/o TNF α ⁺ CD8⁺ (D).

Figura 14:

HBsAg en el sobrenadante de células HuH7-S (110.8 S/CO), células HepG2.2.15 (41.7 S/CO) y células HepaRG infectadas por VHB (16.5 S/CO).

Figura 15:

Viabilidad de células HepaRG infectadas/no infectadas por VHB cocultivadas con PBMC en presencia de anticuerpos biespecíficos. α HBs x α CD3 (A) y α HBs x α CD3/ α HBs x α CD28 (B) median en una lisis significativa de células diana. Las viabilidades de punto final de las células no tratadas son del 65,9% (VHB+) y el 62,9% (VHB-). La punta de flecha indica la adición de PBMC y constructos biespecíficos. Las curvas con puntos representan células HepaRG infectadas por VHB, las curvas con rombos células HepaRG no infectadas. Tiempo de normalización del índice celular en el ensayo xCELLigence: 0 h.

Figura 16:

Reducción del tamaño tumoral en animales tratados con anticuerpos biespecíficos. Los ratones que portaban tumores HepG2.2.15 subcutáneos positivos para VHB se trataron con PBMC humanas y una mezcla de anticuerpos biespecíficos α HBs x α CD3 y α HBs x α CD28 en cuatro días consecutivos. Se sacrificaron los ratones y se analizó el tamaño tumoral.

Los ejemplos ilustran la invención.

Ejemplo 1

Materiales y métodos para el ejemplo 2

Clonación y producción de anticuerpos biespecíficos

Se obtuvieron ADN complementarios que codificaban para cadenas pesadas variables y ligeras variables de anticuerpos anti-CD3 (OKT3), anti-CD28 (9.3), anti-CD16 (A9) y anti-CD56 (NCAM29.2) mediante amplificación por PCR de ARNm sometidos a transcripción inversa a partir del hibridoma respectivo usando un conjunto de cebadores que cubren todos los subtipos de V_H y V_K/V_L. Se ligaron los productos de PCR en pCR2.1-TOPO (Invitrogen, Life

Technologies) y se secuenciaron. Se proporcionó el scFv anti-HBsAg C8 en una forma con codones optimizados en el plásmido pMP71-C8. Usando cebadores que contenían sitios de restricción apropiados en los flancos 5' y 3', se ensamblaron ADNc de cadenas pesadas variables y ligeras variables que codificaban para los anticuerpos mencionados anteriormente con un ligante de glicina-serina en scFv. Se clonaron los scFvs OKT3, 9.3, A9 y NCAM29.2 (extendido de manera N-terminal mediante (Gly)₃₋₄) en el extremo 3' de un ADNc presente en pBluescript KS II + (Stratagene) que codifica para el dominio Fc (región bisagra, CH2, CH3) de IgG1 humana que se extendió mediante el ligante de glicina-serina GlyAsnSer(Gly₄Ser)₃AlaSer en el extremo 5' y una secuencia de StrepTag (WSHPQFEK) y, en una segunda serie de constructos, un ligante adicional de glicina-serina (Gly₄Ser)₃ en el extremo 3'. Se clonó la secuencia codificante del scFv C8 en el extremo 5' del ligante en 5' de glicina-serina mencionado. Se subclonó la secuencia completa scFv-ligante-hlgG1Fc-ligante-scFv en el vector de expresión de mamífero pcDNA3.1(-) (Invitrogen). Se usó ADN de plásmido Maxi-prep para la transfección de células HEK293 usando el reactivo de transfección pepFECT (Peqlab). Se seleccionaron transfectantes estables usando G418 0,8-1,0 mg/ml y se expandieron. Se recogieron los sobrenadantes de los transfectantes HEK y se analizaron mediante ELISA para determinar la concentración de anticuerpos biespecíficos secretados y mediante inmunotransferencia de tipo Western para determinar la integridad de los anticuerpos secretados usando anticuerpos de cabra anti-IgG humana específicos de Fc, marcados con peroxidasa.

Condiciones de cultivo celular e infección por VHB

Se mantuvieron células de hepatoma HuH7 (Nakabayashi *et al.* 1982. Growth of human hepatoma cell lines with differentiated functions in chemically defined medium. Cancer Res. 42: 3858-3863) y células HEK293 en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con suero bovino fetal (FBS) al 10%, penicilina (100 U/ml), estreptomycin (100 µg/ml) y L-glutamina (2 mmol/l) (todos de GIBCO, Life Technologies).

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) mediante centrifugación en gradiente de densidad de sangre completa heparinizada usando medio de separación de linfocitos LSM 1077 (PAA). Se colocaron capas de 25 ml de sangre por encima de 13 ml de LSM 1077. Después de centrifugación a 2000 rpm durante 20 min (sin interrupción) a temperatura ambiente, se recogieron PBMC y se cultivaron en medio RPMI 1640 complementado con suero bovino fetal (FBS) al 10%, penicilina (100 U/ml), estreptomycin (100 µg/ml) y L-glutamina (2 mmol/l) (todos de GIBCO). Después de una etapa de reposo durante la noche, se usaron PBMC o células NK clasificadas para experimentos de cocultivo.

Se mantuvieron células HepaRG en medio E de Williams (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Alemania) complementado con L-glutamina (5 mmol/l), glucosa (al 0,06% [peso/vol.]), HEPES (23 mmol/l, pH 7,4), gentamicina (50 µg/ml), penicilina (50 I U/ml), estreptomycin (50 µg/ml), inosina (37 µmol/l), hidrocortisona (4,8 µg/ml) e insulina (1 µg/ml). Antes de la infección, se diferenciaron las células HepaRG durante 4 semanas usando un medio de diferenciación (medio E de Williams (tal como se describió anteriormente), complementado con DMSO (al 1,75%). Se infectaron las células HepaRG usando reservas de VHB a una moi final de 200 y PEG (al 5%) en medio de diferenciación. Se retiró el inóculo de infección después de la incubación durante la noche y se reemplazó por medio de diferenciación y se cultivó durante 6 días. Para los cocultivos con células T redirigidas, se cambió de medio de diferenciación a medio libre de hidrocortisona 2 días antes de comenzar el cocultivo para evitar la inmunosupresión mediada por la hidrocortisona.

Transfección con plásmidos que codifican para antígenos de superficie de VHB

Se transfectaron células HuH-7 con plásmidos que codifican para los diversos antígenos de superficie usando el reactivo de transfección FuGene (Promega). Para 8 pocillos de una placa de 96 pocillos, se añadieron 3 µl de FuGENE, 1 µg de ADN de plásmido a 100 µl de OptiMEM (Gibco). Se incubó la disolución de transfección durante 15 min a temperatura ambiente para que el FuGENE se uniera al ADN de plásmido. Se aplicó un volumen final de 100 µl por pocillo, después de añadir OptiMEM adicional y se incubó durante al menos 24 h.

Clasificación de células activadas magnéticamente (MACS) de células NK

Se aislaron células NK de PBMC usando un kit de aislamiento de células NK CD56⁺CD16⁺ humanas (Miltenyi). En una primera etapa de selección negativa, se retiraron todas las células distintas de NK mediante anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos no expresados en la superficie de las células NK. En una segunda etapa de selección positiva, se aislaron las células NK mediante anticuerpos monoclonales CD16 conjugados con micropérlas de óxido de hierro y se retuvieron dentro de un campo magnético. Después del aislamiento, se cultivaron las células NK en medio RPMI-1640 tal como se describió anteriormente.

Cocultivo de células diana positivas para VHB y células efectoras redirigidas

Se cultivaron células diana en una placa de 96 pocillos a confluencia completa. Se añadieron 1x10⁵ células efectoras en un volumen de 100 µl de medio por pocillo. Se aplicaron 100 µl de los sobrenadantes HEK que contenían los anticuerpos biespecíficos por pocillo. Para la determinación de efectos sinérgicos, se añadieron 50 µl de cada

sobrenadante de anticuerpo biespecífico por pocillo. Las células diana no tratadas incubadas con 200 µl de medio o con células efectoras solas o con anticuerpos biespecíficos solos sirvieron como control negativo.

Ensayo de inmunosorción ligado a enzimas (ELISA) para la activación de células efectoras

5 La secreción de citocinas resultante de la activación de las células efectoras se detectó mediante ELISA. Usando el ensayo ELISA MAX™ para IFN-γ humano (BioLegend). Se detectó la absorbancia a 450 nm usando el programa Magellan6 y un lector InfiniteF200 (Tecan).

10 *Ensayo de viabilidad de células diana*

Se determinó la viabilidad de células diana después del cocultivo usando el ensayo de viabilidad celular CellTiter-Blue (Promega). Este ensayo se basa en la capacidad de las células vivas para convertir un colorante redox (resazurina) en un producto final fluorescente (resorufina) debido a actividad metabólica. Las células no viables pierden rápidamente su capacidad metabólica y, por tanto, no generan una señal fluorescente. Después de la retirada del sobrenadante, se añadieron 100 µl de DMEM incoloro que contenía reactivo CellTiter-Blue al 20% por pocillo a los cocultivos y se incubaron a 37°C durante 2 horas. Se registró la señal de fluorescencia a 560 nm usando un lector InfiniteF200 (Tecan).

20 Ejemplo 2

Resultados

25 En una primera línea de experimentos, se ha evaluado la actividad de los constructos de anticuerpos biespecíficos dirigidos contra los antígenos de superficie de CTL, CD3 y CD28, y contra los antígenos de superficie de células NK, CD16 y CD56. Se emplearon líneas celulares de hepatoma transfectadas con plásmido que producen antígenos de superficie de VHB. Después de establecer la expresión de la proteína de VHB, se cultivaron estas células diana junto con células efectoras inmunitarias, concretamente PBMC y células NK aisladas, y constructos de anticuerpos biespecíficos. Las PBMC contienen alrededor del 70% de células T pero sólo el 7% de células NK. Por tanto, se aislaron magnéticamente células NK CD16⁺ CD56⁺. Como controles negativos, se analizaron cocultivos con células diana negativas para VHB, que se habían incubado previamente con sobrenadantes que contenían partículas de VHB y subvirales. Este control se empleó para descartar la activación de células efectoras debido a la unión inespecífica de las partículas de VHB en la superficie de las células diana negativas para VHB. Además, se cocultivaron células diana positivas para VHB con células efectoras inmunitarias en ausencia de constructos biespecíficos para evaluar la citotoxicidad de fondo inespecífica. Para excluir un efecto citotóxico de los constructos biespecíficos, se prepararon cultivos de células diana positivas para VHB sin células efectoras inmunitarias en presencia de constructos biespecíficos.

40 Estos experimentos mostraron una activación específica de CTL tras el cocultivo en presencia de los constructos específicos de CD3 o CD28 según se determinó mediante la secreción de la citocina proinflamatoria interferón-gamma (IFN-γ) de hasta 7000 pg/ml. Este efecto se mejoró adicionalmente tras la coadministración de constructos específicos de CD3 y CD28 que demuestran un efecto sinérgico.

45 Además, los constructos biespecíficos median en una eliminación citotóxica específica de las líneas celulares de hepatoma HuH7 productoras de HBsAg (figura 3) de reducciones de hasta el 90% de la viabilidad de células diana en comparación con los controles. Esta respuesta citotóxica se observó para cocultivos de células diana positivas para VHB y PBMC junto con los constructos biespecíficos dirigidos contra CD3 y CD28, así como para células NK aisladas con constructos dirigidos contra CD16 y CD56. La coadministración de constructos específicos de células NK y CTL aumentó adicionalmente el efecto citotóxico de manera sinérgica hasta tasas de eliminación superiores al 95%. Se observó una citotoxicidad de fondo inespecífica del 15% al 40% para las células NK y CTL, respectivamente.

55 En una segunda tanda de experimentos, se emplearon células de hepatoma HepaRG infectadas por VHB. Esta línea celular permite la infección por VHB después de una diferenciación de cuatro semanas y refleja la situación natural de tejidos infectados por VHB. Normalmente, las tasas de infección de las células HepaRG nunca alcanzan el 100% y esta mezcla de células infectadas y no infectadas imita la situación en un individuo infectado por VHB sometido a terapia antiviral, que alberga tanto células infectadas como no infectadas en presencia de partículas virales extracelulares libres.

60 En cocultivos de células efectoras inmunitarias y constructos biespecíficos coadministrados, las células HepaRG infectadas por VHB mediaron en una activación eficiente de ambas células, CTL y NK, con cantidades impresionantes de secreción de IFN-γ de hasta 60.000 pg/ml (figura 4A). En este experimento no se aislaron ni enriquecieron células NK antes del cocultivo.

65 Además, los constructos de anticuerpos biespecíficos dieron como resultado una respuesta citotóxica de las células

efectoras inmunitarias activadas que conduce a la eliminación específica de células diana infectadas por VHB (figura 4B). Se observaron tasas de eliminación del 50% al 70% para células NK y CTL, respectivamente. La citotoxicidad de fondo inespecífica estuvo ausente en estos experimentos.

5 Ejemplo 3

Métodos para el ejemplo 4

10 Para analizar el potencial terapéutico de los constructos de anticuerpos biespecíficos para redireccionar con éxito las células T hacia células positivas para VHB, se realizaron experimentos de cocultivo *in vitro* y se analizaron en detalle. Se emplearon constructos de anticuerpos biespecíficos que contenían dominios de unión de cadena sencilla dirigidos contra CD3 humano (α CD3) y CD28 humano (α CD28) y, adicionalmente, constructos que contenían mutaciones dirigidas en su dominio espaciador de Fc que deberían suprimir la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (Δ ADCC), sorteando la unión al receptor de Fc γ . Estos se construyeron como una medida de seguridad para descartar la activación inespecífica de linfocitos citolíticos naturales. Por otro lado, todos los constructos de anticuerpos biespecíficos albergaban el dominio de unión específica a proteína S (HBsAg) de VHB, C8. Se cocultivaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) aisladas de sangre venosa fresca de donantes sanos con diferentes líneas celulares de hepatoma humano como modelos sustitutos para la infección por VHB. Se emplearon HuH7-S (antígeno S de VHB transgénico) y, como control negativo, la línea celular madre HuH7 e infectada por VHB o como control células HepaRG no infectadas. Se usaron células HepG2.2.15 (transgénicas del genoma de VHB) como controles para la cuantificación de marcador de VHB. Para proporcionar constructos de anticuerpos biespecíficos, se añadió sobrenadante de líneas celulares productoras que contenían anticuerpos biespecíficos. Para visualizar los cambios en la viabilidad de células diana debido a citotoxicidad mediada por anticuerpos biespecíficos a lo largo del tiempo, se empleó el sistema xCELLigence. Esta técnica permite la monitorización en tiempo real de la viabilidad celular a lo largo de cultivos prolongados. Por tanto, se sembraron células de hepatoma diana en placas de microtitulación diseñadas especialmente, que contenían microelectrodos de oro interdigitados para monitorizar de manera no invasiva la viabilidad de células diana adherentes usando la impedancia eléctrica como lectura. La eliminación citotóxica da como resultado un cambio de la impedancia, que se puede convertir en el denominado valor del índice celular (IC), que se usa para monitorizar la viabilidad celular.

30 *Cocultivo con células diana*

En el día cero, se sembraron 3×10^4 células HuH7-S/HuH7 por pocillo en una placa de 96 pocillos (placa E-Plate 96). En el día 1, se retiró el sobrenadante y se añadieron 1×10^5 PBMC humanas primarias en 100 μ l de medio PBMC o sólo 100 μ l de medio para controles a los pocillos respectivos. Además, se añadieron 100 μ l de sobrenadante que contenía anticuerpos biespecíficos, individualmente o en combinaciones. Como control negativo, se añadieron 100 μ l de medio DMEM a los pocillos, dando como resultado un volumen total de 200 μ l. Se monitorizaron los cocultivos durante 48 h o 72 h en el sistema xCELLigence.

40 Se hicieron crecer células HepaRG hasta confluencia, se diferenciaron durante 21 días y se infectaron con VHB antes de los experimentos inmunoterapéuticos.

Para la infección de células HepaRG, se preparó una reserva de virus en medio de diferenciación que contenía PEG y se añadieron 50 μ l por pocillo. La concentración final de PEG era del 5% y la MOI de la reserva de virus se estableció en 200 ($7,5 \times 10^6$ partículas virales/pocillo). 16 h después de la adición de la mezcla maestra de infección, se lavaron las células 3 veces con PBS para retirar el virus residual. Se añadió medio de diferenciación, y se cambió el medio cada 3 días durante un total de 12 días. Antes de los experimentos de cocultivo, se cambió el medio a medio de cocultivo (agotado de la hidrocortisona inmunosupresora). Se sometió a prueba la infección por VHB satisfactoria de células HepaRG midiendo HBsAg (AxSYM) y HBeAg (sistema BEP III) en el sobrenadante de las células infectadas.

50 *Preparación de PBMC*

Se aislaron PBMC para experimentos de cocultivo de sangre completa. Se diluyó sangre fresca heparinizada 1:1 con medio de lavado RPMI. Se colocaron en capas 25 ml de sangre diluida sobre 15 ml de Percoll y se centrifugó a 960 g durante 20 min sin romperse en una centrifuga extraíble. Se aislaron las PBMC y se transfirieron a 50 ml con medio RPMI. Después del lavado, se resuspendieron las células en 10 ml de medio PBMC y se determinó el número de células. Se ajustó la concentración a 2×10^6 células/ml para garantizar condiciones óptimas. Se dejaron en reposo las PBMC durante la noche a 37°C.

60 *Clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS)*

Para examinar las funciones efectoras de las PBMC redirigidas, se realizó un análisis mediante FACS. De ese modo, se analizaron la secreción de las citocinas proinflamatorias IFN- γ , IL-2 y TNF- α , así como la expresión del marcador de activación CD154 (CD40L) y el marcador de degranulación LAMP-1 (CD107a), respectivamente. Se

realizó la medición de la producción de citocinas mediante tinción de citocina intracelular. Por tanto, se aplicaron 0,2 µg/ml de brefeldina A (BFA) a las células y se incubaron durante 4 horas a 37°C.

5 La BFA bloquea el transporte directo entre el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi y, como consecuencia, se inhibe la exocitosis de las citocinas. En el caso de tinción simultánea para LAMP-1, se aplicó el anticuerpo 1 h antes de añadir BFA (para permitir la translocación de LAMP-1 a la superficie celular). Posteriormente, se transfirieron las células a una placa de 96 pocillos (fondo redondo) y se lavaron dos veces en 200 µl de tampón de FACS. Para la tinción de células viables y la exclusión de células muertas, se usó el kit de tinción de células muertas de IR cercano fijable LIVE/DEAD. Para la fijación y la permeabilización, se resuspendieron las células en 100 µl de reactivo Cytofix/Cytoperm y se incubaron en hielo en la oscuridad durante 20 min. Después del lavado, se resuspendieron las células en la mezcla de anticuerpos preparada o sólo se tiñeron con los colores individuales respectivos para una compensación sistemática. La tinción tuvo lugar en hielo en la oscuridad durante 30 min. Después del lavado, se resuspendieron las células en 200 µl de tampón de FACS y se transfirieron a tubos de FACS para la adquisición. Se realizó la adquisición usando un citómetro FACSCanto II o LSR Fortessa. Se usó el software FACS Diva para registrar datos, se realizó el análisis con el software FlowJo.

Experimentos con animales

20 Para una primera prueba de constructos biespecíficos *in vivo*, se realizaron experimentos con ratones Rag2/IL2R γ null inmunodeficientes (nomenclatura internacional: B10; B6-Rag2tm1Fwa Il2rgtm1Wjl). Se les inyectó a ratones de 6 semanas de edad 5x10⁶ células de la línea celular de hepatoma humano transgénico para VHB HepG2.2.15. Se inyectaron las células por vía subcutánea en el flanco de los animales. Esto dio lugar a la formación de tumores a lo largo de un periodo de tiempo de 14 días. Se monitorizó la replicación de VHB en el interior del tumor a través de la determinación de la viremia de VHB. Se aislaron PBMC humanas de sangre de cordón umbilical humana fresca y se estimularon en placas recubiertas previamente con anticuerpos contra CD3 y CD28 humanos a una concentración celular de 0,25x10⁶ PBMC por ml durante 3 días. Posteriormente, se mantuvieron las células en medio de cultivo celular que contenía 300 U/ml de IL-2 durante 7 días.

30 El día 14 después de la inducción de tumores, se les inyectó a los ratones 2x10⁷ PBMC por ratón por vía intraperitoneal y recibieron 100 µl de constructos de anticuerpos biespecíficos α CD3/ α CD28 en el sobrenadante de células productoras HEK en la vena de la cola por animal durante cuatro días consecutivos. Se sacrificaron los ratones el día 18 después de la inducción de tumores y se analizaron para determinar el tamaño tumoral. Posteriormente, se almacenaron muestras de suero y tejido para análisis adicionales.

35 Ejemplo 4

Los anticuerpos biespecíficos median en la eliminación específica de células diana que expresan la proteína de superficie de VHB (HuH7-S)

40 Para examinar si los constructos de anticuerpos biespecíficos redireccionan satisfactoriamente células T hacia células diana que expresan HBsAg e inducen la lisis de células diana, se cocultivaron PBMC aisladas con células HuH7-S en presencia de constructos de anticuerpos biespecíficos. Se transfectaron de manera estable células HuH7-S para expresar HBsAg y, por tanto, imitaban a hepatocitos infectados por VHB. Esto da como resultado la producción y secreción de partículas subvirales en el sobrenadante y la incorporación de HBsAg en la membrana celular. Las células HuH7 no transfectadas sirvieron como control negativo.

Los anticuerpos biespecíficos individuales provocan la destrucción de células diana

50 Para analizar si los anticuerpos biespecíficos individuales pueden estimular la activación de células T y mediar en la lisis de células diana, se cocultivaron PBMC con células HuH7-S/HuH7 en presencia de anticuerpos tetravalentes biespecíficos α HBs x α CD3, α HBs x α CD28, α HBs x α CD3 [Fc Δ ADCC] o α HBs x α CD28 [Fc Δ ADCC]. La estimulación de las células efectoras por los anticuerpos biespecíficos individuales dio como resultado la destrucción específica de las células diana que expresaban HBsAg (figura 5). Los anticuerpos biespecíficos dirigidos contra CD3 mediaron en la eliminación de células diana antes y de manera más fuerte que los constructos dirigidos contra CD28, ya que la viabilidad de punto final de las células HuH7-S tratadas con α CD3 sólo representaba el 6,4% (α CD3 Δ ADCC: el 15,5%) en comparación con el 44,42% para α CD28 (α CD28 Δ ADCC: el 48,9%). Además, α CD3 Δ ADCC y α CD28 Δ ADCC requirieron más tiempo para inducir la lisis de células diana en comparación con α CD3 y α CD28, respectivamente. La destrucción mediada por α CD3 Δ ADCC comenzó aproximadamente 35 h después de comenzar el cocultivo, mientras que α CD3 condujo a una disminución de la viabilidad de células diana ya después de 12 h. También pudo observarse un cambio temporal de aproximadamente 20 h entre la lisis de células diana mediada por α CD28 Δ ADCC y α CD28. La estimulación con α CD3 también condujo a una lisis detectable de células HuH7 negativas para HBsAg con una viabilidad de punto final del 78,1%, lo que indica una activación inespecífica. Lo mismo fue cierto para la estimulación con α CD3 Δ ADCC en algunos experimentos, aunque no se observe en el presente documento. La viabilidad de las células HuH7 durante el cocultivo en presencia de los otros constructos biespecíficos se mantuvo al 100%.

Estos datos demuestran que la estimulación con cada uno de los anticuerpos biespecíficos individuales provoca la eliminación de células diana sin coestimulación adicional.

Los anticuerpos biespecíficos median en la lisis de células diana de manera sinérgica

5 Para analizar adicionalmente si la combinación de constructos biespecíficos conduce a una actividad mejorada y, por tanto, a la citotoxicidad de las células efectoras, se cocultivaron PBMC con células HuH7-S/HuH7 en presencia de las combinaciones de o bien α CD3/ α CD28 o bien α CD3 Δ ADCC/ α CD28 Δ ADCC. Tal como se muestra en la figura 6, la combinación de constructos biespecíficos condujo a la destrucción masiva de células diana que expresan HBsAg con una viabilidad restante del 1,2% (α CD3/ α CD28) y el 4,4% (α CD3 Δ ADCC/ α CD28 Δ ADCC), mientras que casi no se eliminaron células HuH7 (viabilidad de punto final de las células HuH7: α CD3/ α CD28: el 92,4%; α CD3 Δ ADCC/ α CD28 Δ ADCC: el 100,4%).

15 De nuevo, la lisis mediada por α CD3/ α CD28 de células diana fue más rápida que la destrucción inducida por constructos con región Fc mutada, aunque la eliminación de células diana comenzó aproximadamente al mismo tiempo después de aproximadamente 11 h (figuras 6A, B). La combinación de anticuerpos biespecíficos condujo a una eliminación más rápida de células diana en comparación con la lisis inducida por constructos biespecíficos individuales (figuras 6C, D). Esto se esperaba, ya que las células T no sólo reciben una señal como en presencia de constructos individuales, sino que obtienen tanto una señal de activación como una coestimuladora si están presentes anticuerpos dirigidos contra CD3 y CD28.

Por tanto, la combinación de constructos biespecíficos media en la lisis específica de células diana que expresan proteínas de superficie de VHB de manera sinérgica.

25 *Los anticuerpos biespecíficos provocan la eliminación de células diana de una manera dependiente de la concentración*

30 Para examinar si la cantidad de anticuerpos biespecíficos tuvo un efecto sobre la lisis de células diana, se usaron dos cantidades diferentes de constructos biespecíficos para el cocultivo. Por tanto, se usó la cantidad habitual de anticuerpos (100 μ l de sobrenadante en total \pm alto) y la mitad de la misma (50 μ l de sobrenadante en total \pm bajo). La menor cantidad de anticuerpos biespecíficos también pudo inducir la lisis de células diana (viabilidad de punto final de las células HuH7-S: α CD3/ α CD28: el 12,6%; α CD3 Δ ADCC/ α CD28 Δ ADCC: el 15,9%), mientras que la mayor cantidad provocó la eliminación de células diana más rápido (figura 7) con sólo el 1,5% (α CD3/ α CD28) y el 2,1% (α CD3 Δ ADCC/ α CD28 Δ ADCC) de células viables restantes. Las células HuH7 no se vieron afectadas en ningún caso. La combinación de o bien α CD3/ α CD28 o bien α CD3 Δ ADCC/ α CD28 Δ ADCC provocó la destrucción de células diana de una manera dependiente de la concentración.

El aumento de las concentraciones de células efectoras mejora la lisis de células diana

40 Era de interés adicional si el número de células efectoras tenía un impacto en la eliminación de células diana. Por tanto, se comparó la cantidad habitual de PBMC usada para el cocultivo (1×10^5) con la cantidad doble (2×10^5). Tal como se demuestra en la figura 8, el mayor número de PBMC indujo la lisis de las células HuH7-S en presencia de α CD3/ α CD28 significativamente más rápido con una viabilidad de punto final del 4,5% en comparación con el 11,7%, pero también se destruyeron más células HuH7, si estaba presente la cantidad doble de PBMC (viabilidad de punto final de las células HuH7: 2×10^5 PBMC: el 83,8%; 1×10^5 PBMC: el 102,7%).

Estos datos indican que la eliminación de células diana depende de la cantidad de células efectoras.

Los anticuerpos biespecíficos median en la destrucción de células diana después de sólo 8 h de cocultivo

50 Para investigar la cuestión de cuánto tiempo deben estar presentes los anticuerpos biespecíficos durante el cocultivo para activar células T y, por tanto, inducir citotoxicidad, se retiró el sobrenadante de cocultivos que contenían los anticuerpos biespecíficos después de diferentes periodos de tiempo y se añadió un nuevo medio convencional DMEM. Si el sobrenadante que contenía α CD3/ α CD28 se retiraba después de 4 h, las PBMC sólo inducían una pequeña disminución de la viabilidad de células diana (el 78,5%), pero no podían provocar la lisis de todas las células diana (figura 9). Si el sobrenadante que contenía anticuerpos biespecíficos estaba presente durante 8 h o más, las PBMC podían provocar la eliminación de células diana. Tal como se ilustra en la figura 10, las PBMC necesitaron más tiempo para inducir la lisis de células diana si la estimulación con α CD3/ α CD28 duraba 8 h o 12 h en comparación con 24 h o 48 h, pero el efecto después de 48 h era casi similar (viabilidad de punto final de HuH7-S: 8 h : el 14,7%; 12 h: el 11,7%, 24 h: el 5,1%, 48 h: el 3,2%).

Los anticuerpos biespecíficos median en las funciones efectoras de células T durante el cocultivo o bien con HBsAg o bien con células HuH7-S

65 Para investigar la activación y la funcionalidad de células T durante los experimentos de cocultivo, se examinó la

secreción de citocinas mediante análisis por ELISA o FACS.

Los constructos biespecíficos median en la secreción de IFN- γ , TNF- α e IL-2

- 5 En un experimento de línea temporal se analizó cuándo comienzan las PBMC a secretar citocinas al entrar en contacto con anticuerpos biespecíficos y cómo se desarrolla la dinámica a lo largo del tiempo. Por tanto, se retiró el sobrenadante de los cocultivos 4 h, 8 h, 12 h, 24 h y 48 h después de la adición de PBMC y α CD3/ α CD28. Se midió la producción de citocinas mediante ELISA para IL-2, IFN- γ y TNF- α . La secreción de IL-2 aumentó con el tiempo, pero después de 4 h casi no se detectó IL-2, después de 8 h la concentración era ya de 316 pg/ml y durante las siguientes 4 horas, la concentración casi se cuadruplicó (1119 pg/ml). No hubo más aumentos entre las 24 h y las 48 h y la concentración de IL-2 pareció alcanzar una meseta a aproximadamente 1550 pg/ml (figura 10A). La secreción de IFN- γ (figura 10B) necesitó más tiempo, después de 8 h todavía se detectaron niveles muy bajos. Entre las 8 h y las 12 h, las células T comenzaron a secretar IFN- γ , porque su concentración ya ascendía a 1800 pg/ml después de las 12 h. Posteriormente (24 h), se observó un aumento de la producción de IFN- γ , la concentración aumentó hasta aproximadamente 10000 pg/ml. Se detectó la mayor cantidad después de 48 h (12000 pg/ml). Para ambos, IL-2 e IFN γ , la concentración en células negativas para HBsAg aumentó a lo largo del tiempo, con la mayor cantidad después de 48 h (IL-2: 45 pg/ml; IFN γ : 200 pg/ml) que también corresponde a las observaciones relativas a la viabilidad celular.
- 20 La secreción de TNF- α (figura 10C) aumentó hasta las 24 h, donde alcanzó su concentración máxima (1700 pg/ml). Luego disminuyó y representó sólo 1400 pg/ml después de 48 h. En cambio, la secreción de TNF- α comenzó antes que las otras, con alrededor de 100 pg/ml después de 4 h seguido de un aumento constante hasta las 24 h. Curiosamente, la producción de TNF- α en las células HuH7 se comportó exactamente de la manera opuesta. Con una concentración de fondo relativamente alta en comparación con otras citocinas, mostró la mayor concentración después de 4 h (~70 pg/ml) que disminuyó a lo largo del tiempo y representó sólo 9 pg/ml después de 48 h. Se induce que las PBMC secreten IL-2, IFN- γ y TNF- α al entrar en contacto con α CD3/ α CD28 durante el cocultivo con células que expresan HBsAg, mientras que la dinámica de secreción difiere entre las citocinas individuales.

Los constructos biespecíficos activan células T CD8⁺ y células T CD4⁺

- 30 Para analizar si las PBMC también muestran degranulación de vesículas citotóxicas, se investigó la translocación de LAMP-1 (CD107a), un marcador de degranulación. Después del cocultivo con células HuH7-S/HuH7 en presencia de α CD3/ α CD28 o α CD3 Δ ADCC/ α CD28 Δ ADCC, las células T CD8⁺ mostraron un claro cambio en la tinción de LAMP-1, mientras que la señal fue más intensa en las muestras estimuladas con α CD3 Δ ADCC/ α CD28 Δ ADCC en comparación con α CD3/ α CD28 (figuras 11 C, D). Curiosamente, podía realizarse la misma observación para células T CD4⁺ (figuras 11 A, B). Para α CD3/ α CD28, la translocación de LAMP-1 fue más prominente en células T CD8⁺, para α CD3 Δ ADCC/ α CD28 Δ ADCC exactamente lo contrario.
- 40 Estos datos demuestran que no sólo se inducen células T CD8⁺, sino también CD4⁺ para que secreten gránulos citotóxicos al entrar en contacto con los anticuerpos biespecíficos y HBsAg.
- 45 Para examinar la polifuncionalidad de las células T después de los experimentos de cocultivo, se tiñeron PBMC para IFN- γ , IL-2 y TNF- α , así como para el marcador de activación CD154 (CD40L) que se expresa predominantemente en células T CD4⁺, a las 8 h, 12 h y 24 h después de la adición de PBMC y α CD3/ α CD28 (figura 12). Las células T CD4⁺ mostraron un aumento constante de células T IFN- γ ⁺ (el 9,3% después de 24 h), células T IL-2⁺ (el 11,3% después de 24 h), células T TNF- α ⁺ (el 14,7% después de 24 h) y células T CD154⁺ (el 28,0% después de 24 h), mientras que el mayor aumento se produjo entre las 12 h y las 24 h (figura 12A).

- 50 Lo mismo fue cierto para células T CD8⁺, mientras que el porcentaje de células IFN- γ ⁺ e IL-2⁺ con el 18,4% y el 11,3% superó en número a las células T CD4⁺. La cantidad de células T TNF- α ⁺ y CD154⁺ CD8⁺ disminuyeron con el 10,1% y el 6,25% en comparación con las células T CD4⁺ (figura 12B). Las PBMC en células HuH7 no mostraron activación en ninguna muestra. Se usaron puertas combinadas booleanas para un análisis adicional de las células T que secretan citocinas (figuras 12C, D). Después de 24 h, el 3,1% de células T CD4⁺ y el 2,1% de células T CD8⁺ fueron IFN γ ⁺, IL-2⁺ y TNF α ⁺, indicando polifuncionalidad de las células T. Por tanto, α CD3/ α CD28 media en la activación de PBMC durante el cocultivo con células HuH7-S/HuH7, lo que da como resultado células T CD4⁺ y CD8⁺ polifuncionales.

- 60 Para excluir la posibilidad de que se detectaran señales de falsos positivos debido a la unión inespecífica de anticuerpos a células diana muertas durante el análisis mediante FACS, se cultivaron PBMC en presencia de HBsAg inmovilizado. Además, se examinó el efecto del HBsAg soluble, ya que los pacientes infectados por VHB presentan altas cantidades de HBsAg en la sangre. Las PBMC se tiñeron de nuevo para IFN- γ , IL-2 y TNF- α , así como para CD154, pero sólo 24 h y 48 h después de la adición de PBMC y α CD3 Δ ADCC/ α CD28 Δ ADCC (figura 13). De nuevo, las células T CD4⁺ mostraron un aumento de células T IFN- γ ⁺ (el 3,4% después de 24 h, el 6,8% después de 48 h) y células T CD154⁺ (el 17,2% después de 24 h, el 19,9% después de 48 h). Había menos células T IL-2⁺ después de

48 h (el 4,9%) en comparación con 24 h (el 5,5%), las células T TNF- α ⁺ también disminuyeron (el 14,9% después de 24 h, el 8,1% después de 48 h) (figura 13A). Las células T CD8⁺ sólo mostraron una disminución de las células T TNF- α ⁺ (el 12,6% después de 24 h, el 7,4% después de 48 h), por lo que esta reducción también se observó en ELISA (figura 10). El porcentaje de células T IFN- γ ⁺, IL-2⁺ y CD154⁺ CD8⁺ aumentó entre las 24 h y las 48 h (IFN- γ ⁺: el 4,7% después de 24 h, el 8,5% después de 48 h, IL-2⁺: el 5,1% después de 24 h, el 7,2% después de 48 h, CD154⁺: el 8,3% después de 24 h, el 10,4% después de 48 h) (figura 13B). De nuevo, el porcentaje de células T IFN- γ ⁺ e IL-2⁺ CD8⁺ superó en número a las células T CD4⁺ y la cantidad de células T TNF- α ⁺ y CD154⁺ CD8⁺ disminuyó en comparación con las células T CD4⁺. Después de 48 h, también algunas células T parecieron activarse por el HBsAg soluble, ya que las células T TNF α ⁺ alcanzaron el 1,1% (células T CD4⁺) y el 1,0% (células T CD8⁺), las células T CD154⁺ el 2,7% (células T CD4⁺) y el 3,1% (células T CD8⁺), las células T IFN γ ⁺ CD8⁺ el 1,2% y las células T IL-2⁺ CD8⁺ el 1,4%. De nuevo, se usaron puertas booleanas para un análisis adicional de las células T que secretan citocinas (figuras 13C, D). El 0,35% (después de 24 h) y el 0,63% (después de 48 h) de células T CD4⁺, el 0,3% (después de 24 h) y el 1,0% (después de 48 h) de células T CD8⁺ fueron IFN- γ ⁺, IL-2⁺ y TNF- α ⁺, indicando polifuncionalidad de las células T. α CD3 Δ DCC/ α CD28 Δ ADCC media en la activación de PBMC durante el cocultivo con células de HBsAg inmovilizado, lo que da como resultado células T CD4⁺ y CD8⁺ polifuncionales. La activación debida a HBsAg soluble sigue siendo escasa.

Los anticuerpos biespecíficos median en la secreción de IFN γ y la destrucción de células HepaRG infectadas por VHB

Finalmente, era de interés si los anticuerpos biespecíficos pueden redireccionar las células T hacia células HepaRG infectadas por VHB. Se sometió a prueba el éxito de la infección mediante la medición de HBsAg en el sobrenadante de las células infectadas. En comparación con los resultados de las células HuH7-S o HepG2.2.15, la concentración de HBsAg producida por las células HepaRG infectadas por VHB fue muy baja. Adicionalmente, los valores en diferentes pocillos variaron mucho, indicado por la desviación estándar relativamente alta (figura 14).

Sin embargo, la infección fue satisfactoria y se realizó un cocultivo de PBMC con células HepaRG en presencia de anticuerpos biespecíficos. Tal como puede observarse en la figura 15, la viabilidad de las células no tratadas disminuyó a lo largo del tiempo, con una viabilidad restante del 65,9% (VHB+) y el 62,9% (VHB-) después de 56 h. En comparación, α CD3 y la combinación α CD3/ α CD28 mediaron en la lisis específica de células HepaRG infectadas por VHB. α CD28 solo no pudo inducir la eliminación específica de células diana. Si estaba presente α CD3 durante el cocultivo, la viabilidad de las células infectadas por VHB disminuyó hasta el 25,3%, mientras que las células HepaRG no infectadas permanecieron en el 53,5% (figura 15A). La estimulación de células efectoras por α CD3/ α CD28 también condujo a la destrucción significativa de las células HepaRG infectadas por VHB (figura 15B), por lo que el 37,5% de células diana siguieron siendo viables (células HepaRG no infectadas: el 62,4%).

Por tanto, α CD3 o α CD3/ α CD28 inducen lisis específica de células HepaRG infectadas por VHB.

Los anticuerpos biespecíficos median en la reducción de los tumores positivos para VHB *in vivo*

Se les inyectaron a ratones inmunodeficientes a los que se les había inyectado la línea celular de hepatoma transgénico para VHB humano HepG2.2.15 para desarrollar tumores subcutáneos positivos para VHB, PBMC humanas y constructos biespecíficos dirigidos contra CD3 y CD28 (figura 16). El tratamiento dio como resultado una reducción notable del tamaño tumoral en comparación con los animales no tratados o tratados de manera simulada (animales que recibieron PBMC y PBS). El tamaño tumoral se redujo en aproximadamente el cincuenta por ciento en los animales tratados.

Lista de secuencias

<110> Helmholtz Zentrum München - Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt (GmbH) *et al.*

<120> Medios y métodos novedosos para tratar la infección por VHB y estados asociados
<130> W2662 PCT

<150> Documento EP 13 18 4635.4
<151> 16-09-2013

<160> 49

<170> BiSSAP 1.2

<210> 1
<211> 8
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 773 306 T3

<220>
 <223> CDR1 de cadena pesada de scFv C8

<400> 1

5 Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Ala
 1 5

<210> 2
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> CDR2 de cadena pesada de scFv C8

15 <400> 2

Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr
 1 5

20 <210> 3
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> CDR3 de cadena pesada de scFv C8

<400> 3

Ala Lys Pro Pro Gly Arg Gln Glu Tyr Tyr Gly Ser Ser Ile Tyr Tyr
 1 5 10 15
 Phe Pro Leu Gly Asn
 20

30 <210> 4
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> CDR1 de cadena ligera de scFv C8

40 <400> 4

Asn Ile Gly Ser Lys Ser
 1 5

45 <210> 5
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> CDR2 de cadena ligera de scFv C8

50 <400> 5

Asp Asp Ser
 1

55 <210> 6
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60

ES 2 773 306 T3

<223> CDR2 de cadena ligera de scFv 5F9
 <400> 11

5 Trp Ala Ser
 1

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

<220>
 <223> CDR3 de cadena ligera de scFv 5F9

15 <400> 12

Gln Gln Tyr Ser Ile Phe Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 13
 20 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 25 <223> CDR1 de cadena pesada de scFv 5A19

<400> 13

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
 1 5

30 <210> 14
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> CDR2 de cadena pesada de scFv 5A19

<400> 14

40 Val Ser Ser Asp Gly Ser Tyr Ala
 1 5

<210> 15
 <211> 9
 45 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> CDR3 de cadena pesada de scFv 5A19

50 <400> 15

Ala Ser Phe Asn Trp Asp Val Ala Tyr
 1 5

55 <210> 16
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> CDR1 de cadena ligera de scFv 5A19

ES 2 773 306 T3

	Ala	Arg	Tyr	Tyr	Asp	Asp	His	Tyr	Cys	Leu	Asp	Tyr	
	1				5					10			
5	<210> 22 <211> 5 <212> PRT <213> Secuencia artificial												
10	<220> <223> CDR1 de cadena ligera de scFv OKT3 <400> 22												
					Ser	Ser	Val	Ser	Tyr				
					1				5				
15	<210> 23 <211> 3 <212> PRT <213> Secuencia artificial												
20	<220> <223> CDR2 de cadena ligera de scFv OKT3 <400> 23												
					Asp	Thr	Ser						
					1								
30	<210> 24 <211> 9 <212> PRT <213> Secuencia artificial												
35	<220> <223> CDR3 de cadena ligera de scFv OKT3 <400> 24												
					Gln	Gln	Trp	Ser	Ser	Asn	Pro	Phe	Thr
					1				5				
40	<210> 25 <211> 8 <212> PRT <213> Secuencia artificial												
45	<220> <223> CDR1 de cadena pesada de scFv 9.3 <400> 25												
					Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	Asp	Tyr	Gly	
					1				5				
50	<210> 26 <211> 7 <212> PRT <213> Secuencia artificial												
55	<220> <223> CDR2 de cadena pesada de scFv 9.3 <400> 26												
60					Ile	Trp	Ala	Gly	Gly	Gly	Thr		
					1				5				

ES 2 773 306 T3

<211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> CDR2 de cadena pesada de scFv A9

<400> 32

10 Ile Tyr Pro Gly Gly Gly Tyr Thr
 1 5

<210> 33
 <211> 10
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> CDR3 de cadena pesada de scFv A9

20 <400> 33

 Ala Arg Ser Ala Ser Trp Tyr Phe Asp Val
 1 5 10

<210> 34
 25 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 30 <223> CDR1 de cadena ligera de scFv A9

<400> 34

 Thr Gly Thr Val Thr Thr Ser Asn Tyr
 1 5

35 <210> 35
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> CDR2 de cadena ligera de scFv A9

<400> 35

45 His Thr Asn
 1

<210> 36
 <211> 9
 50 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> CDR3 de cadena ligera de scFv A9

55 <400> 36

 Ala Leu Trp Tyr Asn Asn His Trp Val
 1 5

60 <210> 37
 <211> 8

ES 2 773 306 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 5 <223> CDR1 de cadena pesada de scFv NCAM29.2

<400> 37

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly
 1 5

10 <210> 38
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> CDR2 de cadena pesada de scFv NCAM29.2

<400> 38

20

Ile Ser Ser Gly Ser Tyr Ala Ile
 1 5

<210> 39
 <211> 14
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> CDR3 de cadena pesada de scFv NCAM29.2

30 <400> 39

Val Arg Gly Arg Arg Leu Gly Glu Gly Tyr Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

35 <210> 40
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> CDR1 de cadena ligera de scFv NCAM29.2

<400> 40

Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr
 1 5 10

45 <210> 41
 <211> 3
 <212> PRT

50 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> CDR2 de cadena ligera de scFv NCAM29.2

55 <400> 41

Trp Ala Ser
 1

60 <210> 42
 <211> 7
 <212> PRT

ES 2 773 306 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR3 de cadena ligera de scFv NCAM29.2

5

<400> 42

Gln Gln Tyr Ser Ser Trp Thr
1 5

10

<210> 43

<211> 794

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> scFv anti-HBsAg [C8]^Ligante de glicina-serina^hlgG1-Fc[C245S,L259F,L260E,G262A,A355T]^Etiqueta de Strep^Ligante de glicina^scFv anti-CD3 [OKT3]

20

<400> 43

```

Met Asp Phe Glu Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1      5      10
Val Ile Met Ser Arg Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly
20
Gly Leu Leu Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
35      40
Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro
50      55      60
Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser
65      70      75      80
Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
85      90      95
Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu
100
Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Lys Pro Pro Gly Arg Gln Glu Tyr
115      120      125
Tyr Gly Ser Ser Ile Tyr Tyr Phe Pro Leu Gly Asn Trp Gly Gln Gly
130      135      140
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Lys Leu Glu
145      150      155      160
Glu Gly Glu Phe Ser Glu Ala Arg Val Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro
165      170      175
Ala Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly
180      185      190
Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
195      200      205
Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser
210      215      220
Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr
225      230      235      240
Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
245      250      255
Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp Leu Val Val Phe Gly Gly Gly Thr

```

ES 2 773 306 T3

260 265 270
 Lys Leu Thr Val Leu Gly Asn Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 275 280 285
 Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ala Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys
 290 295 300
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Ala Pro
 305 310 315 320
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 325 330 335
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 340 345 350
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 355 360 365
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 370 375 380
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 385 390 395 400
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Thr Pro Ile Glu Lys
 405 410 415
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 420 425 430
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 435 440 445
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 450 455 460
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 465 470 475 480
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 485 490 495
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 500 505 510
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 515 520 525
 Lys Asp Pro Gly Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Ser Arg Gly Gly
 530 535 540
 Gly Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro
 545 550 555 560
 Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 565 570 575
 Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu
 580 585 590
 Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln
 595 600 605
 Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr
 610 615 620
 Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr
 625 630 635 640
 Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly
 645 650 655
 Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Asn Ser Gly Gly Gly Gly
 660 665 670
 Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ala Ser Gln Ile Val
 675 680 685
 Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val
 690 695 700
 Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr
 705 710 715 720
 Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser
 725 730 735
 Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His Phe Arg Gly Ser Gly Ser Gly
 740 745 750
 Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala
 755 760 765
 Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Ser
 770 775 780
 Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Gly Asn Ser
 785 790

- <210> 44
- 5 <211> 793
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>

ES 2 773 306 T3

<223> scFv anti-HBsAg [C8]^Ligante de glicina-serina^hlgG1-Fc[C245S,L259F,L260E,G262A,A355T]^Etiqueta de Strep^Ligante de glicina^scFv anti-CD28 [9.3]

<400> 44

5

```

Met Asp Phe Glu Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1          5          10          15
Val Ile Met Ser Arg Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly
20          25          30
Gly Leu Leu Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
35          40          45
Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro
50          55          60
Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser
65          70          75          80
Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
85          90          95
Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu
100         105         110
Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Lys Pro Pro Gly Arg Gln Glu Tyr
115         120         125
Tyr Gly Ser Ser Ile Tyr Tyr Phe Pro Leu Gly Asn Trp Gly Gln Gly
130         135         140
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Lys Leu Glu
145         150         155         160
Glu Gly Glu Phe Ser Glu Ala Arg Val Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro
165         170         175
Ala Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly
180         185         190
Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
195         200         205
Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser
210         215         220
Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr
225         230         235         240
Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
245         250         255
Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp Leu Val Val Phe Gly Gly Gly Thr
260         265         270
Lys Leu Thr Val Leu Gly Asn Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
275         280         285
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys
290         295         300
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Ala Pro
305         310         315         320
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
325         330         335
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
340         345         350
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
355         360         365
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
370         375         380

```

ES 2 773 306 T3

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 385 390 395 400
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Thr Pro Ile Glu Lys
 405 410 415
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 420 425 430
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 435 440 445
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 450 455 460
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 465 470 475 480
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 485 490 495
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 500 505 510
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 515 520 525
 Lys Asp Pro Gly Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Ser Ser Gly Gly
 530 535 540
 Gly Gly Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Thr Pro
 545 550 555 560
 Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser
 565 570 575
 Asp Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Gln Gly Leu Glu
 580 585 590
 Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Ala
 595 600 605
 Leu Met Ser Arg Lys Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val
 610 615 620
 Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 625 630 635 640
 Cys Ala Arg Asp Lys Gly Tyr Ser Tyr Tyr Ser Met Asp Tyr Trp
 645 650 655
 Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Arg Gly Gly Gly Ser Gly
 660 665 670
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser
 675 680 685
 Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys
 690 695 700
 Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr Val Thr Ser Leu Met Gln Trp
 705 710 715 720
 Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Phe Ala Ala
 725 730 735
 Ser Asn Val Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
 740 745 750
 Gly Thr Asn Phe Ser Leu Asn Ile His Pro Val Asp Glu Asp Asp Val
 755 760 765
 Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro Tyr Thr Phe Gly
 770 775 780
 Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 785 790

<210> 45

<211> 792

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> scFv anti-HBsAg [C8]^Ligante de glicina-serina^hIgG1-Fc[C245S,L259F,L260E,G262A,A355T]^Etiqueta de Strep^Ligante de glicina^Etiqueta de Strep^ scFv anti-CD16 [A9]

<400> 45

ES 2 773 306 T3

Met Asp Phe Glu Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1 5 10 15
Val Ile Met Ser Arg Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly
20 25 30
Gly Leu Leu Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
35 40 45
Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro
50 55 60
Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser
65 70 75 80
Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
85 90 95
Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu
100 105 110
Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Lys Pro Pro Gly Arg Gln Glu Tyr
115 120 125
Tyr Gly Ser Ser Ile Tyr Tyr Phe Pro Leu Gly Asn Trp Gly Gln Gly
130 135 140
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Lys Leu Glu
145 150 155 160
Glu Gly Glu Phe Ser Glu Ala Arg Val Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro
165 170 175
Ala Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly
180 185 190
Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
195 200 205
Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser
210 215 220
Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr
225 230 235 240
Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
245 250 255
Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp Leu Val Val Phe Gly Gly Gly Thr
260 265 270
Lys Leu Thr Val Leu Gly Asn Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
275 280 285
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys
290 295 300
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Ala Pro
305 310 315 320
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
325 330 335
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
340 345 350
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
355 360 365
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
370 375 380
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
385 390 395 400
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Thr Pro Ile Glu Lys
405 410 415
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
420 425 430
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
435 440 445
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
450 455 460
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
465 470 475 480
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
485 490 495

ES 2 773 306 T3

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 500 505 510
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 515 520 525
 Lys Asp Pro Gly Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Ser Arg Gly Gly
 530 535 540
 Gly Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro
 545 550 555 560
 Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 565 570 575
 Asn Tyr Trp Leu Gly Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu
 580 585 590
 Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Pro Gly Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Glu
 595 600 605
 Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Val Thr Ala Asp Thr Ser Ser Arg Thr
 610 615 620
 Ala Tyr Val Gln Val Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr
 625 630 635 640
 Phe Cys Ala Arg Ser Ala Ser Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly
 645 650 655
 Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Asn Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 660 665 670
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ser Gln Ala Val Val Thr
 675 680 685
 Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu Thr Val Thr Leu Thr
 690 695 700
 Cys Arg Ser Asn Thr Gly Thr Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp
 705 710 715 720
 Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly Leu Ile Gly His Thr
 725 730 735
 Asn Asn Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Ile
 740 745 750
 Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Thr Glu Asp Glu
 755 760 765
 Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Asn Asn His Trp Val Phe Gly
 770 775 780
 Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 785 790

<210> 46
 <211> 799
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 10 <223> scFv anti-HBsAg [C8]^Ligante de glicina-serina^hIgG1-Fc[C245S,L259F,L260E,G262A,A355T]^Etiqueta de Strep^Ligante de glicina^Etiqueta de Strep^scFv anti-CD56 [NCAM29.2]

<400> 46

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

ES 2 773 306 T3

Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Pro Glu Asn Thr
 610 615 620
 Leu Phe Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Met Tyr
 625 630 635 640
 Tyr Cys Val Arg Gly Arg Arg Leu Gly Glu Gly Tyr Ala Met Asp Tyr
 645 650 655
 Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Asn Ser Gly Gly
 660 665 670
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ala Ser Asp
 675 680 685
 Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Val Gly Glu
 690 695 700
 Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Ser
 705 710 715 720
 Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 725 730 735
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Lys Ser Gly Val Pro
 740 745 750
 Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 755 760 765
 Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
 770 775 780
 Ser Ser Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 785 790 795

5 <210> 47
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Ligante
 <400> 47

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

15 <210> 48
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Ligante
 <400> 48

Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Glu Glu Gly Glu Phe Ser Glu Ala Arg
 1 5 10 15
 Val

30 <210> 49
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Ligante
 <400> 49

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15
 Gly Gly Gly Ser

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende o que consiste en dos polipéptidos, en la que cada polipéptido comprende
 - 5 (1) un primer conjunto de seis regiones determinantes de complementariedad (CDR) comprendidas en un primer fragmento scFv y configuradas para unirse a un primer antígeno; y
 - (2) un segundo conjunto de seis CDR comprendidas en un segundo fragmento scFv y configuradas para unirse a un segundo antígeno;
 - 10 en la que dichos dos polipéptidos son
 - (a)
 - 15 (i) un polipéptido que se une a un antígeno de superficie pequeño o grande de VHB y a CD3; y
 - (ii) un polipéptido que se une a un antígeno de superficie pequeño o grande de VHB y a CD28;
 - 20 o
 - (b)
 - (i) un polipéptido que se une a un antígeno de superficie pequeño o grande de VHB y a CD16; y
 - 25 (ii) un polipéptido que se une a un antígeno de superficie pequeño o grande de VHB y a CD56
 - y en la que no hay presentes CDR adicionales en dichos polipéptidos.
2. Composición según la reivindicación 1, en la que dicho primer conjunto de seis CDR se une a un epítipo de dicho primer antígeno, epítipo que está ubicado
 - (a) en dicho antígeno de superficie pequeño de VHB;
 - (b) en la parte de dicho antígeno de superficie grande de VHB que no está comprendida por dicho antígeno de superficie pequeño de VHB; o
 - (c) en una parte de dicho antígeno de superficie grande de VHB, parte que varía en cuanto a la estructura con respecto a dicho antígeno de superficie pequeño de VHB.
3. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dichos polipéptidos comprenden además una región de dimerización, en la que dicha región de dimerización proporciona dimerización covalente y/o no covalente.
4. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dichos polipéptidos comprenden además una región espaciadora, comprendiendo dicha región espaciadora un dominio CH2 y un dominio CH3, estando ubicada dicha región espaciadora entre
 - (i) dicho primer fragmento scFv y
 - 50 (ii) dicho segundo fragmento scFv en la secuencia de aminoácidos de dicho polipéptido, y mutando preferiblemente dicho dominio CH2 y/o dicho dominio CH3 en una o más posiciones para disminuir o suprimir la unión a receptores de Fc.
5. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que en cada uno de dichos polipéptidos
 - (a) dicho primer conjunto de seis CDR tiene las secuencias de SEQ ID NO: 1 a 6, 7 a 12 ó 13 a 18; y/o
 - (b) dicho segundo conjunto de seis CDR tiene las secuencias de SEQ ID NO: 19 a 24, 25 a 30, 31 a 36 ó 37 a 42,
 - 60 en la que dentro de cada conjunto de seis CDR el orden de CDR es el siguiente: CDR1 de cadena pesada, CDR2 de cadena pesada, CDR3 de cadena pesada, CDR1 de cadena ligera, CDR2 de cadena ligera y CDR3 de cadena ligera.
6. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que cada uno de dichos

polipéptidos comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 43 a 46 o una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de al menos el 80% con una cualquiera de SEQ ID NO: 43 a 46, siempre que las CDR de dicha secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de al menos el 80% sean idénticas a las SEQ ID NO: 1 a 6, 7 a 12, 13 a 18, 19 a 24, 25 a 30, 31 a 36 ó 37 a 42, respectivamente.

- 5
7. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que, tras dicha dimerización, dicha composición comprende o consiste en reactivos tetravalentes.
- 10 8. Composición farmacéutica que comprende o que consiste en una o más composiciones según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 15 9. Una o más composiciones según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para su uso en un método de tratamiento o prevención de la infección por VHB y/o un estado provocado por dicha infección por VHB, seleccionándose dicho estado provocado por dicha infección por VHB de cirrosis hepática, carcinoma hepatocelular y cáncer de hígado, estando caracterizado dicho cáncer de hígado por la expresión de uno o más antígenos de superficie de VHB.

Figura 1

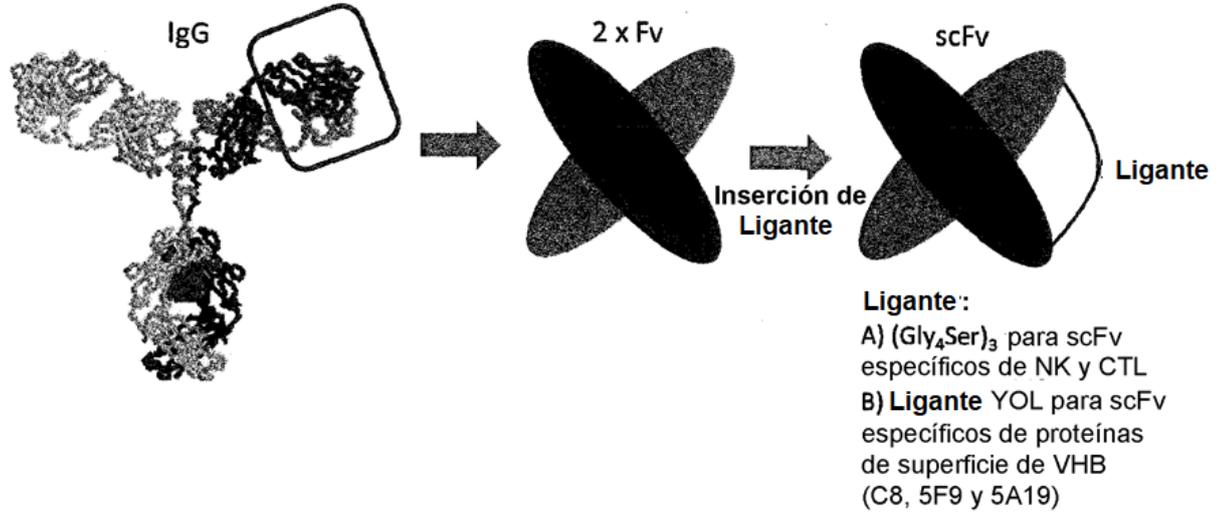


Figura 2

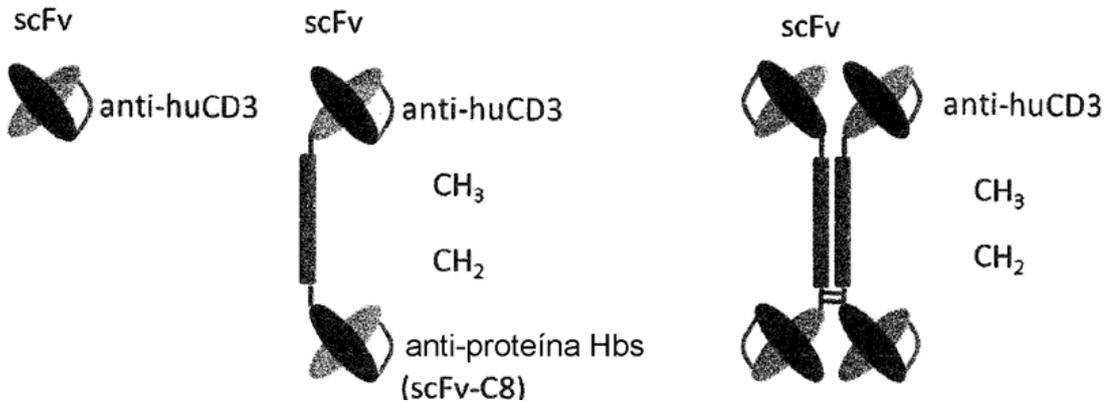


Figura 3

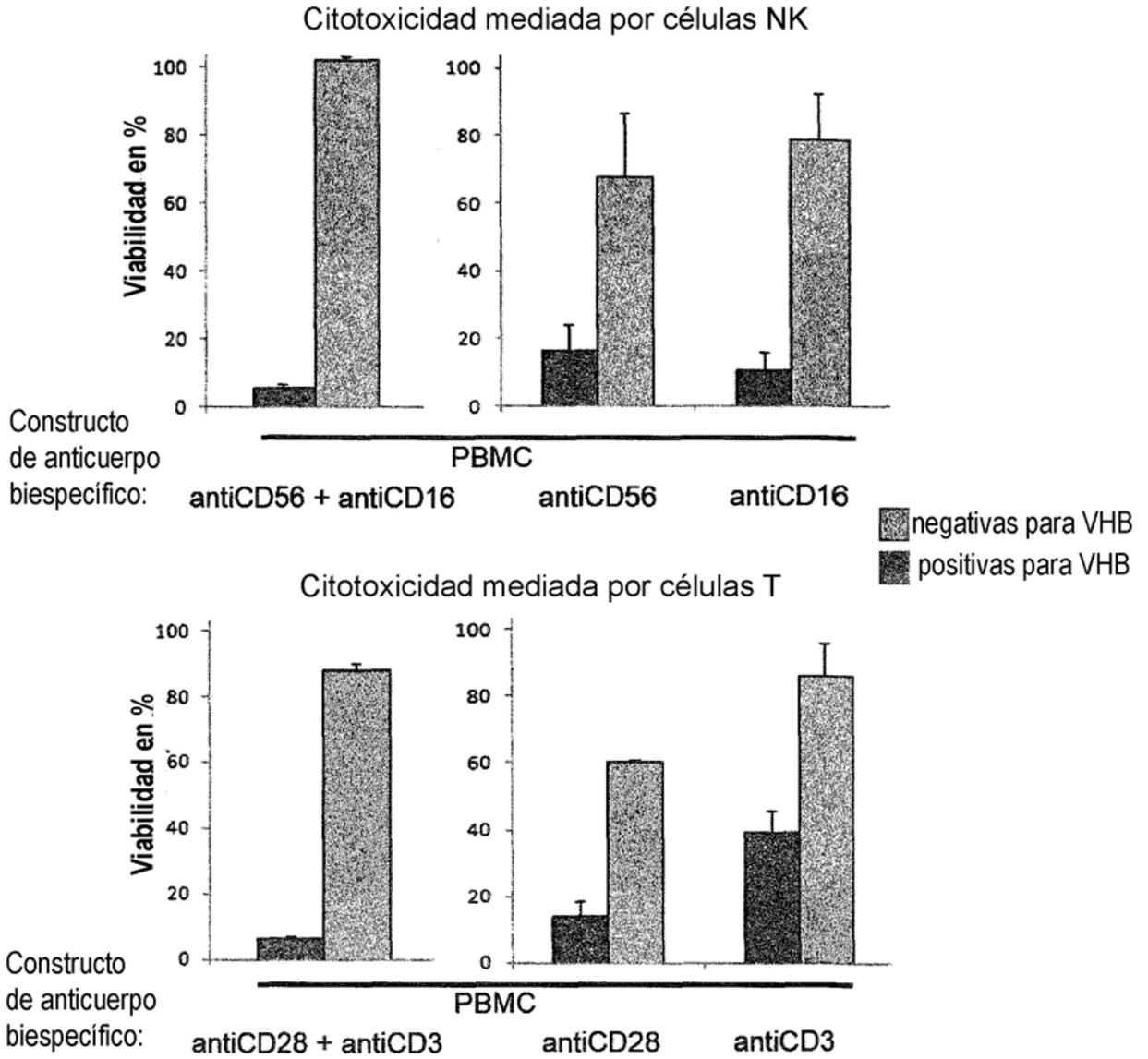


Figura 4

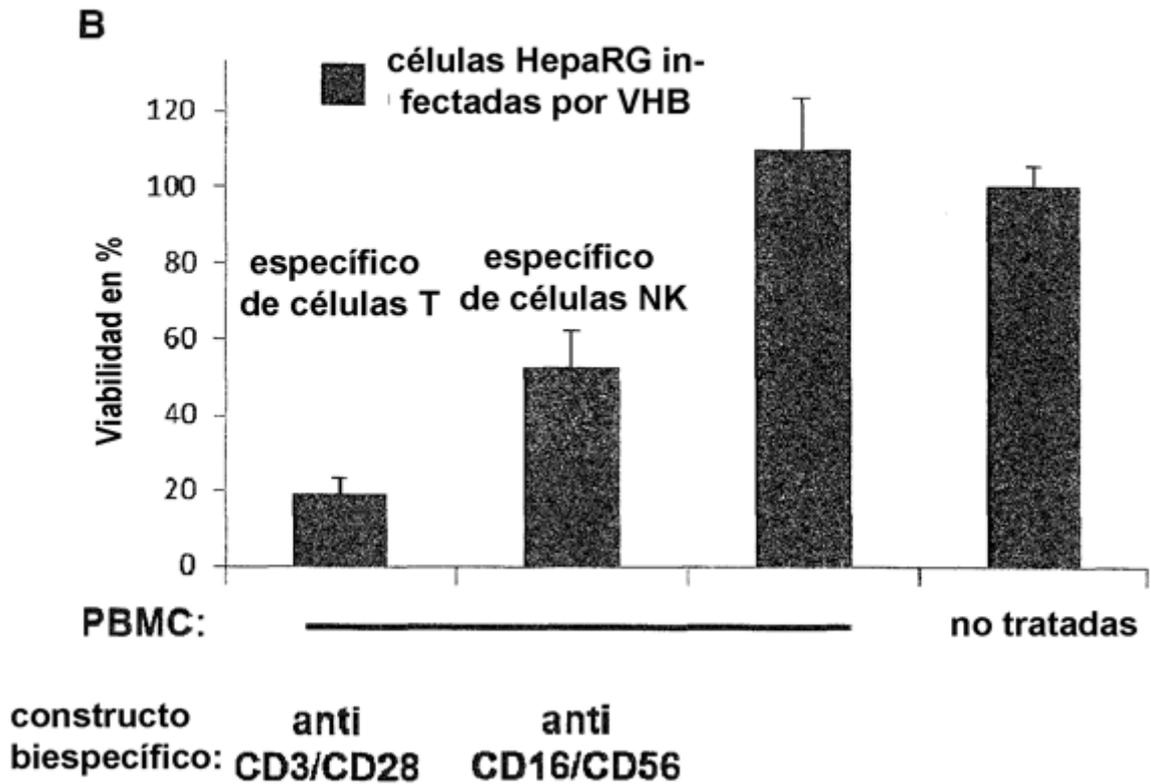
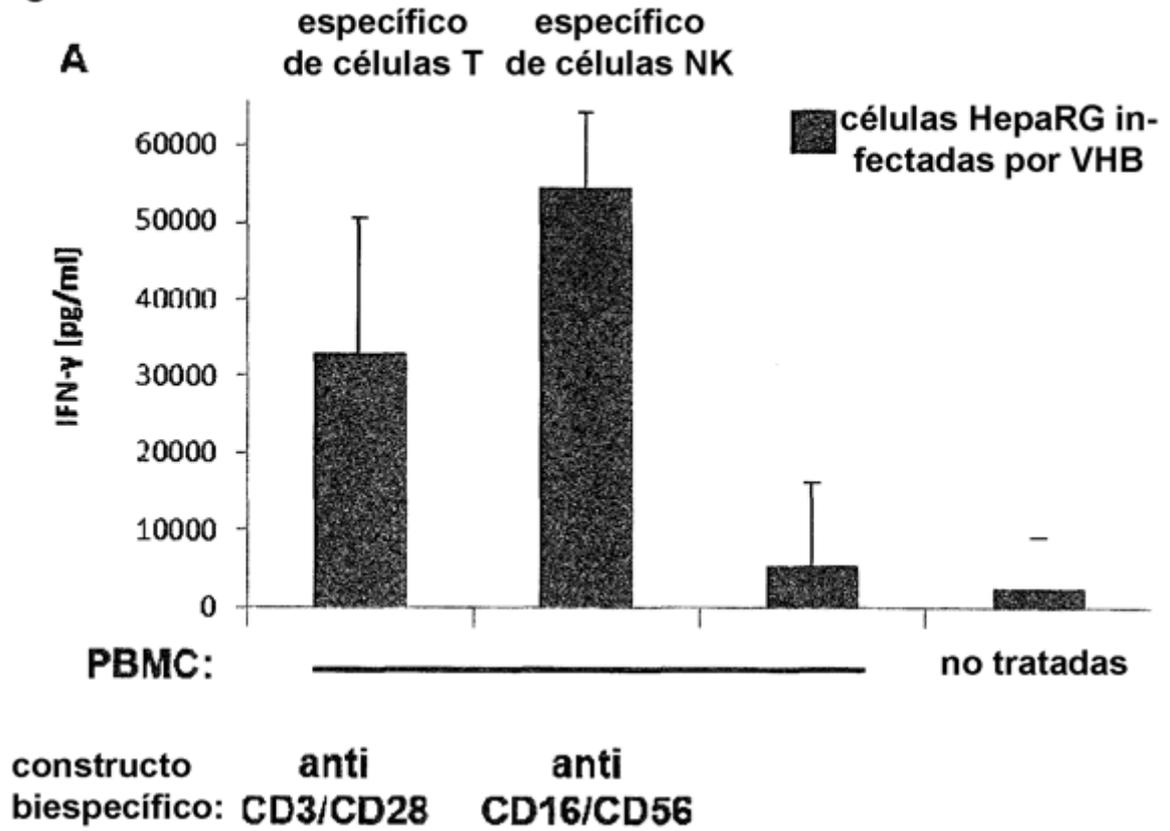


Figura 5

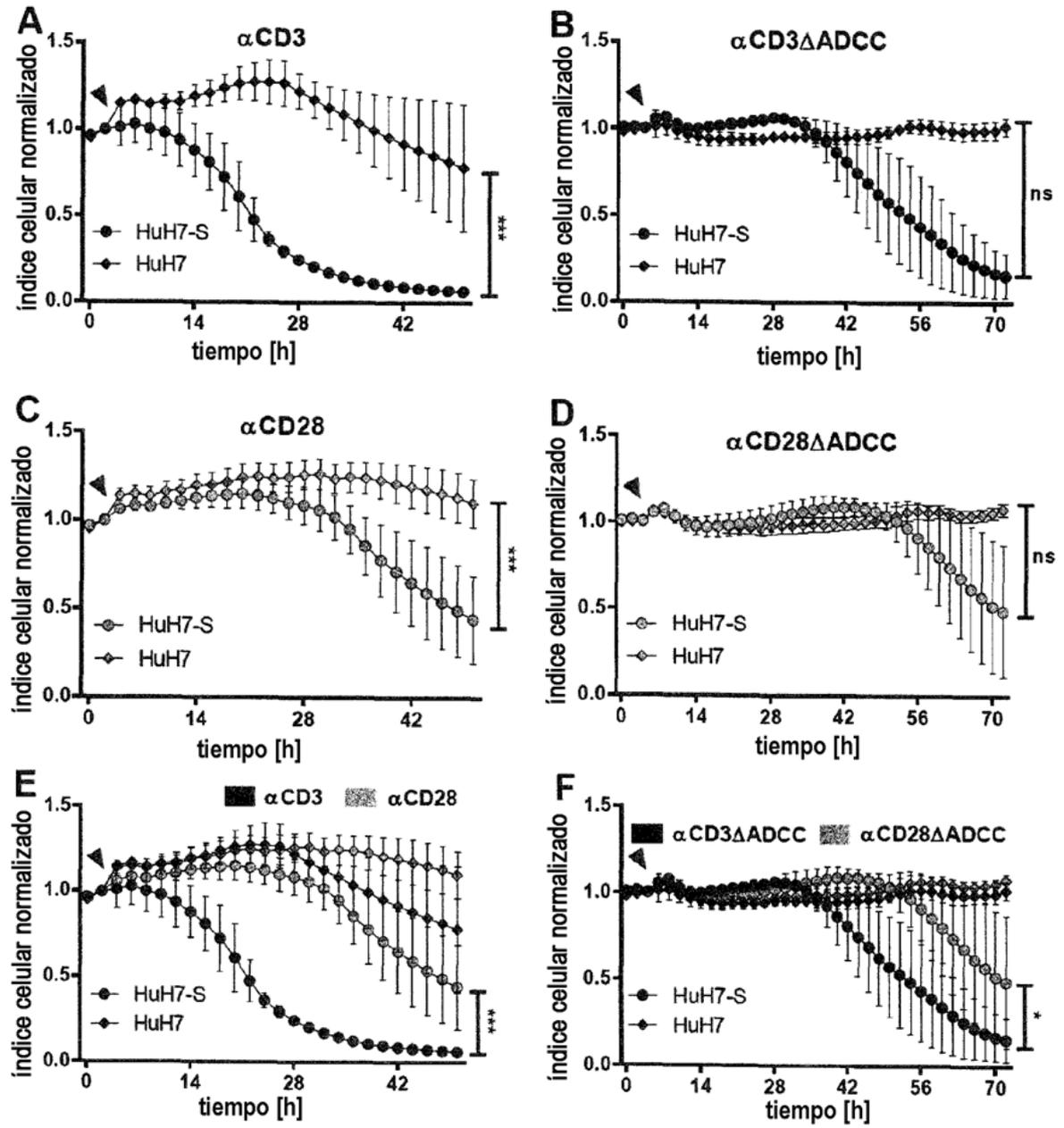


Figura 6

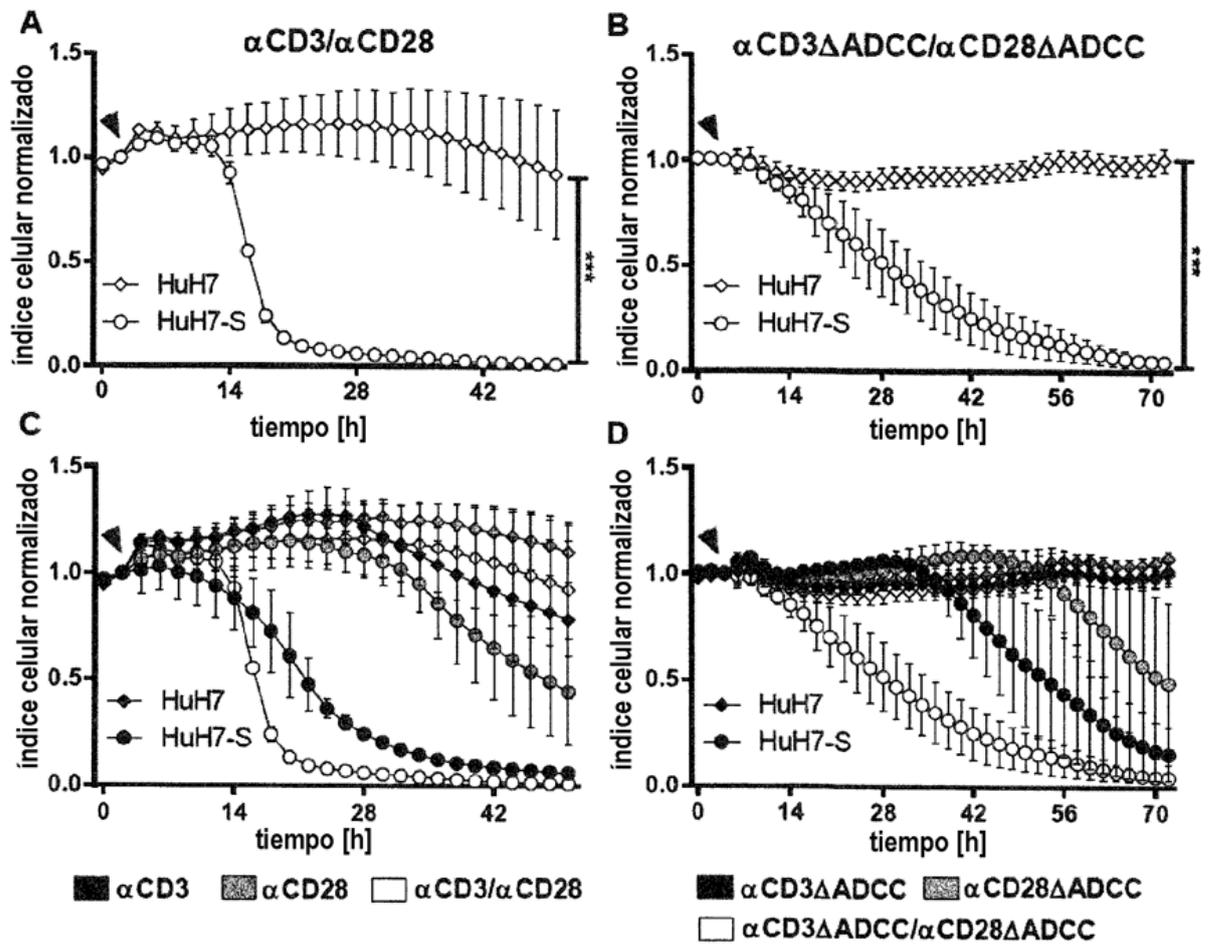


Figura 7

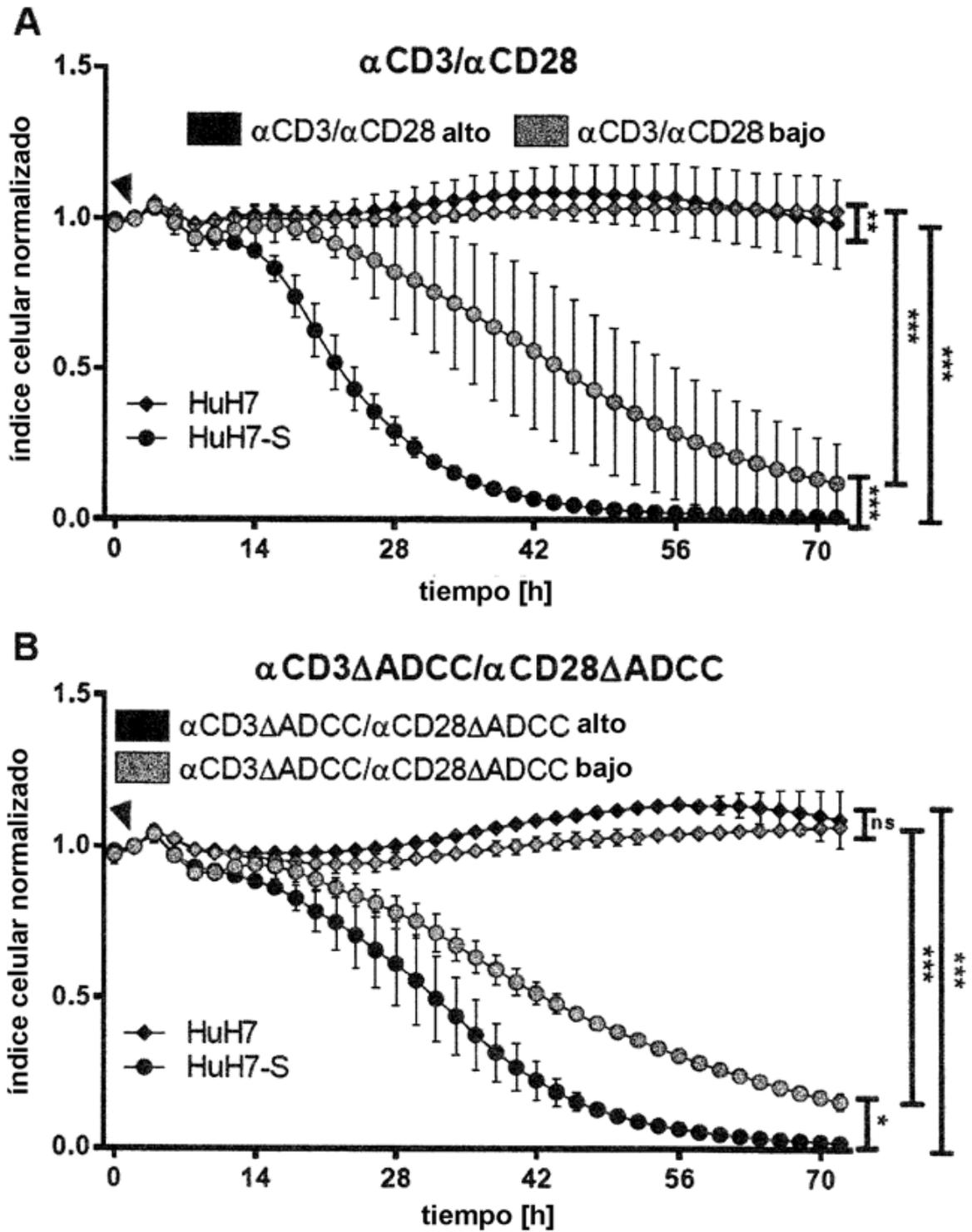


Figura 8

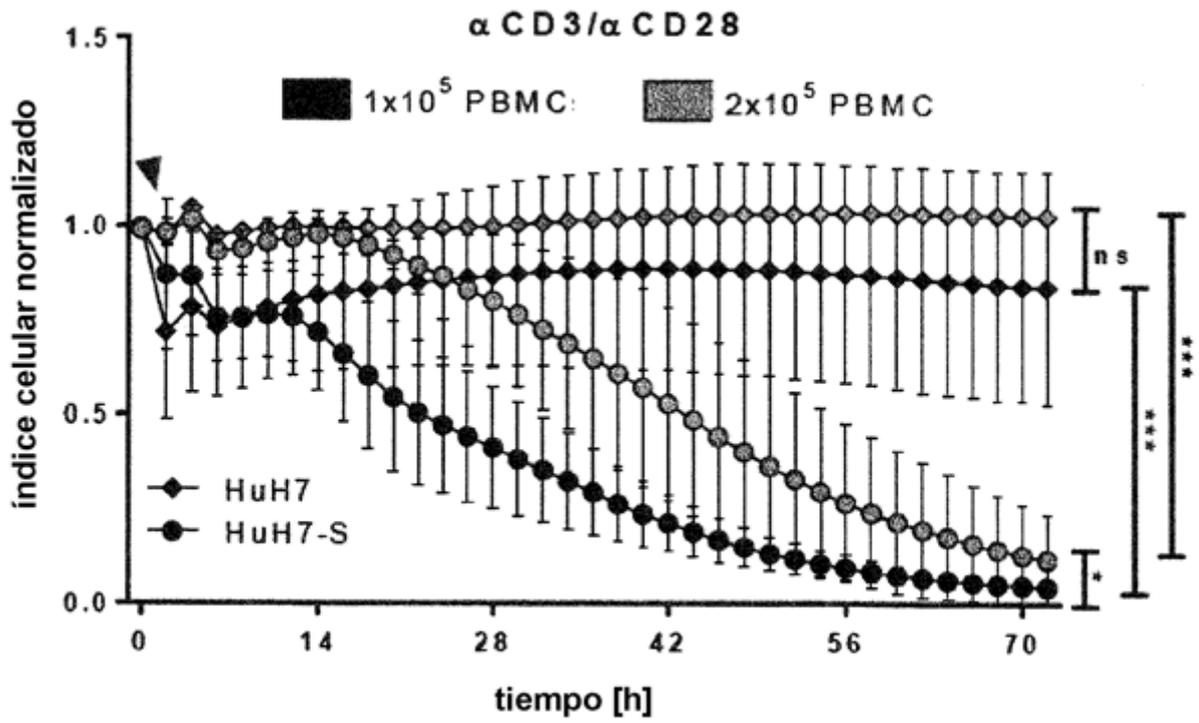


Figura 9

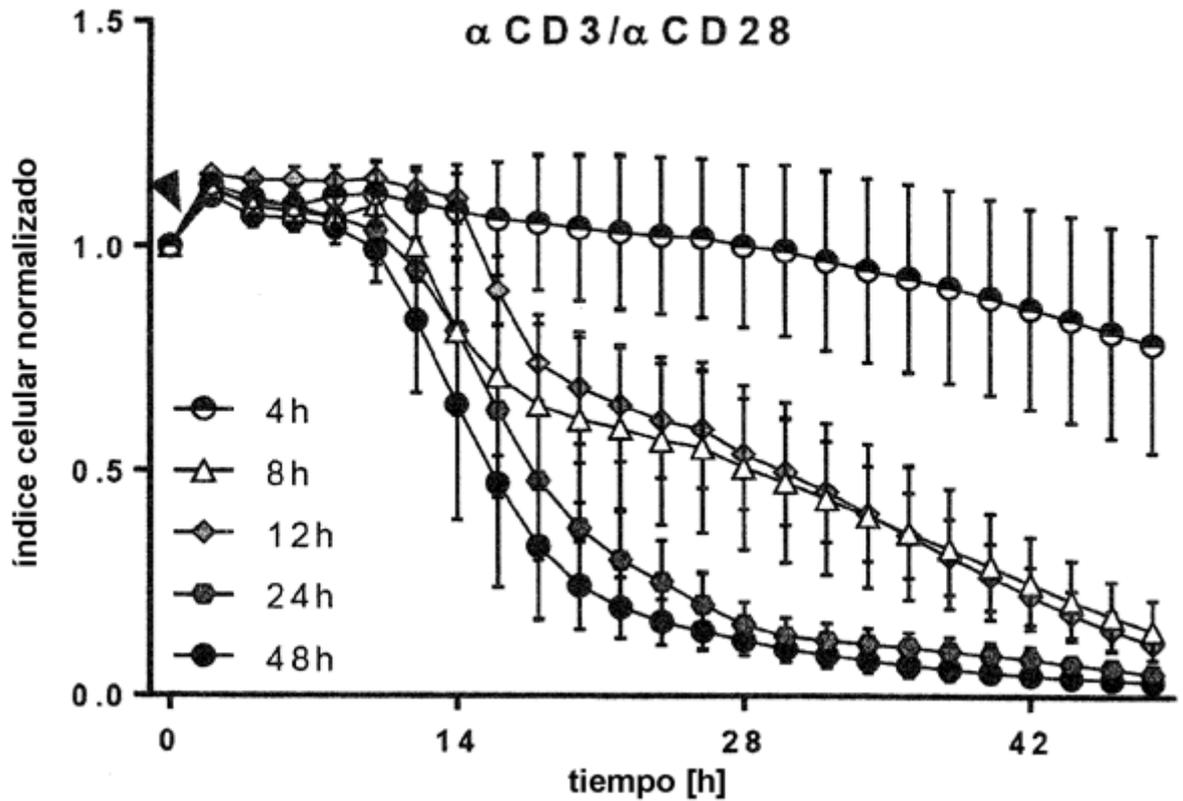


Figura 10

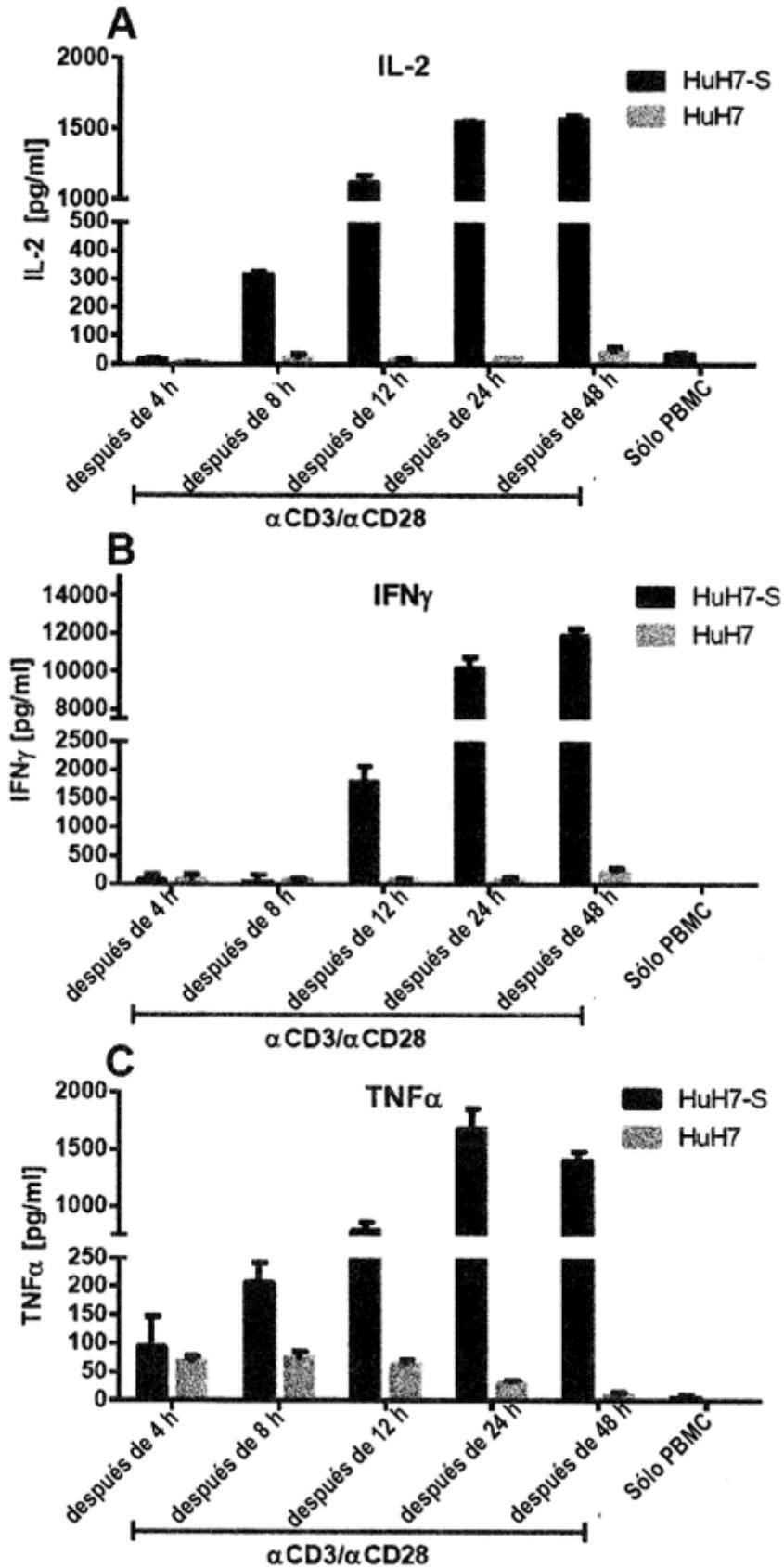


Figura 11

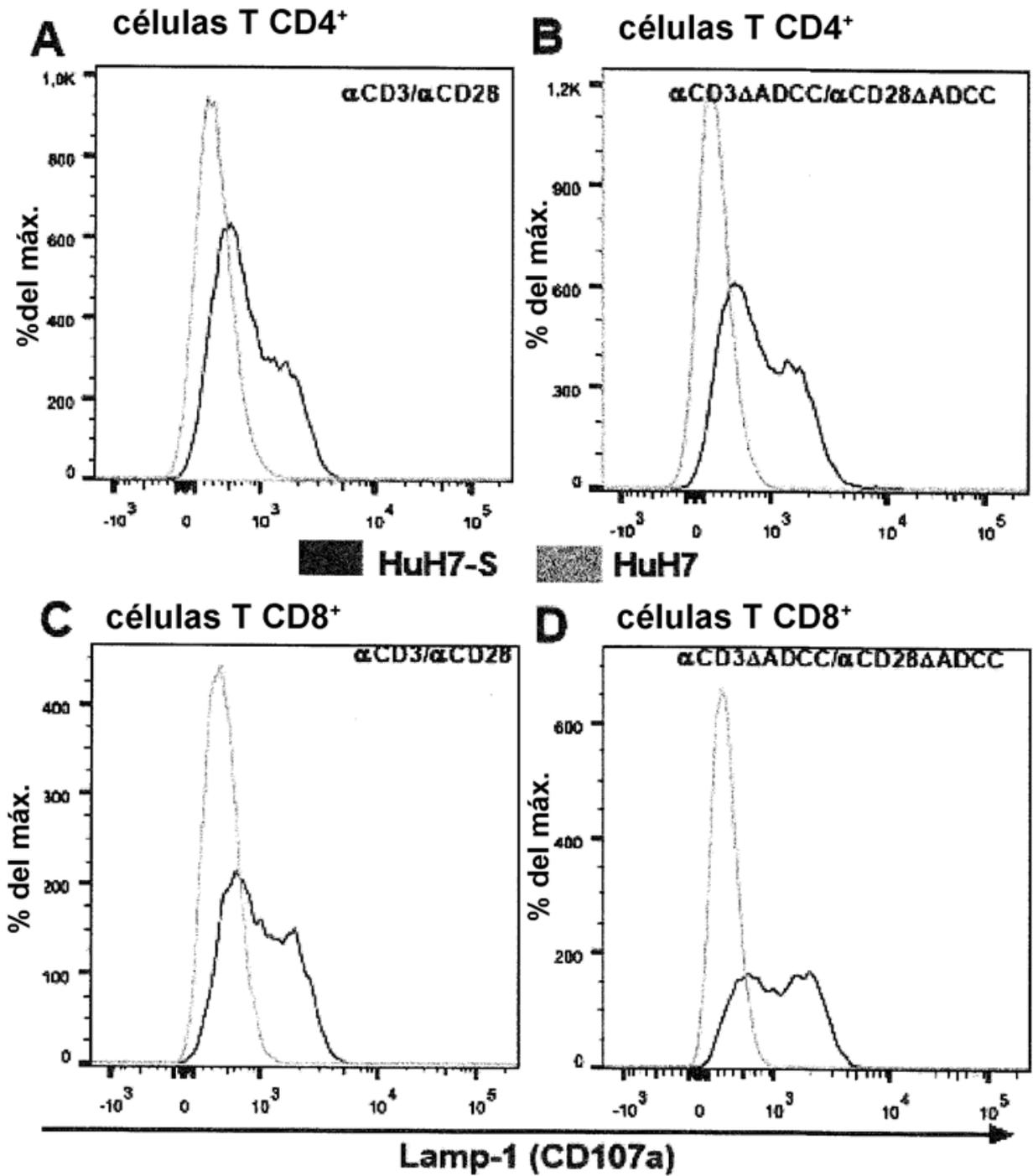


Figura 12

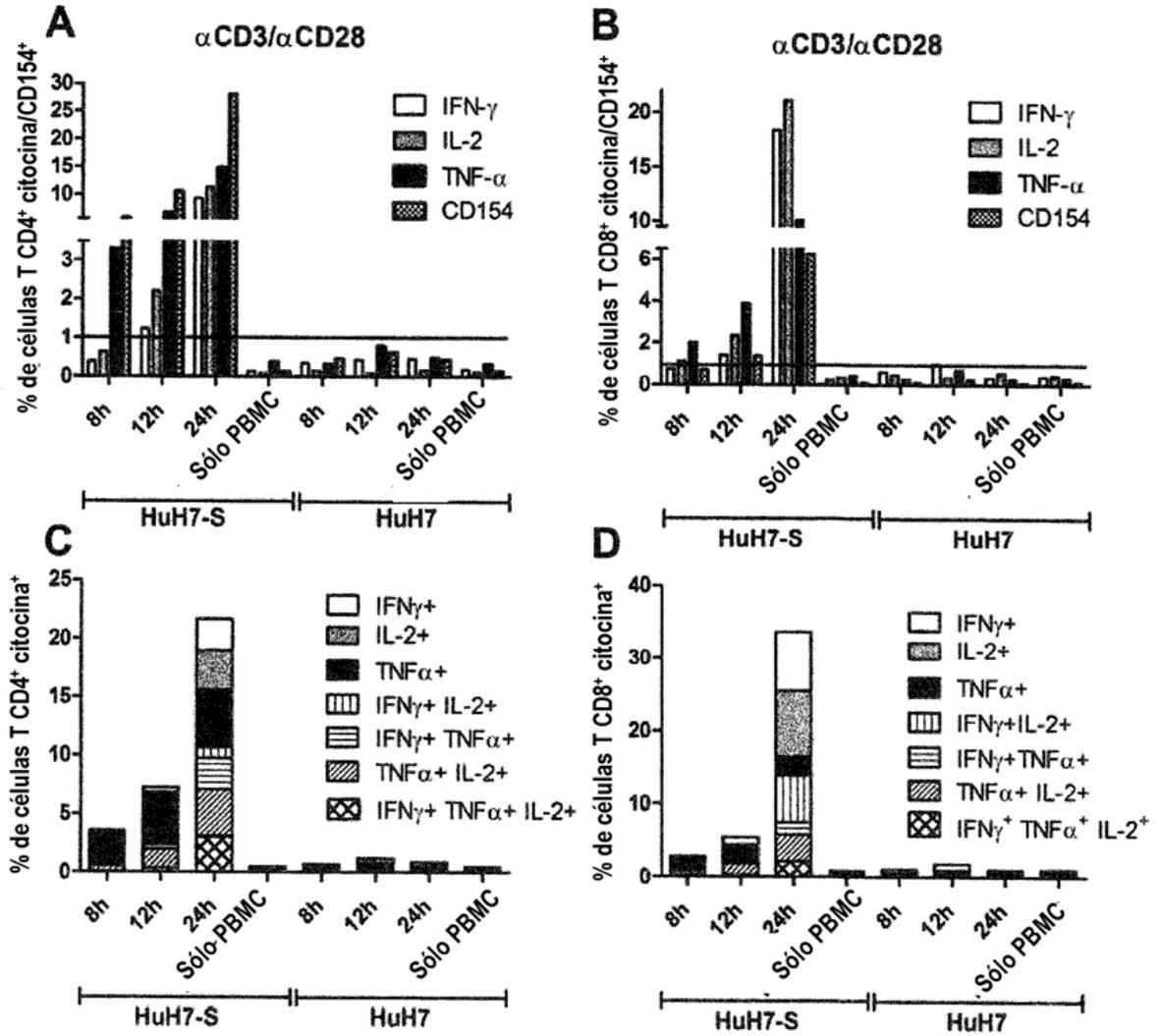


Figura 13

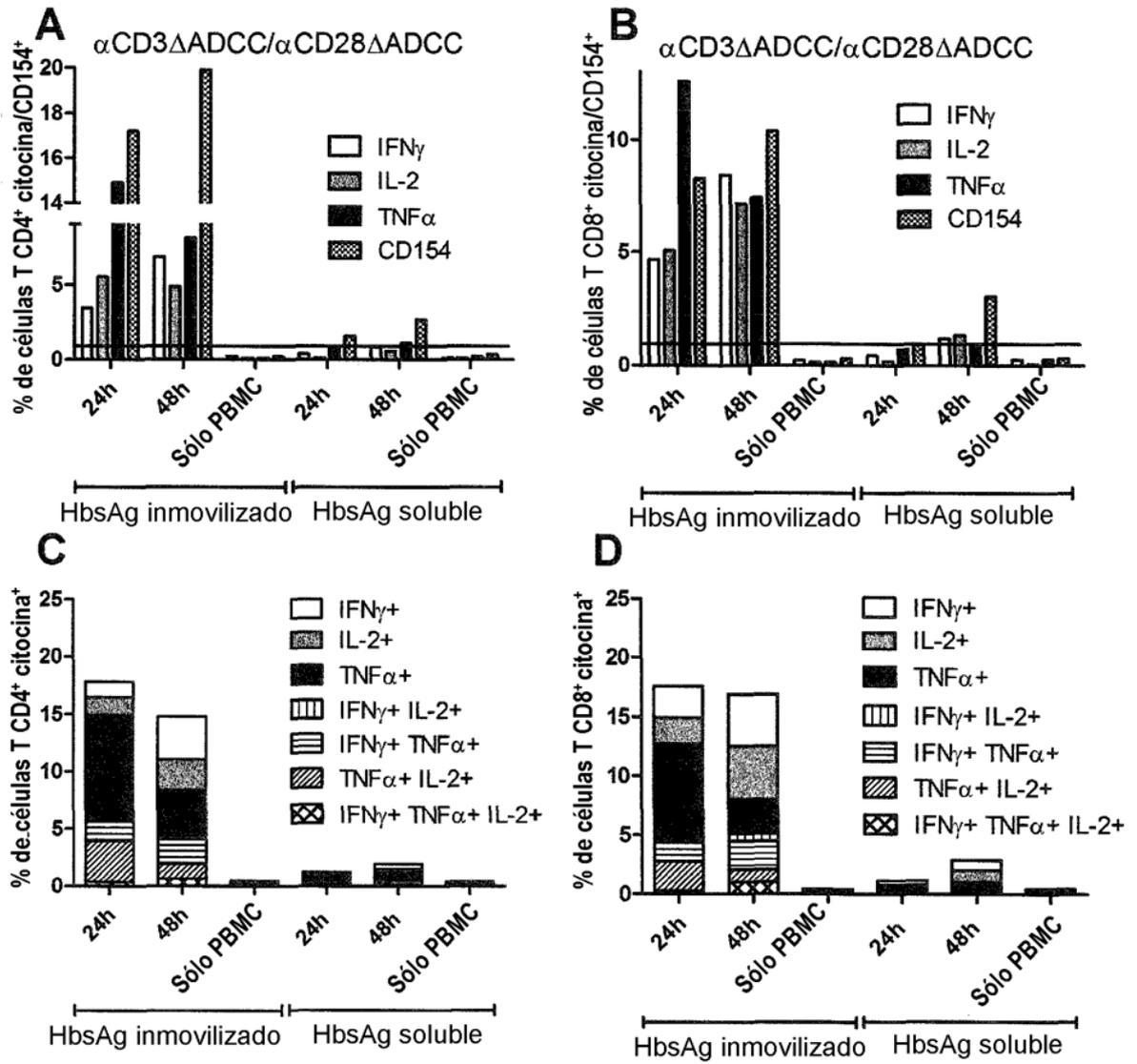


Figura 14

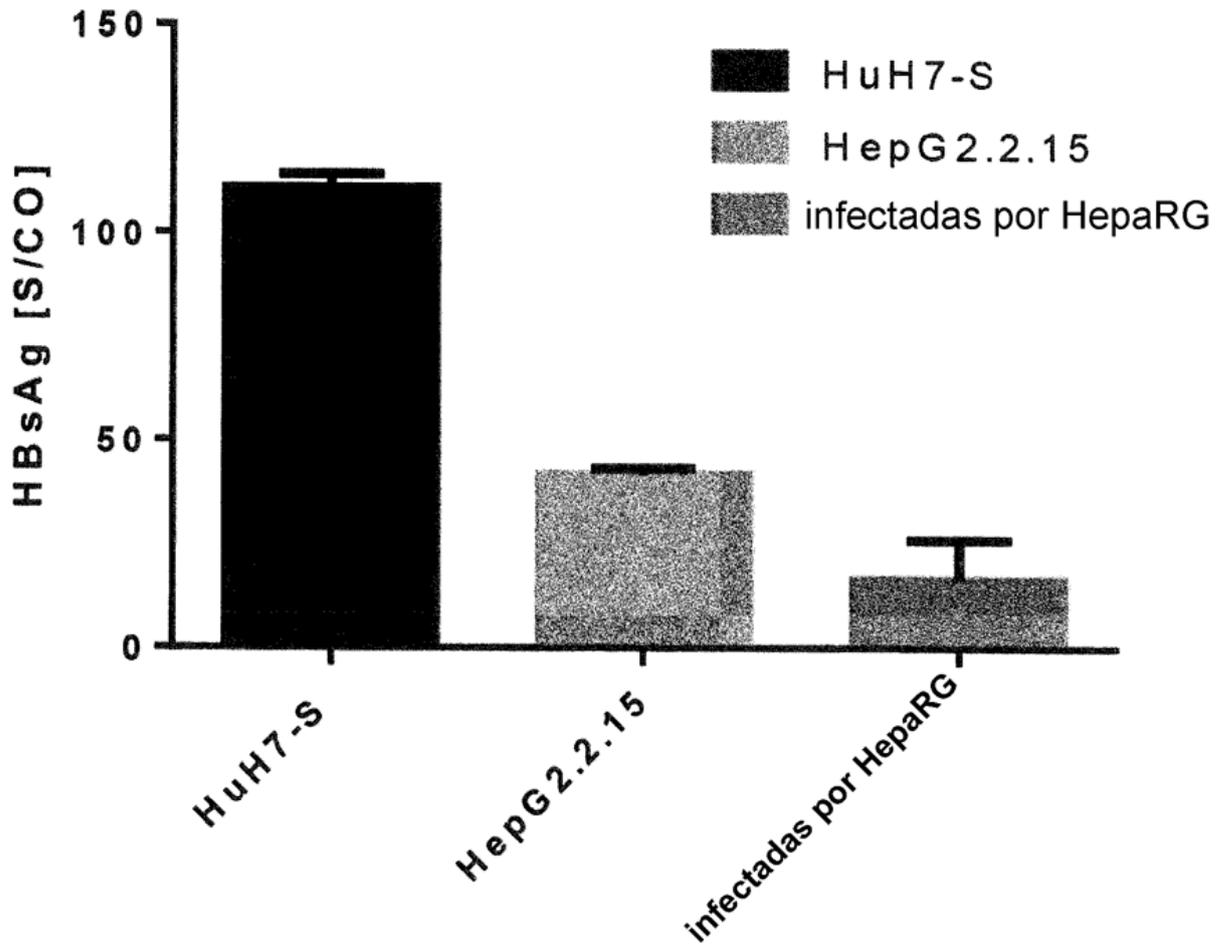


Figura 15

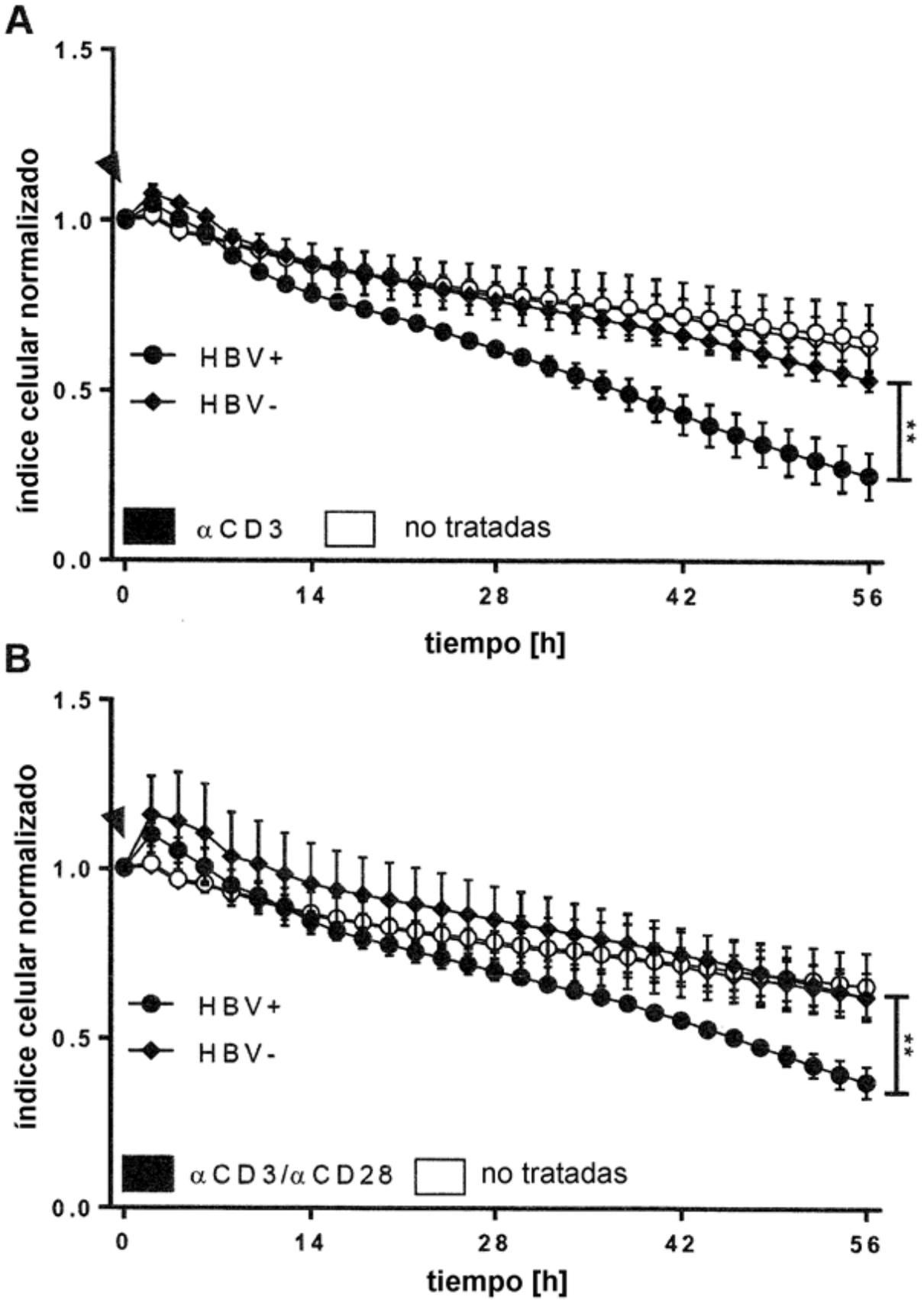
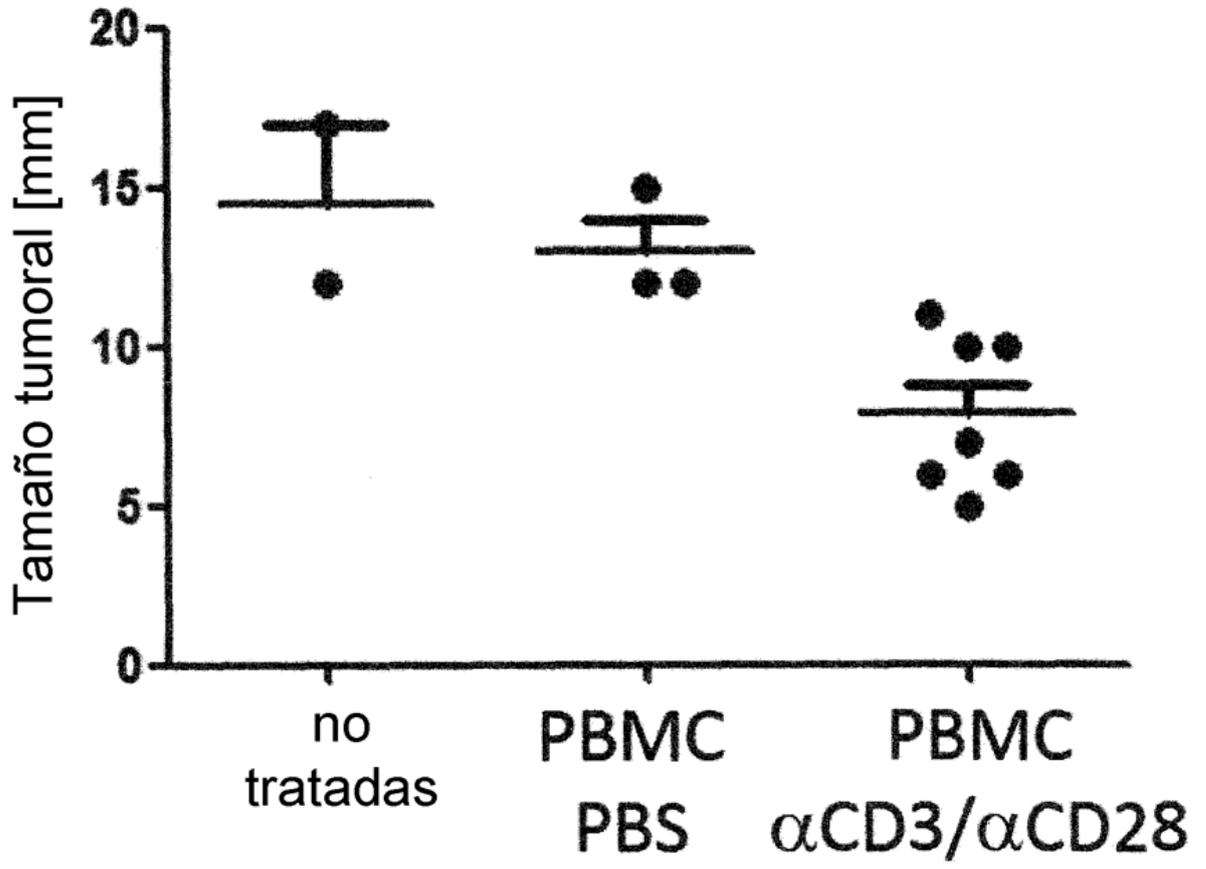


Figura 16



REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

La lista de referencias citadas por el solicitante es, únicamente, para conveniencia del lector. No forma parte del documento de patente europea. Si bien se ha tenido gran cuidado al compilar las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP declina toda responsabilidad a este respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- EP 2524699 A1 [0007]
- WO 8909622 A [0036]
- WO 9110741 A [0036]
- WO 9402602 A [0036]
- WO 9634096 A [0036]
- WO 9633735 A [0036]
- EP 13184635 A [0145]

10

Literatura no patente citada en la descripción

- **GANEM et al.** Hepatitis B virus infection-natural history and clinical consequences. *N Engl J Med*, 2004, vol. 350, 1118-29 [0002]
- **PROTZER et al.** *Nat Immunol Rev*, 2012, vol. 12, 2013-213 [0002]
- **BOHNE et al.** T cells redirected against hepatitis B virus surface proteins eliminate infected hepatocytes. *Gastroenterology*, 2008, vol. 134, 239-247 [0005]
- **KREBS et al.** T Cells Expressing a Chimeric Antigen Receptor That Binds Hepatitis B Virus Envelope Proteins Control Virus Replication in Mice. *Gastroenterology*, 2013 [0005]
- **HARTMANN et al.** Treatment of refractory Hodgkin's disease with an anti-CD16/CD30 bispecific antibody. *Blood*, 1997, vol. 89, 2042-7 [0006]
- **Antibody Engineering.** Humane Press, 2012 [0007]
- **LIAO et al.** *Oncology Reports*, 1996, vol. 3, 637-644 [0008]
- **BOHNE et al.** *Gastroenterology*, 2008, vol. 134, 239 [0009]
- **STIBBE, W. ; W. H. GERLICH.** Structural relationships between minor and major proteins of hepatitis B surface antigen. *J. Virol.*, 1983, vol. 46, 626-628 [0020]
- **SELLRIE et al.** *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, November 2007, vol. 40 (6), 875-880 [0035]
- **KÖHLER ; MILSTEIN.** *Nature*, 1975, vol. 256, 495 [0036]
- **GALFRE.** *Meth. Enzymol.*, 1981, vol. 73, 3 [0036]
- **HARLOW ; LANE.** *Antibodies, A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor, 1988 [0036]
- **SAMBROOK.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, 1989 [0036]
- **BORST, J. et al.** The delta- and epsilon-chains of the human T3/T-cell receptor complex are distinct polypeptides. *Nature*, 1984, vol. 312, 455-458 [0043]
- **LESSLAUER, W. et al.** T90/44 (9.3 antigen). A cell surface molecule with a function in human T cell activation. *Eur. J. Immunol.*, 1986, vol. 16, 1289-1296 [0044]
- **KWON, B.S. et al.** cDNA sequences of two inducible T-cell genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1989, vol. 86, 1963-1967 [0045]
- **ARCH, R. H. et al.** *Mol. Cell. Biol.*, 1998, vol. 18, 558-565 [0046]
- **LANIER, L.L. et al.** Functional properties of a unique subset of cytotoxic CD3+ T lymphocytes that express Fc receptors for IgG (CD16/Leu-11 antigen). *J. Exp. Med.*, 1985, vol. 162, 2089-2106 [0047]
- **LANIER, L.L. et al.** Identity of Leu-19 (CD56) leukocyte differentiation antigen and neural cell adhesion molecule. *J. Exp. Med.*, 1989, vol. 169, 2233-2238 [0048]
- **HOUCHINS, J. et al.** DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells. *J. Exp. Med.*, 1991, vol. 173, 1017-1020 [0049]
- **PENDE, D. et al.** Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *J. Exp. Med.*, 2000, vol. 192, 337-346 [0050]
- **KENNETH MURPHY.** *Janeway's Immunobiology.* Garland Science [0054]
- **WILLIAM E. PAUL.** *Fundamental Immunology.* Lippincott Williams & Wilkins [0054]
- **ARMOUR et al.** Recombinant human IgG molecules lacking Fc gamma receptor I binding and monocyte triggering activities. *Eur. J. Immunol.*, 1999, vol. 29, 2613-2624 [0061]
- **LAZAR et al.** Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2006, vol. 103, 4005-4010 [0061]
- **MCGINNIS ; MADDEN.** *Nucleic Acid Research*, 2004, vol. 32, W20-W25 [0071]
- **NAKABAYASKI et al.** Growth of human hepatoma cell lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res.*, 1982, vol. 42, 3858-3863 [0100]