(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 800 674**

(51) Int. CI.:

C07K 16/46 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/32 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 35/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.03.2015 PCT/US2015/021668**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **24.09.2015 WO15143271**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.03.2015 E 15764568 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.04.2020 EP 3119812**

(54) Título: **Polipéptidos biespecíficos de unión a antígeno**

(30) Prioridad:

21.03.2014 US 201461968437 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.01.2021

(73) Titular/es:

X-BODY, INC. (100.0%)
100 Beaver Street, Suite 101
Waltham, MA 02453, US

(72) Inventor/es:

CHEN, YAN;
WAGNER, RICHARD, W.;
ZHANG, KEMING y
RICHALET, PASCALE

(74) Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

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 biespecíficos de unión a antígeno

Antecedentes

Los polipéptidos biespecíficos de unión a antígeno, tales como anticuerpos y moléculas similares a anticuerpos, son muy prometedores como agentes terapéuticos debido a su capacidad para atacar múltiples antígenos simultáneamente. Sin embargo, la fabricación de estas moléculas es un desafío. En el caso de los anticuerpos biespecíficos, a menudo se produce un mal emparejamiento en las cadenas pesadas y ligeras durante la producción, lo que reduce el rendimiento de los anticuerpos biespecíficos y dificulta la purificación.

Para superar los problemas asociados con la fabricación de anticuerpos biespecíficos, se ha intentado una modificación compleja en las regiones constantes o variables del anticuerpo. Por ejemplo, se han generado anticuerpos biespecíficos en los que las VH y VL de los anticuerpos individuales se fusionan genéticamente a través de un enlazador (véase, por ejemplo, el documento US2010/0254989A1). En otro enfoque, se produjeron anticuerpos individuales con mutaciones en el Fc en residuos de la IgG4 humana responsable del intercambio de Fab (véase, por ejemplo, Van der Neut et al., Science (2007) 317: 1554). En otro enfoque, se emplearon quadromas de ratón para generar anticuerpos biespecíficos. En este enfoque, los anticuerpos de ratón y rata forman predominantemente los emparejamientos VH/VL originales y el anticuerpo biespecífico consiste en el Fc de rata y ratón (véase, por ejemplo, Lindhofer et al., J Immunol. (1995) 155: 1246-1252) También se han preparado polipéptidos biespecíficos de unión a antígeno con dos dominios de cadena pesada fusionados. Están desprovistos de cadenas ligeras de anticuerpos y consisten en un primer dominio VH que se une a un primer antígeno unido en el terminal C a un segundo dominio VH que se une a un segundo antígeno (Laventie B. et al., PNAS (2011) 108 (39): 16404- 16409).

Finalmente, se han generado anticuerpos biespecíficos que usan una única cadena ligera común que no contribuye a la unión al antígeno (véase, por ejemplo, Merchant et al., Nature Biotechnology (1998) 16: 677 - 681). Sin embargo, a pesar de estos extensos esfuerzos de modificación de anticuerpos, los anticuerpos biespecíficos continúan sufriendo una pobre estabilidad y bajos rendimientos de expresión funcional.

Por consiguiente, existe una necesidad en la técnica de nuevos polipéptidos de unión a antígeno que sean altamente expresados y fácilmente purificados.

Sumario de la invención

La presente divulgación proporciona polipéptidos biespecíficos de unión a antígeno que son altamente expresados, fácilmente purificados, altamente estables y tienen una alta afinidad por sus antígenos objetivo. En ciertas realizaciones, los polipéptidos biespecíficos de unión a antígeno se unen tanto a PDGFRβ como a HER2 con alta afinidad y antagonizan tanto la actividad de PDGFRβ como la de HER2. También se divulgan polipéptidos biespecíficos de unión a antígeno que se unen tanto a PDGFRβ como a VEGF con alta afinidad y antagonizan tanto la actividad de PDGFRβ como la de VEGF. La presente divulgación también proporciona nuevos polipéptidos de unión a antígeno (por ejemplo, dominios VH) que se unen específicamente a HER2 y antagonizan la activación de HER2. Tales polipéptidos de unión a antígeno son particularmente útiles para tratar el cáncer. La invención también proporciona ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de unión a antígeno, vectores de expresión recombinante y células huésped para fabricar dichos polipéptidos de unión a antígeno. La invención también abarca una composición farmacéutica que comprende el polipéptido de unión a antígeno de la invención para su uso en el tratamiento del cáncer.

Por consiguiente, en el primer aspecto, la invención proporciona un polipéptido biespecífico de unión a antígeno aislado que comprende una cadena pesada de anticuerpo que comprende un primer dominio VH que se une específicamente al primer antígeno, unido en el terminal C a un segundo dominio VH que se une específicamente a un segundo antígeno, en el que el primer y el segundo antígeno se seleccionan independientemente del grupo que consiste en PDGFRβ y HER2 humanos, en el que uno del primer dominio VH o el segundo dominio VH se une específicamente a HER2 humano y comprende las secuencias de aminoácidos de HCDR3, HCDR2 y HCDR1 seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 1, 2 y 3; 4, 5 y 6; 7, 8 y 9; y 10, 11 y 12, y en las que el polipéptido desprovisto de cadenas ligeras de anticuerpos se une específicamente a PDGFRβ y HER2.

En ciertas realizaciones, la cadena pesada del anticuerpo está genéticamente unida al segundo dominio VH a través de un enlazador de aminoácidos. En una realización particular, el enlazador comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID No: 23.

También se divulga un polipéptido de unión a antígeno que además comprende una cadena ligera de anticuerpo, comprendiendo la cadena ligera un dominio VL que se une específicamente a un antígeno, en el que las cadenas pesada y ligera están emparejadas naturalmente. También se divulga que el dominio VL se une al primer antígeno. Además se divulga que el dominio VL se une a un tercer antígeno. También se divulga que el primer y el tercer

antígenos están en diferentes regiones de la misma molécula. También se divulga que el primer y el tercer antígenos están en una molécula diferente.

En otro aspecto, la invención proporciona un polipéptido de unión a antígeno que comprende un dímero de dos polipéptidos de unión a antígeno del primer aspecto de la invención, los dos polipéptidos de unión a antígeno naturalmente dimerizados a través de las regiones constantes de la cadena pesada.

La invención proporciona un polipéptido de unión a antígeno que comprende un dominio VH que se une específicamente a HER2 humano y comprende una HCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 1, 4, 7 y 10, una HCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 2, 5, 8 u 11, una HCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 3, 6, 9 o 12. Además se divulga que la secuencia de aminoácidos del dominio VH comparte al menos un 80% de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos del dominio VH seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 13, 14, 15 y 16. En ciertas realizaciones, el dominio VH comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 13, 14, 15 y 16.

En ciertas realizaciones, el polipéptido de unión a antígeno que tiene un dominio VH que se une específicamente a PDGFRβ humano y comprende una HCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 25, una HCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 26, una HCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 27. En ciertas realizaciones, el dominio VH comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 24.

En ciertas realizaciones, el polipéptido de unión a antígeno comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 18.

En otro aspecto, la invención proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido de unión a antígeno de la invención.

En otro aspecto, la invención proporciona un vector de expresión recombinante que comprende un ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido de unión a antígeno de la invención.

En otro aspecto, la invención proporciona una célula huésped que expresa un polipéptido de unión a antígeno de la invención.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para producir un polipéptido de unión a antígeno de la invención, que comprende cultivar una célula huésped capaz de expresar un polipéptido de unión de la invención en condiciones tales que el polipéptido de unión a antígeno sea producido por la célula huésped.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de unión a antígeno de la invención y uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica de la invención para usar en el tratamiento del cáncer.

Breve divulgación de los dibujos

La Figura 1 es una representación esquemática de un ejemplo de un polipéptido biespecífico de unión a antígeno descrito aquí.
La Figura 2 es una representación esquemática de un ejemplo de un polipéptido biespecífico de unión a antígeno de la invención.
La Figura 3 es una representación esquemática de un ejemplo de un polipéptido biespecífico de unión a antígeno de la invención.
La figura 4 es una representación esquemática de un ejemplo de un polipéptido de unión a antígeno biespecífico descrito en este documento.
La Figura 5 representa un gel SDS-PAGE de un ejemplo de un polipéptido biespecífico de unión a antígeno de la invención en condiciones reductoras y no reductoras.
La Figura 6 muestra los resultados de un ensayo de ELISA que detecta la expresión de un polipéptido biespecífico de unión a antígeno HER2/PDGFRβ en el sobrenadante de cultivo de células HEK293.
La Figura 7 muestra los resultados de un ensayo de ELISA que mide la unión simultánea del polipéptido biespecífico de unión a antígeno HER2/PDGFRβ a HER2 y PDGFRβ.
La Figura 8 muestra los resultados de un ensayo de unión basado en FACS que mide la unión simultánea del polipéptido biespecífico de unión a antígeno HER2/PDGFRβ a HER2 y PDGFRβ expresados en la superficie celular.
La Figura 9 muestra los resultados del análisis Biacore y FACS de un ejemplo de dominio VH anti-HER2 divulgado en este documento.

La Figura 10 muestra los resultados del análisis Biacore y FACS de un ejemplo de dominio VH anti-HER2 y un derivado de scFv divulgado en el presente documento.
La Figura 11 muestra los resultados de un ensayo de proliferación celular con MTS que mide el efecto de VH B12 anti-HER2, trastuzumab, pertuzumab y combinaciones de los mismos en la proliferación de células SK-BR-3.
La Figura 12 es una representación esquemática de un ejemplo de polipéptido biespecífico de unión a antígeno anti-HER2 divulgado en el presente documento.

Descripción detallada

La presente invención proporciona polipéptidos biespecíficos de unión a antígeno como se define en las reivindicaciones.

Tales polipéptidos de unión a antígeno son particularmente útiles para tratar el cáncer. La invención también proporciona ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de unión a antígeno, vectores de expresión recombinantes y células huésped para fabricar dichos polipéptidos de unión a antígeno. Los polipéptidos de unión a antígeno de la invención para su uso en el tratamiento del cáncer también están abarcados por la invención.

I. Definiciones

Para que la presente invención pueda entenderse más fácilmente, primero se definen ciertos términos.

Como se usa en este documento, el término "PDGFRβ" se refiere al receptor beta del factor de crecimiento derivado de plaquetas. Las secuencias de nucleótidos y polipéptidos de PDGFRβ son bien conocidas en la técnica. Se expone un ejemplo de una secuencia amino de PDGFRβ humano en el depósito del GenBank GI: 4505683 y se expone un ejemplo de una secuencia amino de PDGFRβ de ratón en el depósito del GenBank GI: 226371752.

Como se usa en el presente documento, el término "HER2" se refiere al receptor tirosina-proteína quinasa erbB-2. Las secuencias de nucleótidos y polipéptidos de HER2 son bien conocidas en la técnica. Un ejemplo de una secuencia amino de HER2 humano se expone en el depósito del GenBank GI: 54792096 y un ejemplo de una secuencia amino de HER2 de ratón se expone en el depósito del GenBank GI: 54873610.

Como se usa en el presente documento, el término "VEGF" se refiere a todos los miembros de la familia del factor de crecimiento endotelial vascular, incluyendo los VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, PIGF, proteínas y variantes de empalme de los mismas, incluidos $VEGF_{121}$, $VEGF_{121}$b, $VEGF_{145}$, $VEGF_{165}$, $VEGF_{165}$b, $VEGF_{189}$ y $VEGF_{206}$. Las secuencias de nucleótidos y polipéptidos de VEGF son bien conocidas en la técnica. Un ejemplo de una secuencia amino VEGF humano se expone en el depósito del GenBank GI: 32699990 y un ejemplo de una secuencia amino de VEGF de ratón se expone en el depósito GenBank GI: 160358815.

Como se usa en el presente documento, el término "polipéptido biespecífico de unión a antígeno" se refiere a un polipéptido de unión a antígeno que puede unirse específicamente a dos o más antígenos diferentes simultáneamente.

Como se usa en el presente documento, el término "antígeno" se refiere al sitio de unión o epítopo reconocido por un polipéptido de unión a antígeno.

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a moléculas de inmunoglobulina que comprenden cuatro cadenas de polipéptidos, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro, así como multímeros de las mismas (por ejemplo, IgM) Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (abreviada VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de la cadena pesada comprende tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (abreviada VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de la cadena ligera comprende un dominio (CL1). Las regiones VH y VL se pueden subdividir además en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR).

Como se usa en el presente documento, el término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo incluye cualquier polipéptido o glicoproteína de origen natural, obtenible enzimáticamente, sintético o genéticamente modificado que se une específicamente a un antígeno para formar un complejo. Los fragmentos de unión a antígeno de un anticuerpo pueden derivarse, por ejemplo, de moléculas de anticuerpo completas usando cualquier técnica estándar adecuada tal como digestión proteolítica o técnicas de ingeniería genética recombinante que implican la manipulación y expresión de ADN que codifica los dominios variables y opcionalmente constantes del anticuerpo. Los ejemplos no limitantes de porciones de unión a antígeno incluyen: (i) fragmentos Fab; (ii) fragmentos $F(ab')_2$; (iii) fragmentos Fd; (iv) fragmentos Fv; (v) moléculas de Fv de cadena sencilla (scFv); (vi) fragmentos dAb; y (vii) unidades de reconocimiento mínimo que consisten en los residuos de aminoácidos que imitan la región hipervariable de un anticuerpo (por ejemplo, una región determinante de complementariedad (CDR) aislada). Otras moléculas modificadas, tales como diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y minicuerpos también están incluidos en la expresión "porción de unión a antígeno".

Como se usa en el presente documento, los términos "dominio VH" y "dominio VL" se refieren a dominios pesados y ligeros variables de un solo anticuerpo, respectivamente, que comprenden FR (regiones marco) 1, 2, 3 y 4 y CDR (regiones determinantes de complementariedad) 1, 2 y 3 (véase Kabat et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest. (publicación de los NIH No. 91-3242, Bethesda).

Como se usa en el presente documento, el término "dimerizado naturalmente" se refiere a dímeros de polipéptidos de unión a antígeno, en los que las regiones constantes de la cadena pesada están asociadas de la misma manera que en una molécula de anticuerpo tetramérico de origen natural.

Como se usa en el presente documento, el término "emparejado naturalmente" se refiere a pares de cadenas pesada y ligera de anticuerpo que están asociados a través de la interfaz de interacción natural de cadena pesada/cadena ligera de la misma manera que en una molécula de anticuerpo tetramérica natural.

Como se usa en el presente documento, el término "CDR" o "región determinante de complementariedad" significa los sitios de combinación de antígeno no contiguos encontrados dentro de la región variable de polipéptidos de cadena pesada y ligera. Estas regiones particulares han sido divulgadas por Kabat et al., J. Biol. Chem 252, 6609-6616 (1977). Kabat et al., Sequences of protein of immunological interest. (1991), Chothia et al., J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987), y por MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262: 732-745 (1996) en los que las definiciones incluyen superposición o subconjuntos de residuos de aminoácidos cuando se comparan entre sí. Los residuos de aminoácidos que abarcan las CDR tal como se definen por cada una de las referencias citadas anteriormente se exponen para comparación. Preferiblemente, el término "CDR" es una CDR como lo define Kabat, con base en la comparación de secuencias.

Como se usa en este documento, el término "residuos de aminoácidos de la región marco (FR)" se refiere a aquellos aminoácidos en la región marco de una cadena de inmunoglobulina. El término "región marco" o "región FR" tal como se usa en el presente documento incluye los residuos de aminoácidos que son parte de la región variable, pero no son parte de las CDR (por ejemplo, usando la definición de Kabat de CDR).

Como se usa en este documento, el término "genéticamente enlazado" se refiere al enlace de dos o más polipéptidos usando técnicas de ADN recombinante. En ciertas realizaciones, esto implica la producción de un gen quimérico que codifica una fusión de los dos o más polipéptidos.

Como se usa en el presente documento, el término "se une específicamente a" se refiere a la capacidad de un polipéptido de unión para unirse a un antígeno con una Kd de al menos aproximadamente 1×10^{-6} M, 1×10^{-7} M, 1×10^{-8} M, 1×10^{-9} M, 1×10^{-10} M, 1×10^{-11} M, 1×10^{-12} M, o más, y/o para unirse a un antígeno con una afinidad que es al menos dos veces mayor que su afinidad por un antígeno no específico. Sin embargo, debe entenderse que los polipéptidos de unión son capaces de unirse específicamente a dos o más antígenos que están relacionados en secuencia. Por ejemplo, los polipéptidos de unión de la invención pueden unirse específicamente tanto a un antígeno humano como a un ortólogo no humano de ese antígeno.

Como se usa en el presente documento, el término "vector" pretende referirse a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle circular de ADN bicatenario en el que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, en el que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales en el genoma viral. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episomales de mamífero). Otros vectores (por ejemplo, vectores no episomales de mamífero) pueden integrarse en el genoma de una célula huésped tras la introducción en la célula huésped, y de este modo se replican junto con el genoma huésped. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están unidos operativamente. Dichos vectores se denominan en el presente documento "vectores de expresión recombinantes" (o simplemente, "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante a menudo están en forma de plásmidos. Los términos "plásmido" y "vector" pueden usarse indistintamente. Sin embargo, la invención está destinada a incluir otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (por ejemplo, retrovirus de replicación defectuosa, adenovirus y virus adenoasociados), que cumplen funciones equivalentes.

Como se usa en el presente documento, el término "célula huésped" se refiere a una célula en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante. Debe entenderse que este término está destinado a referirse no solo a células objetivo particulares sino a la progenie de dichas células. Debido a que pueden producirse ciertas modificaciones en las generaciones siguientes debido a mutaciones o influencias ambientales, dicha progenie puede, de hecho, no ser idéntica a la célula madre, pero aún se incluye dentro del alcance del término "célula huésped" como se usa en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, el término "enfermedad o trastorno asociado a PDGFRβ" incluye estados de enfermedad y/o síntomas asociados con la actividad de PDGFRβ. Ejemplos de enfermedades o trastornos asociados con PDGFRβ incluyen, pero no se limitan a, degeneración macular relacionada con la edad (AMD) y cáncer.

Como se usa en el presente documento, el término "enfermedad o trastorno asociado con HER2" incluye estados de enfermedad y/o síntomas asociados con la actividad de HER2. Los ejemplos de enfermedades o trastornos asociados con HER2 incluyen, pero no se limitan a, cáncer (por ejemplo, cáncer de mama y de ovario).

Como se usa en el presente documento, el término "enfermedad o trastorno asociado con VEGF" incluye estados de enfermedad y/o síntomas asociados con la actividad de VEGF. Los ejemplos de enfermedades o trastornos asociados con VEGF incluyen, pero sin limitarse a, afecciones asociadas con la neovascularización, por ejemplo, degeneración macular relacionada con la edad (AMD) y cáncer.

Como se usa en el presente documento, el término "tratar", "que trata" y "tratamiento" se refieren a medidas terapéuticas o preventivas divulgadas en el presente documento. Los métodos de "tratamiento" emplean la administración de un anticuerpo o porción de unión a antígeno de la presente invención a un sujeto, por ejemplo, un sujeto que tiene una enfermedad o trastorno (por ejemplo, cáncer) o predispuesto a tener una enfermedad o trastorno, con el fin de prevenir, curar, retrasar, reducir la gravedad o mejorar uno o más síntomas de la enfermedad o trastorno o enfermedad o trastorno recurrente, o para prolongar la supervivencia de un sujeto más allá de lo esperado en ausencia de dicho tratamiento.

Como se usa en el presente documento, el término "cantidad efectiva" se refiere a esa cantidad de un polipéptido de unión que es suficiente para efectuar el tratamiento, pronóstico o diagnóstico de una enfermedad o trastorno, cuando se administra a un sujeto. Una cantidad terapéuticamente efectiva variará dependiendo del sujeto y la condición de la enfermedad a tratar, el peso y la edad del sujeto, la gravedad de la condición de la enfermedad, la forma de administración y similares, que puede determinar fácilmente un experto en la técnica. Las dosis para la administración pueden variar, por ejemplo, de aproximadamente 1 ng a aproximadamente 10.000 mg, de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 5.000 mg, de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 1.000 mg, o de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 100 mg de un polipéptido de unión de acuerdo con la invención. Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Una cantidad efectiva también es aquella en la que los efectos beneficiosos minimizan y/o compensan los efectos tóxicos o perjudiciales (es decir, efectos secundarios) de un polipéptido de unión.

Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" incluye cualquier animal humano o no humano.

II Polipéptidos de unión a antígeno anti-HER2

En el presente documento se divulgan además polipéptidos de unión a antígeno (por ejemplo, polipéptidos biespecíficos de unión a antígeno, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos) que se unen específicamente a HER2 e inhiben la actividad de HER2. Dichos polipéptidos de unión son particularmente útiles para tratar enfermedades o trastornos asociados con HER2 (por ejemplo, cánceres, tales como cánceres de mama y de ovario).

En general, los polipéptidos de unión a antígeno divulgados comprenden una secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena pesada (HCDR3) que se une específicamente a HER2. Las secuencias de HCDR3 no limitantes adecuadas para su uso en los polipéptidos de unión divulgados en el presente documento incluyen las secuencias de aminoácidos de HCDR3 expuestas en el presente documento en la SEQ ID NOs: 1, 4, 7 o 10. Además se divulga que la secuencia de HCDR3 es una variante de las SEQ ID NOs: 1, 4, 7 o 10 que comprende al menos una (por ejemplo, una, dos, tres, etc.) sustituciones conservadoras de aminoácidos con respecto a las SEQ ID NOs: 1, 4, 7 o 10.

Cualquier polipéptido que pueda incorporar las secuencias de HCDR3 de unión a HER2 divulgadas en el presente documento puede usarse para producir los polipéptidos de unión a antígeno divulgados en el presente documento que incluyen, sin limitación, anticuerpos o fragmentos de los mismos (por ejemplo, dominios VH) y dominios de tipo inmunoglobulina. Los dominios de tipo inmunoglobulina adecuados incluyen, sin limitación, dominios de fibronectina (véase, por ejemplo, Koide et al., (2007), Methods Mol. Biol. 352: 95-109), DARPin (véase, por ejemplo, Stumpp et al,. (2008) Drug Discov. Today 13 (15-16): 695-701), dominios Z de proteína A (véase, Nygren et al., (2008) FEBS J. 275 (11): 2668-76), Lipocalinas (véase, por ejemplo, Skerra et al., (2008) FEBS J. 275 (11): 2677-83), Afilinas (véase, por ejemplo, Ebersbach et al., (2007) J. Mol. Biol. 372 (1): 172- 85), Afitinas (véase, por ejemplo, Krehenbrink et al., (2008). J. Mol. Biol. 383 (5): 1058-68), Avímeros (véase, por ejemplo, Silverman et al., (2005) Nat. Biotechnol.23 (12): 1556-61), Finómeros (véase, por ejemplo, Grabulovski et al., (2007) J Biol Chem 282 (5): 3196-3204), y péptidos del dominio Kunitz (véase, por ejemplo, Nixon et al., (2006) Curr Opin Drug Discov Devel 9 (2): 261-8).

También se divulgan polipéptidos de unión a antígeno que comprenden fragmentos de anticuerpos que comprenden un dominio VH. Las secuencias de aminoácidos de CDR y del dominio VH de la invención se exponen en las Tablas 1 y 2 del presente documento.

Tabla 1. Secuencias de aminoácidos de CDR de ejemplos de dominios VH anti-HER2.

Nombre del clon	CDR3	SEQ ID NO.	CDR2	SEQ ID NO.	CDR1	SEQ ID NO.
B8	WARGSTSPHGLD V	1	WMGWMNPKSGGTYYAQKFQ G	2	GNYMH	3
B12	DPRAATFDY	4	WINPNSGGTYYAQKLQG	5	GYYMH	6
E5	GYGGSGSYLFDY	7	GINWNGGSTGYADSVKG	8	DYGMS	9
H6	GFGGNGSYTTPL	10	GINWNGGSTGYADSVKG	11	DYGMS	12

Tabla 2. Secuencias de aminoácidos de ejemplos de dominios VH anti-HER2.

Nombre del clon	Secuencia de aminoácidos de VH	SEQ ID NO.
B8	EVQLVESGAEVKEPGASVKVSCKSSGYSFTGNYMHWVRQAPGQGLEWMGWMNPKS GGTYYAQKFQGRVTMTWDTSISTAYMELSGLTSDDTAVYYCARWARGSTSPHGLD VWGQGTLVTVSS	13
B12	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNS GGTYYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDPRAATFDYWGQ GTLVTVSS	14
E5	QVQLVESGGGVVRPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMSWVRQAPGKGLEWVSGINWNG GSTGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYHCARGYGGSGSYLFDY WGQGTLVTVSS	15
H6	QVQLVESGGGVVRPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMSWVRQAPGKGLEWVSGINWNG GSTGYADSVKGRFTISRDNAKNFLYLQMNSLRAEDTALYHCARGFGGNGSYTTPL RGQGTMVTVSS	16

Se divulga adicionalmente un dominio VH anti-HER2 que comprende la secuencia de aminoácidos de HCDR3 expuesta en las SEQ ID NOs: 1, 4, 7 o 10, junto con una secuencia de HCDR2 y/o HCDR1 seleccionada independientemente de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCDR2 o HCDR1 de cadena pesada que se muestran en la Tabla 1.

En ciertas realizaciones, los polipéptidos de unión a antígeno comprenden secuencias de aminoácidos de HCDR3, HCDR2 y HCDR1 seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 1, 2 y 3; 4, 5 y 6; 7, 8 y 9; y 10, 11 y 12, respectivamente.

En ciertas realizaciones, los polipéptidos de unión a antígeno comprenden al menos una de las secuencias de aminoácidos de VH expuestas en las SEQ ID NOs: 13, 14, 15 o 16.

Se divulgan adicionalmente polipéptidos de unión a antígeno anti-HER2 que comprenden una o más secuencias de aminoácidos de CDR seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 1-12, en las que las una o más secuencias de aminoácidos de la región CDR comprenden al menos una o más sustituciones conservadoras de aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones conservadoras de aminoácidos). Las sustituciones conservadoras de aminoácidos incluyen la sustitución de un aminoácido en una clase por un aminoácido de la misma clase, en la que una clase se define por las propiedades fisicoquímicos comunes de la cadena lateral de aminoácidos y las altas frecuencias de sustitución en proteínas homólogas que se encuentran en la naturaleza, según se determina, por ejemplo, mediante una matriz de intercambio de frecuencia Dayhoff estándar o una matriz BLOSUM. Se han categorizado seis clases generales de cadenas laterales de aminoácidos e incluyen: Clase I (Cys); Clase II (Ser, Thr, Pro, Ala, Gly); Clase III (Asn, Asp, Gln, Glu); Clase IV (His, Arg, Lys); Clase V (Ile, Leu, Val, Met); y Clase VI (Phe, Tyr, Trp). Por ejemplo, la sustitución de una Asp por otro residuo de clase III tal como Asn, Gln o Glu, es una sustitución conservadora. Por lo tanto, un residuo de aminoácido no esencial predicho en un anticuerpo anti-PDGFRβ se reemplaza preferiblemente con otro residuo de aminoácido de la misma clase. Los métodos para identificar sustituciones conservadoras de aminoácidos que no eliminan la unión al antígeno son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Brummell et al., Biochem. 32: 1180-1187 (1993); Kobayashi et al., Protein Eng. 12 (10): 879-884 (1999) y Burks et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 412-417 (1997), cada uno de los cuales se incorpora en el presente

documento como referencia en su totalidad).

En cierta realización, la presente invención proporciona polipéptidos de unión a antígeno que comprenden una secuencia de aminoácidos de la región VH con aproximadamente 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de la región VH expuesta en las SEQ ID NOs: 13, 14, 15 o 16.

En ciertas realizaciones, los polipéptidos de unión a antígeno se unen a HER2 con una Kd de 1,2 nM. En ciertas realizaciones, los polipéptidos de unión a antígeno se unen a HER2 con una tasa de activación de 1,39 x 10^5 $M^{-1}s^{-1}$ En ciertas realizaciones, los polipéptidos de unión a antígeno se unen a HER2 con una tasa de desactivación de 1,67 x 10^4 s^{-1}. En ciertas realizaciones, los polipéptidos de unión a antígeno se unen a HER2 con un Kd de 0,87 nM cuando se formatean como una molécula de scFv.

En ciertas realizaciones, los polipéptidos de unión a antígeno se unen a un epítopo diferente en HER2 que trastuzumab (CAS # 180288-69-1) y/o pertuzumab (CAS # 380610-27-5). En ciertas realizaciones, los polipéptidos de unión a antígeno se unen al mismo epítopo en HER2 que trastuzumab y/o pertuzumab. En ciertas realizaciones, los polipéptidos de unión a antígeno compiten por unirse a HER2 con trastuzumab y/o pertuzumab.

En ciertas realizaciones, los polipéptidos de unión a antígeno divulgados en el presente documento se internalizan tras la unión a HER2. Además se divulga que el polipéptido de unión a antígeno internalizante está unido a una fracción citotóxica (por ejemplo, un agente anticancerígeno). Las fracciones citotóxicas no limitantes adecuadas se divulgan en el presente documento.

La presente divulgación proporciona polipéptidos de unión a antígeno que se unen al mismo epítopo en HER2 y/o compiten en forma cruzada con un polipéptido de unión a antígeno que comprende la secuencia de aminoácidos del dominio VH expuesta en las SEQ ID NOs: 13, 14, 15, o 16. Tales anticuerpos pueden identificarse usando ensayos de unión competitiva de rutina que incluyen, por ejemplo, ensayos de competencia basados en resonancia de plasmón superficial (SPR).

III. Polipéptidos biespecíficos de unión a antígeno

En otro aspecto, la presente invención proporciona polipéptidos biespecíficos de unión a antígeno que se unen específicamente a un primer y segundo antígeno objetivo. En general, los polipéptidos biespecíficos de unión a antígeno de la invención carecen de cadenas ligeras de anticuerpos y comprenden una cadena pesada de anticuerpo, la cadena pesada comprende un primer dominio VH que se une específicamente al primer antígeno, en el que la cadena pesada esta unida en el terminal C a un segundo dominio VH que se une específicamente a un segundo antígeno en el que el primer y segundo antígeno se seleccionan independientemente del grupo que consiste en PDGFRβ y HER2 humanos, en el que uno del primer dominio VH o el segundo dominio VH se une específicamente a HER2 humano y comprende secuencias de aminoácidos de HCDR3, HCDR2 y HCDR1 seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 1, 2 y 3; 4, 5 y 6; 7, 8 y 9; y 10, 11 y 12, y en las que el polipéptido desprovisto de cadenas ligeras de anticuerpos se une específicamente a PDGFRβ y HER2.

La cadena pesada del anticuerpo puede unirse al segundo dominio VH utilizando medios reconocidos en la técnica (químicos y/o genéticos). En ciertas realizaciones, la cadena pesada del anticuerpo y el segundo dominio VH están genéticamente unidos. El aminoácido del terminal C de la cadena pesada del anticuerpo está unido al aminoácido del terminal N del segundo dominio VH. Este enlace puede ser directo o mediante un enlazador. En una realización, la cadena pesada del anticuerpo está unida al aminoácido del terminal N del segundo dominio VH a través de un enlazador de aminoácidos que comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID No: 23.

En ciertas realizaciones, los polipéptidos biespecíficos de unión a antígeno son dímeros de dos cadenas pesadas de anticuerpo, cada cadena pesada de anticuerpo comprende un primer dominio VH que se une específicamente al primer antígeno, y en el que cada cadena pesada de anticuerpo está unida a un segundo dominio VH que se une específicamente a un segundo antígeno. Las dos cadenas pesadas de anticuerpo en el dímero se asocian a través de la interfaz natural del dímero de cadena pesada de la misma manera que ocurre la asociación en una molécula de anticuerpo tetramérico natural. Los ejemplos de polipéptidos biespecíficos de unión a antígeno que tienen esta estructura se representan en las Figuras 2 y 3 del presente documento.

Se divulgan también polipéptidos biespecíficos de unión a antígeno que además comprenden una cadena ligera de anticuerpo. También se divulga que la cadena ligera se empareja naturalmente con la cadena pesada a través de la interfaz natural del dímero de cadena ligera/cadena pesada, de la misma manera que este emparejamiento se produce en una molécula de anticuerpo tetramérico de origen natural. Los ejemplos de polipéptidos biespecíficos de unión a antígeno que tienen esta estructura se representan en las Figuras 1 y 4 de este documento.

El primer y segundo antígenos pueden ser iguales o diferentes. Si los antígenos son diferentes, pueden estar en diferentes regiones de la misma molécula o en diferentes moléculas. En ciertas realizaciones, el primer y segundo antígenos son receptores de la superficie celular. En ciertas realizaciones, el primer antígeno es PDGFRβ o HER2 (por ejemplo, PDGFRβ o HER2 humano). En ciertas realizaciones, el segundo antígeno es PDGFRβ o HER2 (por ejemplo, PDGFRβ o HER2 humano). En una realización particular, el primer antígeno es PDGFRβ y el segundo antígeno es HER2. En otra realización particular, el primer antígeno es HER2 y el segundo antígeno es PDGFRβ.

También se divulga que un antígeno (el primer o segundo antígeno) es un receptor de la superficie celular y un antígeno (primero o segundo) es un ligando (por ejemplo, un factor de crecimiento, tal como VEGF, PDGF o EGF). También se divulga que el primer antígeno es PDGFRβ o VEGF (por ejemplo, PDGFRβ o VEGF humano). También se divulga que el segundo antígeno es PDGFRβ o VEGF (por ejemplo, PDGFRβ o VEGF humano). También se divulga que el primer antígeno es PDGFRβ y el segundo antígeno es VEGF. También se divulga que el primer antígeno es VEGF y el segundo antígeno es PDGFRβ. Dichos polipéptidos biespecíficos de unión a antígeno son particularmente útiles para tratar trastornos asociados con PDGFRβ y VEGF, tales como AMD y cáncer.

El primer y tercer antígenos pueden estar en diferentes regiones de la misma molécula o en diferentes moléculas. También se divulga que la cadena ligera se une al primer antígeno y las cadenas pesada y ligera cooperan para crear un único sitio de unión para el segundo antígeno. También se divulga que la cadena ligera se une a un tercer antígeno. Cabe señalar que si el primer, segundo y tercer antígenos son diferentes, esto permite la producción de polipéptidos de unión a antígeno con tres especificidades. Dichas moléculas también se divulgan.

Los ejemplos de secuencias de aminoácidos de la cadena pesada, cadena ligera, dominio VH, dominio VL y CDR del anticuerpo se exponen en las Tablas 1-4 de este documento.

También se divulga que el polipéptido biespecífico de unión a antígeno comprende un dominio VH anti-PDGFRβ divulgado en este documento (por ejemplo, como se expone en la SEQ ID No: 24) y los dominios VH y VL de un anticuerpo que se une a una proteína receptora de la familia EGFR (por ejemplo, EGFR, HER2, HER3 y/o HER4). Los anticuerpos terapéuticos divulgados a partir de los cuales se pueden obtener los dominios VH y VL incluyen, sin limitación, Trastuzumab (CAS # 180288-69-1), Pertuzumab (CAS # 380610-27-5) y Cetuximab (CAS # 205923-56-4) En una realización particular, el polipéptido biespecífico de unión a antígeno se formatea como se expone en la Figura 4.

También se divulga que el polipéptido biespecífico de unión a antígeno comprende un dominio VH anti-HER2 descrito en el presente documento (por ejemplo, los expuestos en las SEQ ID Nos: 13-16) y el VH y VL de un anticuerpo que se une a un miembro de la familia EGFR (por ejemplo, EGFR, HER2, HER3 y/o HER4). Los anticuerpos terapéuticos divulgados a partir de los cuales se pueden obtener los dominios VH y VL incluyen, sin limitación, Trastuzumab (CAS # 180288-69-1), Pertuzumab (CAS # 380610-27-5) y Cetuximab (CAS # 205923-56-4) También se divulga que el polipéptido biespecífico de unión a antígeno está formateado como se expone en la Figura 12.

Tabla 3. Secuencias de aminoácidos de CDR, VH y VL de ejemplos divulgados de dominios VH y VL anti-PDGFRβ

Identificador	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO.
XB2202 VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVRVSCKASGGTFSRHAISWVRQAPGQ GLEWIGGILPILKTPNYAQRFQGRVTINADESTSTVYMEMSSL RSEDTAVYYCATHGGDRSYWGQGTLVTVSS	24
XB2202 HCDR3	HGGDRSY	25
XB2202 HCDR2	GILPILKTPNYAQRFQG	26
XB2202 HCDR1	RHAIS	27
A4 VL	DVVMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNWLNWYQQKPGKA PKLLIYEASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATY YCQQYNNVLRTFGQGTKVEIK	28
A4 LCDR3	QQYNNVLRT	29
A4 LCDR3	EASNLET	30
A4 LCDR3	QASQDISNWLN	31

Tabla 4. Secuencias de aminoácidos de cadena pesada y de cadena ligera de ejemplos divulgados de polipéptidos biespecíficos de unión a antígeno

Nombre del clon	Secuencia de aminoácidos (secuencia señal subrayada)	SEQ ID NO.
Cadena pesada del formato 1 y 2	METDTLLLWVLLLWVPGSTGQVQLVQSGAEVKKPGSSVRVSCKASGGTFSRHAIS WVRQAPGQGLEWIGGILPILKTPNYAQRFQGRVTINADESTSTVYMEMSSLRSED TAVYYCATHGGDRSYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ	17
	DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGA EVKEPGASVKVSCKSSGYSFTGNYMHWVRQAPGQGLEWMGWMNPKSGGTYYAQKF QGRVTMTWDTSISTAYMELSGLTSDDTAVYYCARWARGSTSPHGLDVWGQGTLVT VSS	
Cadena pesada del formato 1 y 2 menos la secuencia señal	QVQLVQSGAEVKKPGSSVRVSCKASGGTFSRHAISWVRQAPGQGLEWIGGILPIL KTPNYAQRFQGRVTINADESTSTVYMEMSSLRSEDTAVYYCATHGGDRSYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCD KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGAEVKEPGASVKVSCKSSGYSF TGNYMHWVRQAPGQGLEWMGWMNPKSGGTYYAQKFQGRVTMTWDTSISTAYMELS GLTSDDTAVYYCARWARGSTSPHGLDVWGQGTLVTVSS	18
Cadena pesada del formato 3	METDTLLLWVLLLWVPGSTGEVQLVESGAEVKEPGASVKVSCKSSGYSFTGNYMH WVRQAPGQGLEWMGWMNPKSGGTYYAQKFQGRVTMTWDTSISTAYMELSGLTSDD TAVYYCARWARGSTSPHGLDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQ LVQSGAEVKKPGSSVRVSCKASGGTFSRHAISWVRQAPGQGLEWIGGILPILKTP NYAQRFQGRVTINADESTSTVYMEMSSLRSEDTAVYYCATHGGDRSYWGQGTLVT VSS	19
Cadena pesada del formato 3 menos la secuencia señal	EVQLVESGAEVKEPGASVKVSCKSSGYSFTGNYMHWVRQAPGQGLEWMGWMNPKS GGTYYAQKFQGRVTMTWDTSISTAYMELSGLTSDDTAVYYCARWARGSTSPHGLD VWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGSSVRVSCK ASGGTFSRHAISWVRQAPGQGLEWIGGILPILKTPNYAQRFQGRVTINADESTST VYMEMSSLRSEDTAVYYCATHGGDRSYWGQGTLVTVSS	20
Cadena ligera del formato 1	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDVVMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNWLNW YQQKPGKAPKLLIYEASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQ YNNVLRTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	21

Nombre del clon	Secuencia de aminoácidos (secuencia señal subrayada)	SEQ ID NO.
Cadena ligera del formato 1 menos la secuencia señal	DVVMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNWLNWYQQKPGKAPKLLIYEASNLE TGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQYNNVLRTFGQGTKLEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	22
Enlazador de cadena pesada	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	23

En ciertas realizaciones, los polipéptidos biespecíficos de unión a antígeno de la invención comprenden un primer dominio VH y/o un segundo dominio VH que se une específicamente a HER2 humano. Además se divulga que el dominio VH anti-HER2 comprende la secuencia de aminoácidos de HCDR3 expuesta en las SEQ ID NOs: 1, 4, 7 o 10, junto con una secuencia de HCDR2 y/o HCDR1 seleccionada independientemente de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCDR2 o HCDR1 de cadena pesada que se exponen en la Tabla 1. El dominio VH anti-HER2 comprende secuencias de aminoácidos de HCDR3, HCDR2 y HCDR1 seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 1, 2 y 3; 4, 5 y 6; 7, 8 y 9; y 10, 11 y 12, respectivamente. En ciertas realizaciones, el dominio VH anti-HER2 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NOs: 13, 14, 15 o 16.

En ciertas realizaciones, los polipéptidos biespecíficos de unión a antígeno de la invención comprenden un primer dominio VH o un segundo dominio VH que se une específicamente a PDGFRβ humano. Cualquier dominio VH que se una a PDGFRβ puede usarse en los métodos de la invención. Los dominios VH adecuados incluyen los expuestos en la solicitud de los Estados Unidos No. 13/705.978 presentada el 5 de diciembre de 2012. En ciertas realizaciones, el dominio VH anti-PDGFRβ comprende la secuencia de aminoácidos de HCDR3 expuesta en la SEQ ID NO: 25. En ciertas realizaciones, el dominio VH anti-PDGFRβ comprende las secuencias de aminoácidos de HCDR3, HCDR2 y HCDR1 expuestas en las SEQ ID NOs: 25, 26 y 27, respectivamente. En ciertas realizaciones, el dominio VH anti-PDGFRβ comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 24.

También se divulgan polipéptidos biespecíficos de unión a antígeno de la invención que comprenden un VL que se une específicamente a PDGFRβ humano. Los dominios VL divulgados incluyen los expuestos en la solicitud de los Estados Unidos No. 13/705.978 presentada el 5 de diciembre de 2012. En ciertas realizaciones, el dominio VH anti-PDGFRβ comprende la secuencia de aminoácidos de HCDR3 expuesta en la SEQ ID NO: 25. También se divulga un dominio VL anti-PDGFRβ que comprende las secuencias de aminoácidos de HCDR3, HCDR2 y HCDR1 expuestas en las SEQ ID NOs: 29, 30 y 31, respectivamente. También se divulga un dominio VL anti-PDGFRβ que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 28.

En una realización particular, los polipéptidos biespecíficos de unión a antígeno de la invención comprenden la cadena pesada expuesta en las SEQ ID NOs: 18 o 20.

Se divulgan adicionalmente polipéptidos biespecíficos de unión a antígeno que comprenden la cadena ligera de anticuerpo expuesta en la SEQ ID NO: 22.

Se divulgan también polipéptidos biespecíficos de unión a antígeno que comprenden uno o más de CDR, dominio VH, dominio VL, cadena pesada o cadena ligera que comprenden al menos una o más sustituciones conservadoras de aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, etc., sustituciones conservadoras de aminoácidos). Las sustituciones conservadoras de aminoácidos incluyen la sustitución de un aminoácido en una clase por un aminoácido de la misma clase, en la que una clase se define por las propiedades fisicoquímicas comunes de la cadena lateral de aminoácidos y las altas frecuencias de sustitución en proteínas homólogas que se encuentran en la naturaleza, según se determina, por ejemplo, mediante una matriz de intercambio de frecuencia Dayhoff estándar o una matriz BLOSUM. Se han categorizado seis clases generales de cadenas laterales de aminoácidos e incluyen: Clase I (Cys); Clase II (Ser, Thr, Pro, Ala, Gly); Clase III (Asn, Asp, Gln, Glu); Clase IV (His, Arg, Lys); Clase V (Ile, Leu, Val, Met); y Clase VI (Phe, Tyr, Trp). Por ejemplo, la sustitución de una Asp por otro residuo de clase III tal como Asn, Gln o Glu, es una sustitución conservadora. Por lo tanto, un residuo de aminoácido no esencial predicho en un anticuerpo anti-PDGFRβ se reemplaza preferiblemente con otro residuo de aminoácido de la misma clase. Los métodos para identificar sustituciones conservadoras de aminoácidos que no eliminan la unión al antígeno son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Brummell et al., Biochem. 32: 1180-1187 (1993); Kobayashi et al., Protein Eng. 12 (10): 879-884 (1999), y Burks et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 412-417 (1997)).

Se divulgan también polipéptidos biespecíficos de unión a antígeno que comprenden secuencias de aminoácidos de CDR, dominio VH, dominio VL, cadena pesada o cadena ligera con aproximadamente 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85 %, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de identidad de

aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de CDR, dominio VH, dominio VL, cadena pesada o cadena ligera divulgadas en el presente documento.

IV. Polipéptidos modificados de unión a antígeno

En ciertas realizaciones, los polipéptidos de unión a antígeno de la invención pueden comprender una o más modificaciones. Las formas modificadas de polipéptidos de unión a antígeno de la invención pueden elaborarse usando cualquiera de las técnicas conocidas en el arte.

i) Reducción de la inmunogenicidad

En ciertas realizaciones, los polipéptidos de unión a antígeno (por ejemplo, polipéptidos biespecíficos de unión a antígeno) de la invención se modifican para reducir su inmunogenicidad usando técnicas reconocidas en el arte. Por ejemplo, los anticuerpos, o fragmentos de los mismos, pueden ser quimerizados, humanizados y/o desinmunizados.

También se divulgan un anticuerpo, o fragmentos de unión a antígeno del mismo, que pueden ser quiméricos. Un anticuerpo quimérico es un anticuerpo en el que diferentes porciones del anticuerpo se derivan de diferentes especies animales, tales como anticuerpos que tienen una región variable derivada de un anticuerpo monoclonal murino y una región constante de inmunoglobulina humana. Los métodos para producir anticuerpos quiméricos, o fragmentos de los mismos, son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Morrison, Science 229: 1202 (1985); Oi et al., BioTechniques 4: 214 (1986); Gillies et al., J. Immunol. Methods 125: 191-202 (1989); las patentes de los Estados Nos. 5.807.715; 4.816.567; y 4.816.397. Las técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos" (Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 851-855 (1984); Neuberger et al., Nature 312: 604-608 (1984); Takeda et al. al., Nature 314: 452-454 (1985)) pueden emplearse para la síntesis de dichas moléculas. Por ejemplo, una secuencia genética que codifica una especificidad de unión de una molécula de anticuerpo anti-PDGFRβ de ratón puede fusionarse junto con una secuencia de una molécula de anticuerpo humana de actividad biológica apropiada. Como se usa en el presente documento, un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes porciones se derivan de diferentes especies animales, tales como aquellas que tienen una región variable derivada de un anticuerpo monoclonal murino y una región constante de inmunoglobulina humana, por ejemplo, anticuerpos humanizados.

También se divulgan un anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, que se humaniza. Los anticuerpos humanizados tienen una especificidad de unión que comprende una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) de un anticuerpo no humano y regiones marco de una molécula de anticuerpo humana. A menudo, los residuos marco en las regiones marco humanas se sustituirán con el residuo correspondiente del anticuerpo donante de CDR para alterar, y preferiblemente mejorar, la unión al antígeno. Estas sustituciones marco se identifican por métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, modelando las interacciones de la CDR y los residuos marco para identificar los residuos marco importantes para la unión al antígeno y la comparación de secuencias para identificar residuos marco inusuales en posiciones particulares (véase, por ejemplo, Queen et al., patente de los Estados Unidos No. 5.585.089; Riechmann et al., Nature 332: 323 (1988)). Los anticuerpos se pueden humanizar usando una variedad de técnicas conocidas en el arte, que incluyen, por ejemplo, injerto de CDR (documento EP 239.400; publicación PCT WO 91/09967; patentes de los Estados Unidos Nos. 5.225.539; 5.530.101 y 5.585.089), revestimiento o recubrimiento (documentos EP592.106; EP519.596; Padlan, Molecular Immunology 28 (4/5): 489-498 (1991); Studnicka et al., Protein Engineering 7 (6): 805-814 (1994); Roguska et al., PNAS 91: 969-973 (1994)), y arrastre de cadenas (patente de los Estados Unidos No. 5.565.332).

Se divulga adicionalmente que la desinmunización se puede usar para disminuir la inmunogenicidad de los polipéptidos de unión a antígeno de PDGFRβ (por ejemplo, anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo). Como se usa en el presente documento, el término "desinmunización" incluye la alteración del polipéptido (por ejemplo, un anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo) para modificar los epítopos de células T (véase, por ejemplo, los documentos WO9852976A1, WO0034317A2). Por ejemplo, las secuencias VH y VL del anticuerpo inicial específico de PDGFRβ, o una porción de unión a antígeno del mismo, se pueden analizar y se puede generar un "mapa" de epítopos de células T humanas de cada región V que muestra la ubicación de los epítopos en relación con las regiones determinantes de complementariedad (CDR) y otros residuos clave dentro de la secuencia. Los epítopos de células T individuales del mapa de epítopos de células T se analizan con el fin de identificar sustituciones de aminoácidos alternativas con un bajo riesgo de alterar la actividad del anticuerpo final. Se diseña una gama de secuencias alternativas de VH y VL que comprenden combinaciones de sustituciones de aminoácidos y estas secuencias se incorporan posteriormente en una gama de polipéptidos de unión a antígeno para su uso en los métodos de diagnóstico y tratamiento divulgados en el presente documento, que luego se prueban para su función. Los genes completos de la cadena pesada y ligera que comprenden regiones V y C humana modificadas se clonan luego en vectores de expresión y los plásmidos posteriores se introducen en líneas celulares para la producción de anticuerpos completos. Los anticuerpos luego se comparan en ensayos bioquímicos y biológicos apropiados, y se identifica la variante óptima.

ii) Funciones efectoras y modificaciones de Fc

Los polipéptidos de unión a antígeno de la invención generalmente comprenden una región constante de anticuerpo (por ejemplo, una región constante de IgG, por ejemplo, una región constante de IgG humana, por ejemplo, una región

constante de IgG1, 2, 3 o 4 humana) que media una o más funciones efectoras. Por ejemplo, la unión del componente C1 del complemento a una región constante de anticuerpo puede activar el sistema del complemento. La activación del complemento es importante en la opsonización y la lisis de los patógenos celulares. La activación del complemento también estimula la respuesta inflamatoria y también puede estar involucrada en la hipersensibilidad autoinmune. Además, los anticuerpos se unen a receptores en diversas células a través de la región de Fc, con un sitio de unión al receptor de Fc en la región de Fc del anticuerpo que se une a un receptor de Fc (FcR) en una célula. Hay una serie de receptores de Fc que son específicos para diferentes clases de anticuerpos, que incluyen IgG (receptores gamma), IgE (receptores épsilon), IgA (receptores alfa) e IgM (receptores mu). La unión del anticuerpo a los receptores de Fc en las superficies celulares desencadena una cantidad de respuestas biológicas importantes y diversas que incluyen la absorción y destrucción de partículas recubiertas de anticuerpos, la eliminación de complejos inmunes, la lisis de las células objetivo recubiertas de anticuerpos por células asesinas (llamada citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC), liberación de mediadores inflamatorios, transferencia placentaria y control de la producción de inmunoglobulinas. En realizaciones preferidas, los polipéptidos de unión a antígeno de la invención se unen a un receptor de Fc-gamma. En realizaciones alternativas, los polipéptidos de unión a antígeno de la invención pueden comprender una región constante que carece de una o más funciones efectoras (por ejemplo, actividad de ADCC) y/o no puede unirse al receptor de Fcγ.

Ciertas realizaciones de la invención incluyen polipéptidos de unión a antígeno en los que se ha eliminado o alterado al menos un aminoácido en uno o más de los dominios de la región constante para proporcionar características bioquímicas deseadas tales como funciones efectoras reducidas o potenciadas, la capacidad de dimerizar de forma no covalente, mayor capacidad de localización en el sitio de un tumor, vida media reducida en suero o vida media aumentada en suero cuando se compara con un anticuerpo completo no alterado de aproximadamente la misma inmunogenicidad. Por ejemplo, ciertos anticuerpos, o fragmentos de los mismos, para su uso en los métodos de diagnóstico y tratamiento descritos en el presente documento son anticuerpos con dominio eliminado que comprenden una cadena de polipéptidos similar a una cadena pesada de inmunoglobulina, pero que carecen de al menos una porción de uno o más dominios de cadena pesada. Por ejemplo, en ciertos anticuerpos, se eliminará un dominio completo de la región constante del anticuerpo modificado, por ejemplo, se eliminará todo o parte del dominio CH2.

En ciertas otras realizaciones, los polipéptidos de unión a antígeno comprenden regiones constantes derivadas de diferentes isotipos de anticuerpos (por ejemplo, regiones constantes de dos o más de una IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana). En otras realizaciones, los polipéptidos de unión a antígeno comprenden una bisagra quimérica (es decir, una bisagra que comprende porciones de bisagra derivadas de dominios de bisagra de diferentes isotipos de anticuerpos, por ejemplo, un dominio de bisagra superior de una molécula de IgG4 y un dominio medio de bisagra de IgG1). En una realización, los polipéptidos de unión a antígeno comprenden una región de Fc o una porción de la misma de una molécula de IgG4 humana y una mutación Ser228Pro (numeración de la UE) en la región central de bisagra de la molécula.

En ciertas realizaciones, la porción de Fc puede mutarse para aumentar o disminuir la función efectora usando técnicas conocidas en el arte. Por ejemplo, la eliminación o inactivación (a través de mutaciones puntuales u otros medios) de un dominio de región constante puede reducir la unión al receptor Fc del anticuerpo modificado circulante, aumentando así la localización del tumor. En otros casos, puede ser que las modificaciones de la región constante compatibles con la presente invención moderen la unión del complemento y, por lo tanto, reduzcan la vida media en suero y la asociación no específica de una citotoxina conjugada. Sin embargo, se pueden usar otras modificaciones de la región constante para modificar enlaces disulfuro o fracciones de oligosacáridos que permiten una localización mejorada debido a una mayor especificidad o flexibilidad del antígeno. El perfil fisiológico resultante, la biodisponibilidad y otros efectos bioquímicos de las modificaciones, tales como la localización del tumor, la biodistribución y la vida media en suero, se pueden medir y cuantificar fácilmente utilizando técnicas inmunológicas bien conocidas sin experimentación excesiva.

En ciertas realizaciones, un dominio de Fc empleado en un polipéptido de unión a antígeno de la invención es una variante de Fc. Como se usa en el presente documento, el término "variante de Fc" se refiere a un dominio de Fc que tiene al menos una sustitución de aminoácidos con respecto al dominio de Fc de tipo silvestre del que se deriva dicho dominio de Fc. Por ejemplo, cuando el dominio de Fc se deriva de un anticuerpo IgG1 humano, la variante de Fc de dicho dominio de Fc de IgG1 humano comprende al menos una sustitución de aminoácidos con respecto a dicho dominio de Fc.

La sustitución o sustituciones de aminoácidos de una variante de Fc se pueden ubicar en cualquier posición (es decir, cualquier posición de aminoácidos de la convención de la UE) dentro del dominio de Fc. En una realización, la variante de Fc comprende una sustitución en una posición de aminoácido ubicada en un dominio de bisagra o porción del mismo. En otra realización, la variante de Fc comprende una sustitución en una posición de aminoácido ubicada en un dominio CH2 o una porción del mismo. En otra realización, la variante de Fc comprende una sustitución en una posición de aminoácido ubicada en un dominio CH3 o una porción del mismo. En otra realización, la variante de Fc comprende una sustitución en una posición de aminoácido ubicada en un dominio CH4 o una porción del mismo.

Los polipéptidos de unión a antígeno de la invención pueden emplear cualquier variante de Fc reconocida en la técnica que se sabe que imparte una mejora (por ejemplo, reducción o mejora) en la función efectora y/o la unión de FcR. Las

variantes de Fc pueden incluir, por ejemplo, cualquiera de las sustituciones de aminoácidos divulgadas en las publicaciones internacionales PCT WO88/07089A1, WO96/14339A1, WO98/05787A1, WO98/23289A1, WO99/51642A1, WO99/58572A1, WO00/09560A2, WO00/.02/2, WO05/077981A2, WO05/092925A2, WO05/123780A2, WO06/019447A1, WO06/047350A2 y WO06/085967A2 o en las patentes de los Estados Unidos Nos. 5.648.260; 5.739.277; 5.834.250; 5.869.046; 6.096.871; 6.121.022; 6.194.551; 6.242.195; 6.277.375; 6.528.624; 6.538.124; 6.737.056; 6.821.505; 6.998.253; y 7.083.784. En un ejemplo de realización, un polipéptido de unión de la invención puede comprender una variante de Fc que comprende una sustitución de aminoácidos en la posición 268 de la UE (por ejemplo, H268D o H268E). En otro ejemplo de realización, un polipéptido de unión de la invención puede comprender una sustitución de aminoácidos en la posición 239 de la UE (por ejemplo, S239D o S239E) y/o la posición 332 de la UE (por ejemplo, I332D o I332Q).

En ciertas realizaciones, un polipéptido de unión a antígeno de la invención puede comprender una variante de Fc que comprende una sustitución de aminoácidos que altera las funciones efectoras independientes del antígeno del anticuerpo, en particular la vida media circulante del polipéptido de unión. Dichos polipéptidos de unión a antígeno exhiben una mayor o menor unión a FcRn en comparación con los polipéptidos de unión a antígeno que carecen de estas sustituciones, por lo tanto, tienen una mayor o menor vida media en suero, respectivamente. Se anticipa que las variantes de Fc con afinidad mejorada por FcRn tienen vidas medias en suero más largas, y tales moléculas tienen aplicaciones útiles en métodos de tratamiento de mamíferos en los que se desea una vida media prolongada del polipéptido de unión a antígeno administrado, por ejemplo, para tratar una enfermedad o trastorno crónico. Por el contrario, se espera que las variantes de Fc con menor afinidad de unión a FcRn tengan vida medias más cortas, y tales moléculas también son útiles, por ejemplo, para la administración a un mamífero en la que un tiempo de circulación reducido puede ser ventajoso, por ejemplo para imágenes de diagnóstico *in vivo* o en situaciones en las que el anticuerpo inicial tiene efectos secundarios tóxicos cuando está presente en la circulación durante períodos prolongados. Las variantes de Fc con menor afinidad de unión a FcRn también tienen menos probabilidades de cruzar la placenta y, por lo tanto, también son útiles en el tratamiento de enfermedades o trastornos en mujeres embarazadas. Además, otras aplicaciones en las que puede desearse una afinidad de unión a FcRn reducida incluyen aquellas aplicaciones en las que se desea localización en el cerebro, riñón y/o hígado. En un ejemplo de realización, los polipéptidos de unión a antígeno alterados de la invención exhiben transporte reducido a través del epitelio de los glomérulos renales desde la vasculatura. En otra realización, los polipéptidos de unión a antígeno alterados de la invención exhiben transporte reducido a través de la barrera hematoencefálica (BBB) desde el cerebro hacia el espacio vascular. En una realización, un polipéptido de unión a antígeno con unión de FcRn alterada comprende un dominio de Fc que tiene una o más sustituciones de aminoácidos dentro del "bucle de unión a FcRn" de un dominio de Fc. El bucle de unión a FcRn está compuesto por residuos de aminoácidos 280-299 (de acuerdo con la numeración de la UE). Ejemplos de sustituciones de aminoácidos que alteraron la actividad de unión a FcRn se divulgan en la publicación internacional PCT No. WO05/047327. En ciertos ejemplos de realizaciones, los polipéptidos de unión a antígeno de la invención comprenden un dominio de Fc que tiene una o más de las siguientes sustituciones: V284E, H285E, N286D, K290E y S304D (numeración de la UE).

En otras realizaciones, los polipéptidos de unión a antígeno para uso en los métodos de tratamiento descritos en el presente documento tienen una región constante, por ejemplo, una región constante de cadena pesada de IgG1, que se altera para reducir o eliminar la glicosilación. Por ejemplo, los polipéptidos de unión a antígeno de la invención también pueden comprender una variante de Fc que comprende una sustitución de aminoácidos que altera la glicosilación del anticuerpo Fc. Por ejemplo, dicha variante de Fc puede tener una glicosilación reducida (por ejemplo, glicosilación ligada a N u O). En ejemplos de realizaciones, la variante de Fc comprende una glicosilación reducida del glicano unido a N que normalmente se encuentra en la posición del aminoácido 297 (numeración de la UE). En otra realización, el polipéptido de unión a antígeno tiene una sustitución de aminoácidos cerca o dentro de un motivo de glicosilación, por ejemplo, un motivo de glicosilación unido a N que contiene la secuencia de aminoácidos NXT o NXS. En una realización particular, el polipéptido de unión a antígeno comprende una variante de Fc con una sustitución de aminoácidos en la posición del aminoácido 228 o 299 (numeración de la UE). En realizaciones más particulares, el polipéptido de unión a antígeno comprende una región constante de IgG1 o IgG4 que comprende una mutación de S228P y T299A (numeración de la UE).

Los ejemplos de sustituciones de aminoácidos que confieren glicosilación reducida o alterada se divulgan en la publicación internacional PCT No. WO05/018572. En realizaciones preferidas, los polipéptidos de unión a antígeno de la invención se modifican para eliminar la glicosilación. Dichos polipéptidos de unión a antígeno pueden denominarse polipéptidos de unión a antígeno "agly". Aunque no está limitado por la teoría, se cree que los polipéptidos de unión a antígeno "agly" pueden tener un perfil de seguridad y estabilidad mejorado *in vivo*. Los ejemplos de polipéptidos de unión a antígeno agly comprenden una región de Fc aglicosilada de un anticuerpo IgG4 que carece de la función efectora de Fc, eliminando así el potencial de toxicidad mediado por Fc para los órganos vitales normales que expresan PDGFRβ. En otras realizaciones más, los polipéptidos de unión a antígeno de la invención comprenden un glicano alterado. Por ejemplo, el polipéptido de unión a antígeno puede tener un número reducido de residuos de fucosa en un N-glicano en Asn297 de la región de Fc, es decir, está afucosilado. En otra realización, el polipéptido de unión a antígeno puede tener un número alterado de residuos de ácido siálico en el N-glicano en Asn297 de la región de Fc.

iii) Unión covalente

Los polipéptidos de unión a antígeno de la invención pueden modificarse, por ejemplo, mediante la unión covalente de una molécula al polipéptido de unión de manera que la unión covalente no impide que el polipéptido de unión se una específicamente a su epítopo afín. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, el polipéptido de unión a antígeno de la invención puede modificarse por glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos protectores/bloqueadores conocidos, escisión proteolítica, unión a un ligando celular u otra proteína, etc. Cualquiera de las numerosas modificaciones químicas puede llevarse a cabo mediante técnicas conocidas, que incluyen, pero no se limitan a, escisión química específica, acetilación, formilación, etc. Además, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no clásicos.

Los polipéptidos de unión a antígeno de la invención pueden fusionarse adicionalmente de forma recombinante a un polipéptido heterólogo en el extremo terminal N o C o conjugarse químicamente (incluyendo conjugaciones covalentes y no covalentes) a polipéptidos u otras composiciones. Por ejemplo, los polipéptidos de unión a antígeno pueden fusionarse de forma recombinante o conjugarse con moléculas útiles como marcadores en ensayos de detección y moléculas efectoras tales como polipéptidos heterólogos, fármacos, radionúclidos o toxinas. Véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT WO 92/08495; WO 91/14438; WO 89/12624; la patente de los Estados Unidos No. 5.314.995; y el documento EP 396.387.

Los polipéptidos de unión a antígeno pueden fusionarse con polipéptidos heterólogos para aumentar la vida media *in vivo* o para usar en inmunoensayos usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una realización, el PEG puede conjugarse con los polipéptidos de unión a antígeno de la invención para aumentar su vida media *in vivo* (véase Leong, SR, et al., Cytokine 16: 106 (2001); Adv. En Drug Deliv Rev. 54: 531 (2002), o Weir et al., Biochem. Soc. Transactions 30: 512 (2002).

Además, los polipéptidos de unión a antígeno de la invención pueden fusionarse a secuencias marcadoras, por ejemplo, un péptido para facilitar su purificación o detección. En realizaciones preferidas, la secuencia de aminoácidos marcadora es un péptido de hexahistidina, tal como la etiqueta proporcionada en un vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, California, 91311), entre otros, muchos de los cuales están comercialmente disponible. Como se describe en Gentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 821-824 (1989), por ejemplo, la hexahistidina proporciona una purificación conveniente de la proteína de fusión. Otras etiquetas peptídicas útiles para la purificación incluyen, pero no se limitan a, la etiqueta "HA", que corresponde a un epítopo derivado de la proteína de la hemaglutinina de la influenza (Wilson et al., Cell 37: 767 (1984) y la etiqueta "flag" .

Los polipéptidos de unión a antígeno de la invención pueden usarse en forma no conjugada o pueden conjugarse con al menos una de una variedad de moléculas, por ejemplo, para mejorar las propiedades terapéuticas de la molécula o terapia del paciente. Los polipéptidos de unión a antígeno de la invención pueden marcarse o conjugarse antes o después de la purificación, cuando se realiza la purificación. En particular, los polipéptidos de unión a antígeno de la invención pueden conjugarse con agentes terapéuticos, profármacos, péptidos, proteínas, enzimas, virus, lípidos, modificadores de respuesta biológica, agentes farmacéuticos o PEG.

La presente invención abarca además los polipéptidos de unión a antígeno de la invención conjugados con un agente de diagnóstico o terapéutico. Los polipéptidos de unión a antígeno se pueden usar de forma diagnóstica para, por ejemplo, controlar el desarrollo o la progresión de un trastorno de las células inmunes (por ejemplo, CLL) como parte de un procedimiento de prueba clínica para, por ejemplo, determinar la eficacia de un tratamiento determinado y/o régimen de prevención. La detección puede facilitarse mediante el acoplamiento de los polipéptidos de unión a antígeno a una sustancia detectable. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen varias enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, materiales radiactivos, metales emisores de positrones que utilizan diversas tomografías de emisión de positrones y iones metálicos paramagnéticos no radiactivos. Véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos No. 4.741.900 para iones metálicos que pueden conjugarse con anticuerpos para uso como diagnóstico de acuerdo con la presente divulgación. Ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa; ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, fluoresceína de diclorotriazinilamina, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina y aequorina; y ejemplos de material radiactivo adecuado incluyen ^{125}I, ^{131}I, ^{111}In o ^{99}Tc.

Los polipéptidos de unión a antígeno para su uso en los métodos de diagnóstico y tratamiento divulgados en el presente documento pueden conjugarse con citotoxinas (tales como radioisótopos, fármacos citotóxicos o toxinas) agentes terapéuticos, agentes citostáticos, toxinas biológicas, profármacos, péptidos, proteínas, enzimas, virus, lípidos, modificadores de la respuesta biológica, agentes farmacéuticos, ligandos inmunológicamente activos (por ejemplo, linfocinas u otros anticuerpos en los que la molécula resultante se une tanto a la célula neoplásica como a una célula efectora tal como una célula T) o PEG.

En otra realización, los polipéptidos de unión a antígeno para uso en los métodos de tratamiento divulgados en el presente documento pueden conjugarse con una molécula que disminuye el crecimiento de células tumorales. En otras realizaciones, las composiciones divulgadas pueden comprender anticuerpos, o fragmentos de los mismos,

acoplados a fármacos o profármacos. Aún otras realizaciones de la presente invención comprenden el uso de polipéptidos de unión a antígeno conjugados con biotoxinas específicas o sus fragmentos citotóxicos tales como ricina, gelonina, exotoxina de Pseudomonas o toxina de la difteria. La selección de qué anticuerpo conjugado o no conjugado se usará dependerá del tipo y estadio del cáncer, el uso del tratamiento complementario (por ejemplo, quimioterapia o radiación externa) y la condición del paciente. Se apreciará que un experto en la materia podría hacer fácilmente tal selección en vista de las enseñanzas del presente documento.

Se apreciará que, en estudios previos, los anticuerpos antitumorales marcados con isótopos se han usado con éxito para destruir células tumorales en modelos animales, y en algunos casos en humanos. Los ejemplos de radioisótopos incluyen: ^{90}Y, 125I, ^{131}I, ^{123}I, ^{111}In, ^{105}Rh, ^{153}Sm, ^{67}Cu, ^{67}Ga, ^{166}Ho, ^{177}Lu, ^{186}Re y ^{188}Re. Los radionúclidos actúan produciendo radiación ionizante que provoca la ruptura de múltiples cadenas en el ADN nuclear, lo que conduce a la muerte celular. Los isótopos utilizados para producir conjugados terapéuticos típicamente producen partículas alfa o beta de alta energía que tienen una longitud de trayectoria corta. Dichos radionúclidos matan las células a las que están muy cerca, por ejemplo, las células neoplásicas a las que se ha unido o ha entrado el conjugado. Tienen poco o ningún efecto sobre las células no localizadas. Los radionúclidos son esencialmente no inmunogénicos.

V. Expresión de polipéptidos de unión a antígeno

Después de la manipulación del material genético aislado para proporcionar los polipéptidos de unión a antígeno de la invención como se expuso anteriormente, los genes se insertan típicamente en un vector de expresión para su introducción en células huésped que pueden usarse para producir la cantidad deseada de los polipéptidos de unió a antígeno.

El término "vector" o "vector de expresión" se usa en el presente documento para los fines de la memoria descriptiva y las reivindicaciones y se refiere a los vectores usados de acuerdo con la presente invención como un vehículo para introducir y expresar un gen deseado en una célula. Como lo saben los expertos en la técnica, tales vectores pueden seleccionarse fácilmente del grupo que consiste en plásmidos, fagos, virus y retrovirus. En general, los vectores compatibles con la presente invención comprenderán un marcador de selección, sitios de restricción apropiados para facilitar la clonación del gen deseado y la capacidad de entrar y/o replicarse en células eucariotas o procariotas.

Se pueden emplear numerosos sistemas de vectores de expresión para los fines de esta invención. Por ejemplo, una clase de vector utiliza elementos de ADN que se derivan de virus animales tales como virus del papiloma bovino, virus del polioma, adenovirus, virus vacuna, baculovirus, retrovirus (RSV, MMTV o MOMLV) o virus SV40. Otros implican el uso de sistemas policistrónicos con sitios internos de unión a ribosomas. Además, las células que han integrado el ADN en sus cromosomas se pueden seleccionar mediante la introducción de uno o más marcadores que permiten la selección de células huésped transfectadas. El marcador puede proporcionar prototrofia a un huésped auxotrófico, resistencia a biocidas (por ejemplo, antibióticos) o resistencia a metales pesados como el cobre. El gen marcador seleccionable puede unirse directamente a las secuencias de ADN que se van a expresar o introducirse en la misma célula por cotransformación. También se pueden necesitar elementos adicionales para una síntesis óptima de ARNm. Estos elementos pueden incluir secuencias señal, señales de empalme, promotores transcripcionales, potenciadores y señales de terminación. En realizaciones particularmente preferidas, los genes de la región variable clonada se insertan en un vector de expresión junto con los genes de la región constante de la cadena pesada (preferiblemente humanos) sintetizados como se discutió anteriormente.

En otras realizaciones preferidas, el polipéptido de unión a antígeno de la invención puede expresarse usando constructos policistrónicos. En tales sistemas de expresión, se pueden producir múltiples productos génicos de interés tales como cadenas pesadas de anticuerpos a partir de un solo constructo policistrónico. Estos sistemas usan ventajosamente un sitio de entrada al ribosoma interno (IRES) para proporcionar niveles relativamente altos de polipéptidos de la invención en células huésped eucariotas. Secuencias de IRES compatibles se divulgan en la patente de los Estados Unidos No. 6.193.980. Los expertos en la materia apreciarán que tales sistemas de expresión pueden usarse para producir eficazmente la gama completa de polipéptidos divulgados en la presente solicitud.

Más generalmente, una vez que se ha preparado un vector o secuencia de ADN que codifica un anticuerpo, o fragmento del mismo, el vector de expresión puede introducirse en una célula huésped apropiada. Es decir, las células huésped pueden transformarse. La introducción del plásmido en la célula huésped se puede lograr mediante diversas técnicas bien conocidas por los expertos en la materia. Estas incluyen, pero no se limitan a, transfección (incluyendo electroforesis y electroporación), fusión de protoplastos, precipitación con fosfato de calcio, fusión celular con ADN de envoltura, microinyección e infección con virus intacto. Véase,, Ridgway, A. A. G. "Mammalian Expression Vectors", Capítulo 24.2, páginas 470-472. Vectors, Rodríguez y Denhardt, Editores (Butterworths, Boston, Massachusetts, 1988). Más preferiblemente, la introducción de plásmidos en el huésped se realiza por electroporación. Las células transformadas se cultivan en condiciones apropiadas para la producción de cadenas ligeras y cadenas pesadas, y se analizan para la síntesis de proteínas de cadena pesada y/o ligera. Los ejemplos de técnicas de ensayo incluyen ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA) o análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), inmunohistoquímica y similares.

Como se usa en el presente documento, el término "transformación" se usará en un sentido amplio para referirse a la introducción de ADN en una célula huésped receptora que cambia el genotipo y, en consecuencia, da como resultado un cambio en la célula receptora.

En esa misma línea, "células huésped" se refiere a células que se han transformado con vectores construidos usando técnicas de ADN recombinante y que codifican al menos un gen heterólogo. En las descripciones de los procesos para el aislamiento de polipéptidos de huéspedes recombinantes, los términos "célula" y "cultivo celular" se usan indistintamente para indicar la fuente del anticuerpo a menos que se especifique claramente lo contrario. En otras palabras, la recuperación del polipéptido de las "células" puede significar ya sea de células enteras centrifugadas o del cultivo celular que contiene tanto el medio como las células suspendidas.

En una realización, la línea de células huésped utilizada para la expresión del polipéptido de unión a antígeno es de origen mamífero; los expertos en la materia pueden determinar líneas de células huésped particulares que son más adecuadas para el producto génico deseado que se expresará en ellas. Los ejemplos de líneas de células huésped incluyen, pero no se limitan a, DG44 y DUXB11 (líneas de ovario de hámster chino, DHFR menos), HELA (carcinoma cervical humano), CVI (línea de riñón de mono), COS (un derivado de CVI con antígeno SV40 T), R1610 (fibroblastos de hámster chino), BALBC/3T3 (fibroblastos de ratón), HAK (línea de riñón de hámster), SP2/O (mieloma de ratón), BFA-1c1BPT (células endoteliales bovinas), RAJI (linfocito humano), 293 (riñón humano). En una realización, la línea celular proporciona glicosilación alterada, por ejemplo, afucosilación, del anticuerpo expresado a partir del mismo (por ejemplo, PER.C6.RTM (Crucell) o líneas celulares CHO con inactivación de FUT8 (células Potelligent®) (Biowa, Princeton, NJ)). En una realización, se pueden usar células NS0. Las células CHO son particularmente preferidas. Las líneas de células huésped están típicamente disponibles a través de servicios comerciales, la American Tissue Culture Collection o a través de la literatura publicada.

La producción *in vitro* permite el escalado para producir grandes cantidades de los polipéptidos deseados. Las técnicas para el cultivo de células de mamífero en condiciones de cultivo de tejidos son conocidas en la técnica e incluyen el cultivo en suspensión homogénea, por ejemplo en un reactor aéreo o en un reactor con agitación continua, o en cultivo celular inmovilizado o atrapado, por ejemplo en fibras huecas, microcápsulas, microperlas de agarosa o cartuchos cerámicos. Si es necesario y/o deseado, las soluciones de polipéptidos se pueden purificar por los métodos habituales de cromatografía, por ejemplo filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía sobre DEAE-celulosa y/o cromatografía de (inmuno)afinidad.

Los genes que codifican los polipéptidos de unión a antígeno de la invención también se pueden expresar en células no mamíferas tales como bacterias o células de levadura o plantas. A este respecto, se apreciará que también pueden transformarse diversos microorganismos unicelulares no mamíferos tales como bacterias; es decir, aquellos capaces de crecer en cultivos o fermentación. Las bacterias, que son susceptibles de transformación, incluyen miembros de las enterobacterias, tales como las cepas de *Escherichia col*i o *Salmonella*; *Bacillaceae*, tales como *Bacillus subtilis*; neumococo; estreptococo y Haemophilus influenzae. Se apreciará además que, cuando se expresan en bacterias, los polipéptidos pueden convertirse en parte de los cuerpos de inclusión. Los polipéptidos deben aislarse, purificarse y luego ensamblarse en moléculas funcionales.

Además de procariotas, también se pueden usar microbios eucariotas. Saccharomyces cerevisiae, o levadura de panadería común, es el más comúnmente utilizado entre los microorganismos eucariotas, aunque una serie de otras cepas están comúnmente disponibles. Para la expresión en Saccharomyces, el plásmido YRp7, por ejemplo, (Stinchcomb et al., Nature, 282: 39 (1979); Kingsman et al., Gene, 7: 141 (1979); Tschemper et al., Gene, 10: 157 (1980)) se usa comúnmente. Este plásmido ya contiene el gen TRP1 que proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que no tiene la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo ATCC No. 44076 o PEP4-1 (Jones, Genetics, 85:12 (1977)). La presencia de la lesión trpl como una característica del genoma de la célula huésped de levadura proporciona un ambiente efectivo para detectar la transformación por crecimiento en ausencia de triptófano.

VI. Formulaciones farmacéuticas y métodos de administración de polipéptidos de unión a antígeno.

En otro aspecto, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden los polipéptidos de unión a antígeno de la presente invención en el presente documento.

Los métodos de preparación y administración de polipéptidos de unión a antígeno de la invención a un sujeto son bien conocidos o fácilmente determinados por los expertos en la materia. La ruta de administración de los polipéptidos de unión a antígeno de la invención puede ser oral, parenteral, por inhalación o tópica. El término parenteral como se usa en este documento incluye la administración intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, rectal o vaginal. Generalmente se prefieren las formas de administración parenteral intravenosa, intraarterial, subcutánea e intramuscular. Si bien todas estas formas de administración se contemplan claramente dentro del alcance de la invención, una forma de administración sería una solución inyectable, en particular para inyección intravenosa o intraarterial o goteo. Normalmente, una composición farmacéutica adecuada para inyección puede comprender un tampón (por ejemplo, tampón de acetato, fosfato o citrato), un tensioactivo (por ejemplo, polisorbato), opcionalmente un agente estabilizador (por ejemplo, albúmina humana), etc. Sin embargo, en otros métodos

compatibles con las enseñanzas de la presente memoria descriptiva, los polipéptidos de unión a antígeno pueden administrarse directamente al sitio de la población celular adversa aumentando así la exposición del tejido enfermo al agente terapéutico.

Las preparaciones para administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas estériles. Ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales como el aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables como el oleato de etilo. Los portadores acuosos incluyen agua, soluciones alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, que incluyen solución salina y medios tamponados. En la presente invención, los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitarse a, tampón de fosfato 0,01-0,1 M y preferiblemente 0,05 M o solución salina al 0,8%. Otros vehículos parenterales comunes incluyen soluciones de fosfato de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, Ringer de lactato o aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen reabastecedores de fluidos y nutrientes, reabastecedores de electrolitos, como los que se basan en la dextrosa de Ringer, y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes y similares. Más particularmente, las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (que sean solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En tales casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que sea fácilmente inyectada con jeringa. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y preferiblemente se preservará contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. Se puede mantener la fluidez adecuada, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos puede lograrse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede lograrse incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

En cualquier caso, las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando un compuesto activo (por ejemplo, un anticuerpo mismo o en combinación con otros agentes activos) en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados en el presente documento, según sea necesario, seguido por esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril, que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son el secado al vacío y la liofilización, que produce un polvo de un ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución previamente filtrada en forma estéril del mismo. Las preparaciones para inyecciones se procesan, se llenan en contenedores tales como ampollas, bolsas, botellas, jeringas o viales, y se sellan en condiciones asépticas de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica. Además, las preparaciones pueden empacarse y venderse en forma de un kit tal como los descritos en las solicitudes de patente de los Estados Unidos Nos. 09/259,337 y No. 09/259.338 en trámite junto con la presente. Tales artículos de fabricación preferiblemente tendrán etiquetas o insertos dentro del empaque que indican que las composiciones asociadas son útiles para tratar a un sujeto que padece o está predispuesto a trastornos autoinmunes o neoplásicos.

Las dosis efectivas de los polipéptidos de unión a antígeno estabilizados de la presente invención para el tratamiento de las afecciones divulgadas anteriormente varían dependiendo de muchos factores diferentes que incluyen medios de administración, sitio objetivo, estado fisiológico del paciente, si el paciente es humano o un animal, otros medicamentos administrados y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Por lo general, el paciente es un ser humano, pero también se pueden tratar mamíferos no humanos, incluidos los mamíferos transgénicos. Las dosis de tratamiento pueden ajustarse utilizando métodos de rutina conocidos por los expertos en la materia para optimizar la seguridad y la eficacia.

Para la inmunización pasiva con un anticuerpo divulgado en el presente documento, la dosificación puede variar, por ejemplo, de aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg, y más habitualmente de 0,01 a 5 mg/kg (por ejemplo, 0,02 mg/kg, 0,25 mg/kg, 0,5 mg/kg, 0,75 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, etc.), del peso corporal del sujeto. Por ejemplo, las dosis pueden ser de 1 mg/kg de peso corporal o de 10 mg/kg de peso corporal o dentro del intervalo de 1-10 mg/kg, preferiblemente al menos 1 mg/kg. Las dosis intermedias en los intervalos anteriores también pretenden estar dentro del alcance de la invención.

A los sujetos se les puede administrar tales dosis diariamente, en días alternativos, semanalmente o de acuerdo con cualquier otro programa determinado por análisis empírico. Un ejemplo de tratamiento implica la administración en dosis múltiples durante un período prolongado, por ejemplo, de al menos seis meses. Los ejemplos de regímenes de tratamiento adicionales implican la administración una vez cada dos semanas o una vez al mes o una vez cada 3 a 6 meses. Los ejemplos de programas de dosificación incluyen 1-10 mg/kg o 15 mg/kg en días consecutivos, 30 mg/kg en días alternos o 60 mg/kg por semana. En algunos métodos, dos o más polipéptidos de unión a antígeno con

diferentes especificidades de unión se administran simultáneamente, en cuyo caso la dosis de cada anticuerpo administrado puede caer dentro de los intervalos indicados.

Los polipéptidos de unión a antígeno de la invención pueden administrarse en múltiples ocasiones. Los intervalos entre dosis únicas pueden ser, por ejemplo, diarios, semanales, mensuales o anuales. Los intervalos también pueden ser irregulares como se indica midiendo los niveles en sangre del polipéptido o molécula objetivo en el paciente. En algunos métodos, la dosis se ajusta para lograr una cierta concentración de anticuerpos o toxinas en plasma, por ejemplo, 11000 µg/mL o 25-300 µg/mL. Alternativamente, los polipéptidos de unión a antígeno pueden administrarse como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente. La dosis y la frecuencia varían de acuerdo con la vida media del polipéptido de unión a antígeno en el paciente. En general, los polipéptidos de unión a antígeno humanizados muestran la vida media más larga, seguidos por los polipéptidos de unión a antígeno quiméricos y el polipéptido de unión a antígeno no humano. En una realización, los polipéptidos de unión a antígeno de la invención pueden administrarse en forma no conjugada. En otra realización, los polipéptidos de unión a antígeno de la invención pueden administrarse múltiples veces en forma conjugada. En otra realización más, los polipéptidos de unión a antígeno de la invención pueden administrarse en forma no conjugada, luego en forma conjugada, o viceversa.

La dosis y la frecuencia de administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, las composiciones que contienen los presentes anticuerpos o un cóctel de los mismos se administran a un paciente que aún no se encuentra en estado de enfermedad para mejorar la resistencia del paciente. Tal cantidad se define como una "dosis efectiva profiláctica". En este uso, las cantidades precisas nuevamente dependen del estado de salud del paciente y de la inmunidad general, pero generalmente varían de 0,1 a 25 mg por dosis, especialmente de 0,5 a 2,5 mg por dosis. Se administra una dosis relativamente baja a intervalos relativamente poco frecuentes durante un largo período de tiempo. Algunos pacientes continúan recibiendo tratamiento por el resto de sus vidas.

En aplicaciones terapéuticas a veces se requiere, una dosis relativamente alta (por ejemplo, de aproximadamente 1 a 400 mg/kg de anticuerpo por dosis, con dosis de 5 a 25 mg que se usan más comúnmente para radioinmunoconjugados y dosis más altas para moléculas conjugadas de citotoxina-fármaco) en intervalos relativamente cortos hasta que la progresión de la enfermedad se reduzca o termine, y preferiblemente hasta que el paciente muestre una mejoría parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. Posteriormente, la patente puede administrarse en un régimen profiláctico.

En una realización, un sujeto puede tratarse con una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención (por ejemplo, en un vector). Las dosis para los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos varían de aproximadamente 10 ng a 1 g, 100 ng a 100 mg, 1 µg a 10 mg, o 30-300 µg de ADN por paciente. Las dosis para los vectores virales infecciosos varían de 10 a 100, o más, viriones por dosis.

Los agentes terapéuticos pueden administrarse por medios parenteral, tópico, intravenoso, oral, subcutáneo, intraarterial, intracraneal, intraperitoneal, intranasal o intramuscular para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico. Se prefieren la inyección intramuscular o la infusión intravenosa para la administración de un anticuerpo de la invención. En algunos métodos, los anticuerpos terapéuticos, o fragmentos de los mismos, se inyectan directamente en el cráneo. En algunos métodos, los anticuerpos, o fragmentos de los mismos, se administran como una composición o dispositivo de liberación sostenida, tal como un dispositivo Medipad^{MR}.

Los polipéptidos de unión a antígeno de la invención pueden administrarse opcionalmente en combinación con otros agentes que son eficaces en el tratamiento del trastorno o afección que necesita tratamiento (por ejemplo, profiláctico o terapéutico). Los agentes adicionales preferidos son aquellos que son reconocidos en la técnica y se administran de manera estándar para un trastorno particular.

Las dosis de tratamiento únicas efectivas (es decir, cantidades terapéuticamente efectivas) de anticuerpos marcados con ^{90}Y de la invención varían entre aproximadamente 5 y aproximadamente 75 mCi, más preferiblemente entre aproximadamente 10 y aproximadamente 40 mCi. Las dosis de tratamiento único efectivo no ablativas de la médula de los polipéptidos de unión a antígeno marcados con ^{131}I oscilan entre aproximadamente 5 y aproximadamente 70 mCi, más preferiblemente entre aproximadamente 5 y aproximadamente 40 mCi. Las dosis ablativas efectivas de tratamiento único (es decir, pueden requerir un trasplante autólogo de médula ósea) de anticuerpos marcados con ^{131}I varían entre aproximadamente 30 y aproximadamente 600 mCi, más preferiblemente entre aproximadamente 50 y menos de aproximadamente 500 mCi.

Si bien se ha adquirido una gran experiencia clínica con ^{131}I y ^{90}Y, otros radiomarcadores son conocidos en la técnica y se han utilizado para fines similares. Todavía se usan otros radioisótopos para obtener imágenes. Por ejemplo, los radioisótopos adicionales que son compatibles con el alcance de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, ^{123}I, ^{125}I, ^{32}P, ^{57}Co, ^{64}Cu, ^{67}Cu, ^{77}Br, ^{81}Rb, ^{81}Kr, ^{87}Sr, ^{113}In, ^{127}Cs, ^{129}Cs, ^{132}I, ^{197}Hg, ^{203}Pb, ^{206}Bi, ^{177}Lu, ^{186}Re, ^{212}Pb, ^{212}Bi, ^{47}Sc, ^{105}Rh, ^{109}Pd, ^{153}Sm, ^{188}Re, ^{199}Au, ^{225}Ac, ^{211}A y ^{213}Bi. A este respecto, los emisores alfa, gamma y beta son compatibles con la presente invención. Además, en vista de la presente divulgación, se afirma que un experto en la materia podría determinar fácilmente qué radionucleidos son compatibles con un curso de tratamiento seleccionado

sin experimentación excesiva. Con este fin, los radionucleidos adicionales que ya se han utilizado en el diagnóstico clínico incluyen ^{125}I, ^{123}I, ^{99}Tc, ^{43}K, ^{52}Fe, ^{67}Ga, ^{68}Ga, así como ^{111}In. Los anticuerpos también se han marcado con una variedad de radionucleidos para uso potencial en inmunoterapia dirigida (Peirersz et al., Immunol. Cell Biol. 65: 111-125 (1987), que se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad). Estos radionucleidos incluyen ^{188}Re y ^{186}Re, así como ^{199}Au y ^{67}Cu en menor medida. La patente de los Estados Unidos No. 5.460.785 proporciona datos adicionales con respecto a tales radioisótopos.

Como se discutió previamente, los polipéptidos de unión a antígeno de la invención se pueden administrar en una cantidad farmacéuticamente efectiva para el tratamiento *in vivo* de trastornos de mamíferos. A este respecto, se apreciará que los polipéptidos de unión a antígeno divulgados se formularán para facilitar la administración y promover la estabilidad del agente activo. Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención comprenden un vehículo estéril, no tóxico, farmacéuticamente aceptable tal como solución salina fisiológica, tampones no tóxicos, conservantes y similares. A los fines de la presente solicitud, se considerará que una cantidad farmacéuticamente efectiva de un polipéptido de unión a antígeno de la invención, conjugado o no conjugado a un agente terapéutico, significa una cantidad suficiente para lograr la unión efectiva a un objetivo y lograr un beneficio, por ejemplo, para mejorar los síntomas de una enfermedad o trastorno o para detectar una sustancia o una célula. En el caso de las células tumorales, el polipéptido será preferiblemente capaz de interactuar con antígenos inmunorreactivos seleccionados en células neoplásicas o inmunorreactivas y proporcionar un aumento en la muerte de esas células. Por supuesto, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse en dosis únicas o múltiples para proporcionar una cantidad farmacéuticamente eficaz del polipéptido.

De acuerdo con el alcance de la presente divulgación, los polipéptidos de unión a antígeno de la invención pueden administrarse a un humano u otro animal de acuerdo con los métodos de tratamiento mencionados anteriormente en una cantidad suficiente para producir un efecto terapéutico o profiláctico. Los polipéptidos de unión a antígeno de la invención pueden administrarse a dicho ser humano u otro animal en una forma de dosificación convencional preparada combinando el anticuerpo de la invención con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable convencional de acuerdo con técnicas conocidas. Un experto en la materia reconocerá que la forma y el carácter del vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable están dictados por la cantidad de ingrediente activo con el que se combinará, la ruta de administración y otras variables bien conocidas. Los expertos en la materia apreciarán además que un cóctel que comprende una o más especies de polipéptidos de acuerdo con la presente invención puede resultar particularmente efectivo.

VII. Métodos de tratamiento de enfermedades o trastornos

Los polipéptidos de unión a antígeno de la invención son útiles para antagonizar la actividad de los receptores de la superficie celular HER2 y/o PDGFRβ. Por consiguiente, en otro aspecto, la invención proporciona métodos para tratar enfermedades o trastornos asociados a PDGFRβ y/o HER2 administrando a un sujeto que lo necesita una composición farmacéutica que comprende uno o más polipéptidos de unión a antígeno de la invención.

En ciertas realizaciones, los polipéptidos de unión a antígeno anti-PDGFRβ, anti-HER2 y/o biespecíficos divulgados en el presente documento (por ejemplo, los expuestos en las SEQ ID NOs: 13-16, 17-22 y/o 24) se administran en combinación con agentes terapéuticos adicionales. Las moléculas terapéuticas adecuadas incluyen, sin limitación, inhibidores de la actividad del receptor de la familia EGFR (por ejemplo, Trastuzumab (CAS # 180288-69-1), Pertuzumab (CAS # 380610-27-5), Cetuximab (CAS # 205923-56-4), y Erlotinib (CAS # 183321-74-6)). En una realización particular, un polipéptido biespecífico de unión a antígeno anti-PDGFRβ/anti-HER2 se administra en combinación con Trastuzumab y/o Pertuzumab. Además se divulga un polipéptido de unión a antígeno monoespecífico anti-HER2 que se administra en combinación con Trastuzumab y/o Pertuzumab.

Las enfermedades o trastornos susceptibles de tratamiento incluyen, sin limitación, cáncer, por ejemplo, cáncer de mama y de ovario.

Un experto en la técnica podría, mediante experimentación rutinaria, determinar qué cantidad efectiva y no tóxica de anticuerpo (o agente terapéutico adicional) serviría con el propósito de tratar una enfermedad o trastorno asociado a PDGFRβ y/o HER2. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente activa de un polipéptido puede variar de acuerdo con factores tales como el estadío de la enfermedad (por ejemplo, estadío I frente al estadío IV), edad, sexo, complicaciones médicas (por ejemplo, afecciones o enfermedades inmunosuprimidas) y el peso del sujeto, y la capacidad del anticuerpo para provocar una respuesta deseada en el sujeto. El régimen de dosificación puede ajustarse para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, se pueden administrar varias dosis divididas diariamente, o la dosis se puede reducir proporcionalmente de acuerdo con lo indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Generalmente, sin embargo, se espera que una dosis efectiva esté en el intervalo de aproximadamente 0,05 a 100 miligramos por kilogramo de peso corporal por día y más preferiblemente de aproximadamente 0,5 a 10 miligramos por kilogramo de peso corporal por día.

VIII Ejemplos

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos que no deben interpretarse como limitantes adicionales. El contenido del listado de secuencias, las figuras y todas las referencias, patentes y solicitudes de patente publicadas citadas en esta solicitud se incorporan expresamente en el presente documento como referencia.

Ejemplo 1. Producción de polipéptidos biespecíficos de unión a antígeno HER2/PDGFRβ

Los genes que codifican diversos formatos de polipéptidos biespecíficos de unión a antígeno HER2/PDGFRβ se sintetizaron y clonaron en vectores de expresión de mamíferos. Los constructos se transfectaron transitoriamente en células HEK293 siguiendo el protocolo estándar. El sobrenadante se recogió y se probó su expresión. En la Figura 5 se expone un gel SDS-PAGE de un dímero expresado del formato 2 biespecífico 2 (SEQ ID NO: 18 en la Tabla 4). El gel muestra que bajo condiciones no reductoras se expresa un polipéptido de 125 Da como se esperaba (carril 2) y que este se disocia en monómeros de 62,5k Da como se esperaba en condiciones reductoras (carril 1).

Ejemplo 2. Evaluación de la expresión de polipéptido biespecífico de unión a antígeno HER2/PDGFRβ usando ELISA

Se desarrolló un ensayo de ELISA para analizar la expresión de los polipéptidos biespecíficos de unión a antígeno HER2/PDGFRβ en el sobrenadante celular. Brevemente, se capturaron 2 µg/mL de anticuerpo anti-Fc humano en una placa Maxisorp Immulon durante la noche y se bloquearon con superbloque. El sobrenadante se diluyó en serie y se cargó en la placa. Los medios de cultivo se diluyeron de manera similar y se cargaron en paralelo como control negativo. El polipéptido biespecífico de unión a antígeno se detectó con HRP específico anti Fab humano. Los resultados expuestos en la Figura 6 muestran que el ensayo de ELISA puede detectar el polipéptido biespecífico de unión a antígeno en el sobrenadante de células HEK293.

Ejemplo 3. Detección de la unión simultánea a antígeno de polipéptidos biespecíficos de unión a antígeno HER2/PDGFRβ mediante ELISA

Se desarrolló un ensayo de ELISA para detectar la unión simultánea de polipéptidos biespecíficos de unión a antígeno HER2/PDGFRβ a HER2 y PDGFRβ. Brevemente, se inmovilizaron 2 µg/mL de proteína de fusión Her2-Fc humana (sin etiqueta del epítopo His) en una placa Maxisorp Immulon durante la noche y se bloqueó con superbloque. El sobrenadante de células HEK293 que contiene un polipéptido biespecífico de unión a antígeno se diluyó en serie y se cargó en la placa. Después de una hora de incubación, la placa se lavó y se aplicaron 100 nM de fusión PDGFRβ-Fc humana (con una etiqueta de epítopo His) a la placa y se incubó durante una hora. La unión del Ab biespecífico a Her2 y PDGFRβ se detectó utilizando un HRP anti-His. Los resultados expuestos en la Figura 7 muestran que el polipéptido biespecífico de unión a antígeno puede unirse simultáneamente a HER2 y PDGFRβ.

Ejemplo 4. Ensayo de unión basado en FACS de polipéptidos biespecíficos de unión a antígeno HER2/PDGFRβ

Se desarrolló un ensayo de unión basado en FACS para detectar la unión simultánea de polipéptidos biespecíficos de unión a antígeno HER2/PDGFRβ a HER2 y PDGFRβ cuando se expresa en la superficie de las células. Específicamente, 200 µl de células HEK293 que sobreexpresan constitutivamente células HER2 o HEK293 que sobreexpresan transitoriamente PFGFRβ, o células de control transfectadas en forma simulada se sembraron en placa a razón de un millón de células por mL en una placa nueva de 96 pozos. Las células se mantuvieron a 4 °C para evitar la internalización del receptor. Los sobrenadantes de células HEK293 que contenían polipéptidos biespecíficos de unión a antígeno HER2/PDGFRβ de formato 2 o formato 3 se incubaron con 25 nM de PDGFRβ-CF647 humano recombinante o Her2-CF647 humano recombinante para permitir que se formen los complejos de proteína biespecíficos/marcados. Después de la incubación, se añadieron 100 µL de cada sobrenadante a las células apropiadas que expresan HER2, que expresan PDGFRβ o control y se incubaron con agitación a 4 °C durante dos horas, para permitir la unión de los complejos de proteína biespecíficos/marcados a HER2 y PDGFRβ de la superficie celular. Después de la incubación, las células se sedimentaron mediante centrifugación a 1500 rpm durante 4 minutos, se lavaron una vez con 200 µL de medio completo nuevo y se resuspendieron en un volumen final de 200 µL en medio completo nuevo. La unión de PDGFRβ-CF647 o Her2-CF647 marcado con fluorescencia a las células se determinó usando un citómetro de flujo Guava (Millipore). Se consideró que un desplazamiento positivo a lo largo del eje X era indicativo de asociación de PDGFRβ-CF647 o Her2-CF647 marcado con células.

En estos experimentos, el anticuerpo anti-PDGFR o el anticuerpo anti-HER2, solamente medio y receptor marcado con CF647 se usaron como controles negativos. Se usaron anticuerpo HER2 marcado con CF647 25 nM o anticuerpo PDGFRβ marcado con CF647 50nM como controles positivos en células que expresan HER2 y PDGFRβ, respectivamente.

Los resultados de estos experimentos se exponen en la Figura 8. Estos datos muestran que tanto los polipéptidos biespecíficos de unión a antígeno HER2/PDGFRβ de formato 2 como de formato 3 pudieron unirse simultáneamente a HER2 y PDGFRβ de la superficie celular.

Ejemplo 5. Análisis de la unión de un dominio de un ejemplo de VH anti-HER2 a HER2

La cinética de unión del dominio VH anti-HER2 B8 (SEQ ID NO: 13) a HER2 se analizó usando un ensayo de resonancia de plasmón superficial (Biacore). Como se muestra en la Figura 9, el dominio VH B8 exhibió una Kd de 1,2 nM, una tasa de activación de 1,39 x 10^5 $M^{-1}s^{-1}$, y una tasa de desactivación de 1,67 x 10^4 s^{-1}.

La capacidad del dominio VH B8 para competir por la unión con Trastuzumab y/o Pertuzumab se analizó usando un ensayo basado en FACS. Los resultados, expuestos en la Figura 9, demostraron que las uniones del dominio VH B8 pueden unirse a HER2 simultáneamente con Trastuzumab y Pertuzumab. Estos datos demuestran que el dominio VH anti-HER2 se une a un epítopo diferente en HER2 que tanto Trastuzumab como Pertuzumab.

El dominio VH B8 se volvió a formatear en un scFv y se determinó la afinidad de unión por HER2. Los resultados expuestos en la Figura 10 muestran que el scFv B8 exhibió un Kd de 0,87 nM.

Ejemplo 6. Ensayos de proliferación celular

La capacidad del dominio VH anti-HER2 B12 (SEQ ID NO: 14), trastuzumab o pertuzumab, ya sea solo o en combinación, para inhibir la proliferación de células SK-BR-3 se determinó usando un ensayo de proliferación celular MTS. Los resultados, expuestos en la Figura 11, mostraron que la combinación de VH B12, trastuzumab y pertuzumab resultó en una mayor inhibición de la proliferación celular que la obtenida con cada agente solo, o con una combinación de solo trastuzumab y pertuzumab. Estos datos demuestran que VH B12 puede usarse para aumentar la inhibición de la proliferación celular de trastuzumab y pertuzumab.

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido biespecífico de unión a antígeno aislado desprovisto de cadenas ligeras de anticuerpo que comprende una cadena pesada de anticuerpo que comprende un primer dominio VH que se une específicamente a un primer antígeno, unido en el terminal C a un segundo dominio VH que se une específicamente a un segundo antígeno, en el que el primer y segundo antígeno se seleccionan independientemente del grupo que consiste en PDGFRβ y HER2 humanos, en los que uno del primer dominio VH o el segundo dominio VH se une específicamente a HER2 humano y comprende las secuencias de aminoácidos de HCDR3, HCDR2 y HCDR1 seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 1, 2 y 3; 4, 5 y 6; 7, 8 y 9; y 10, 11 y 12, y en las que el polipéptido desprovisto de cadenas ligeras de anticuerpos se une específicamente a PDGFRβ y HER2.

2. El polipéptido de unión a antígeno de la reivindicación 1, en el que la cadena pesada del anticuerpo está genéticamente unida al segundo dominio VH a través de un enlazador de aminoácidos, en el que preferiblemente el enlazador comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 23.

3. Un polipéptido de unión a antígeno que comprende un dímero de dos polipéptidos de unión a antígeno de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que los dos polipéptidos de unión a antígeno se dimerizan naturalmente a través de las regiones constantes de la cadena pesada.

4. El polipéptido de unión a antígeno de la reivindicación 1, en el que el dominio VH que se une específicamente a HER2 humano comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 13, 14, 15 y 16.

5. El polipéptido de unión a antígeno de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende un dominio VH que se une específicamente a PDGFRβ humano y comprende una HCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 25, una HCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 26, y una HCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 27.

6. El polipéptido de unión a antígeno de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el polipéptido de unión a antígeno comprende una cadena pesada de anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18.

7. El polipéptido de unión a antígeno de la reivindicación 5 o la reivindicación 6, en el que el dominio VH que se une específicamente a PDGFRβ humano comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 24.

8. Un ácido nucleico aislado o un vector de expresión recombinante que comprende un ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido de unión a antígeno de cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

9. Una célula huésped que comprende el vector de expresión recombinante de la reivindicación 8.

10. Un método para producir un polipéptido de unión a antígeno, que comprende cultivar la célula huésped de la reivindicación 9 en condiciones tales que el polipéptido de unión a antígeno sea producido por la célula huésped.

11. Una composición farmacéutica que comprende el polipéptido de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 y uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables.

12. La composición farmacéutica de la reivindicación 11 para usar en el tratamiento de cáncer.

Figura 1

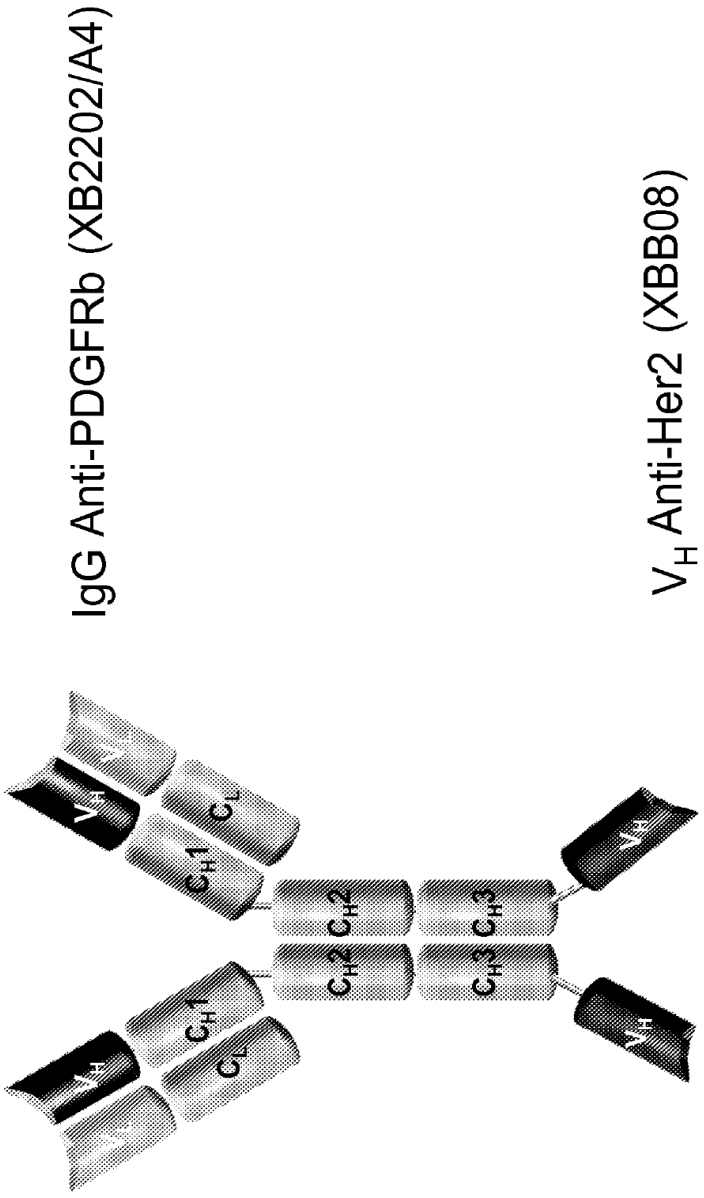

IgG Anti-PDGFRb (XB2202/A4)
V_H Anti-Her2 (XBB08)
V_H
V_L
C_H1
C_L
C_H2
C_H3

Figura 2

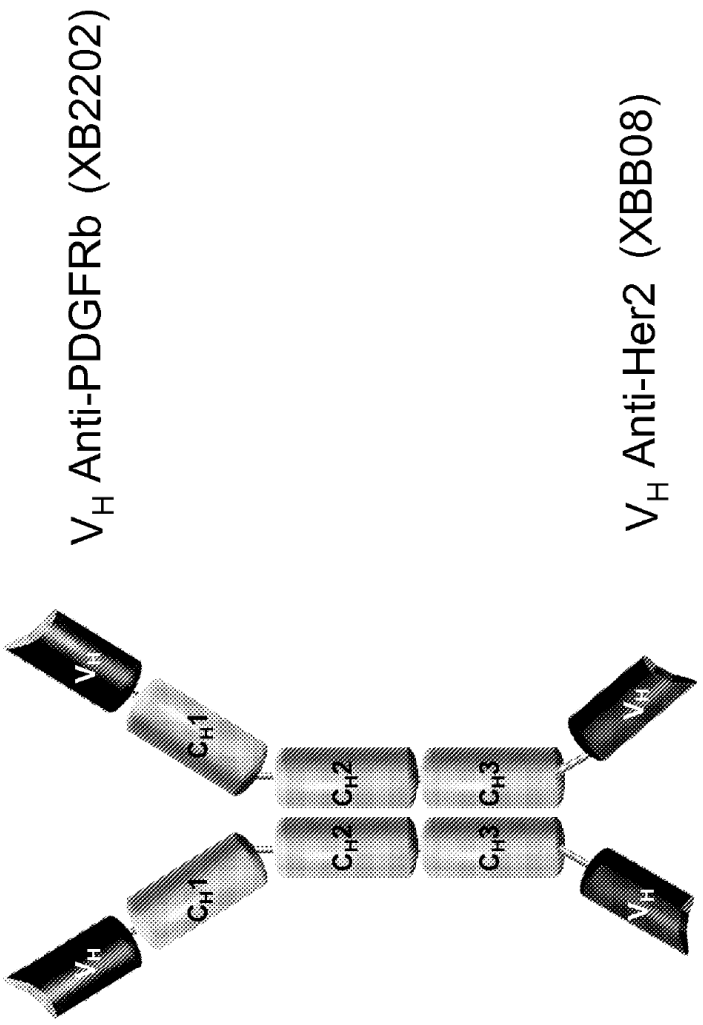


Figura 3

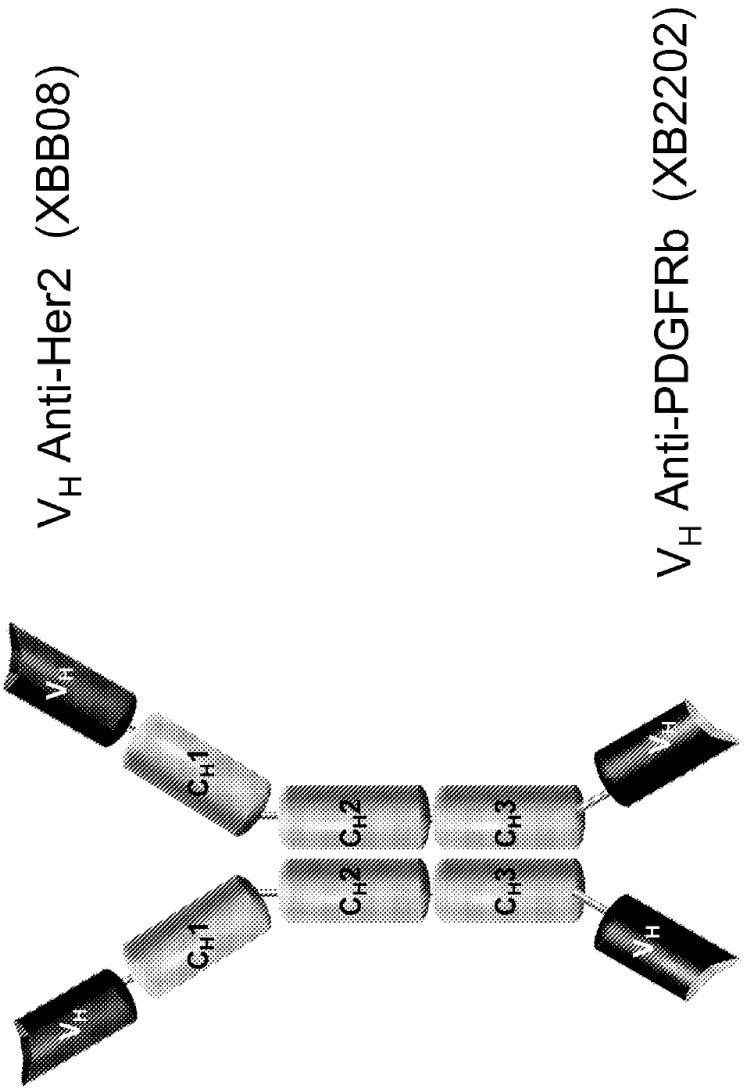


Figura 4

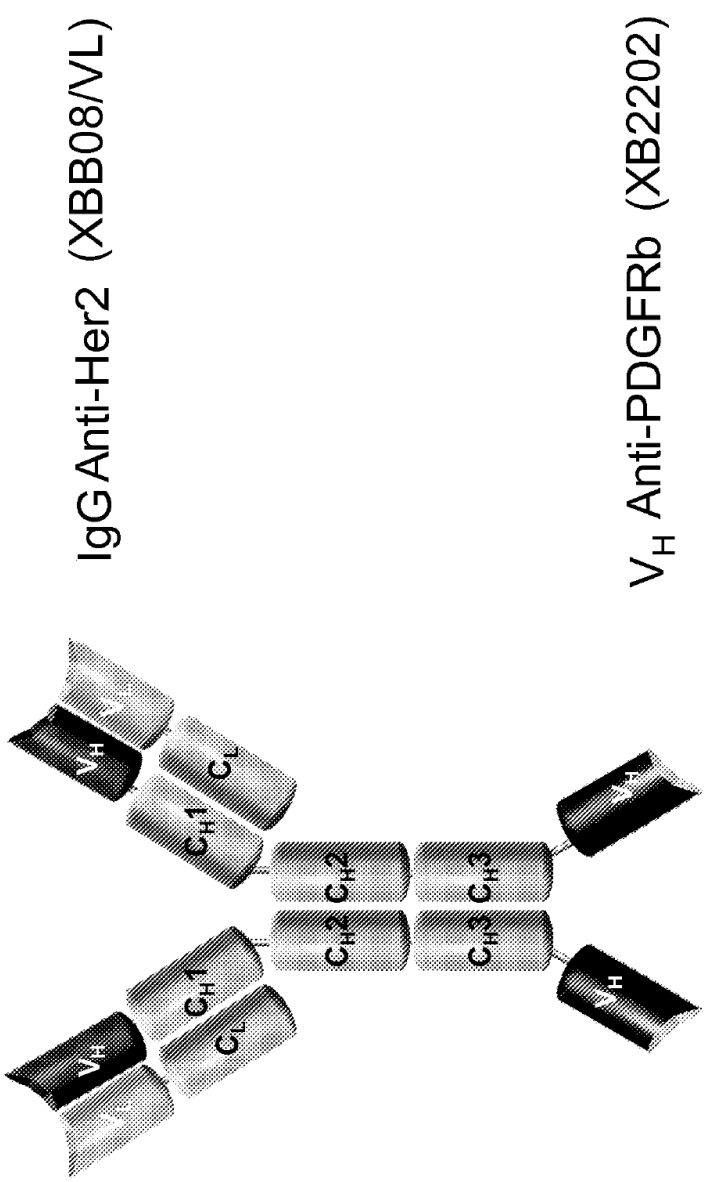


Figura 5

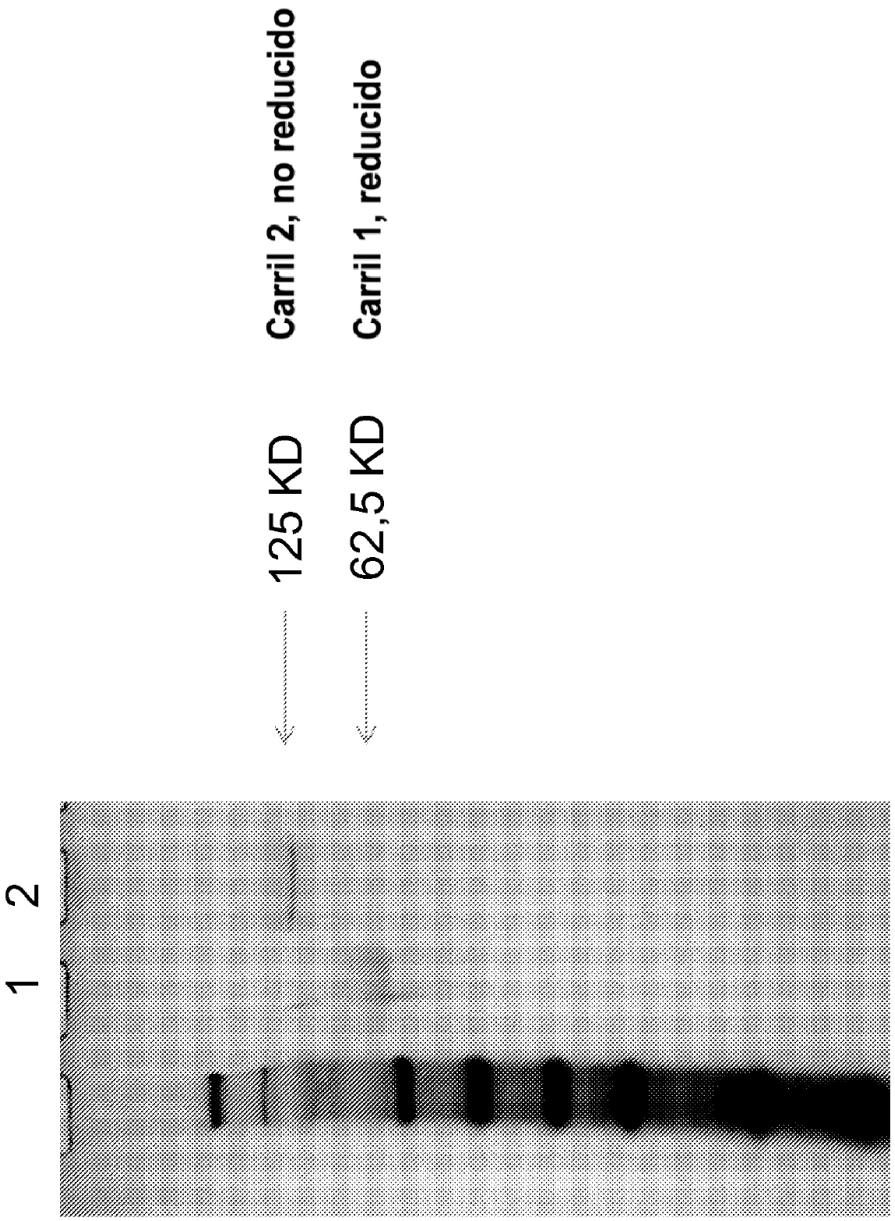


Figura 6

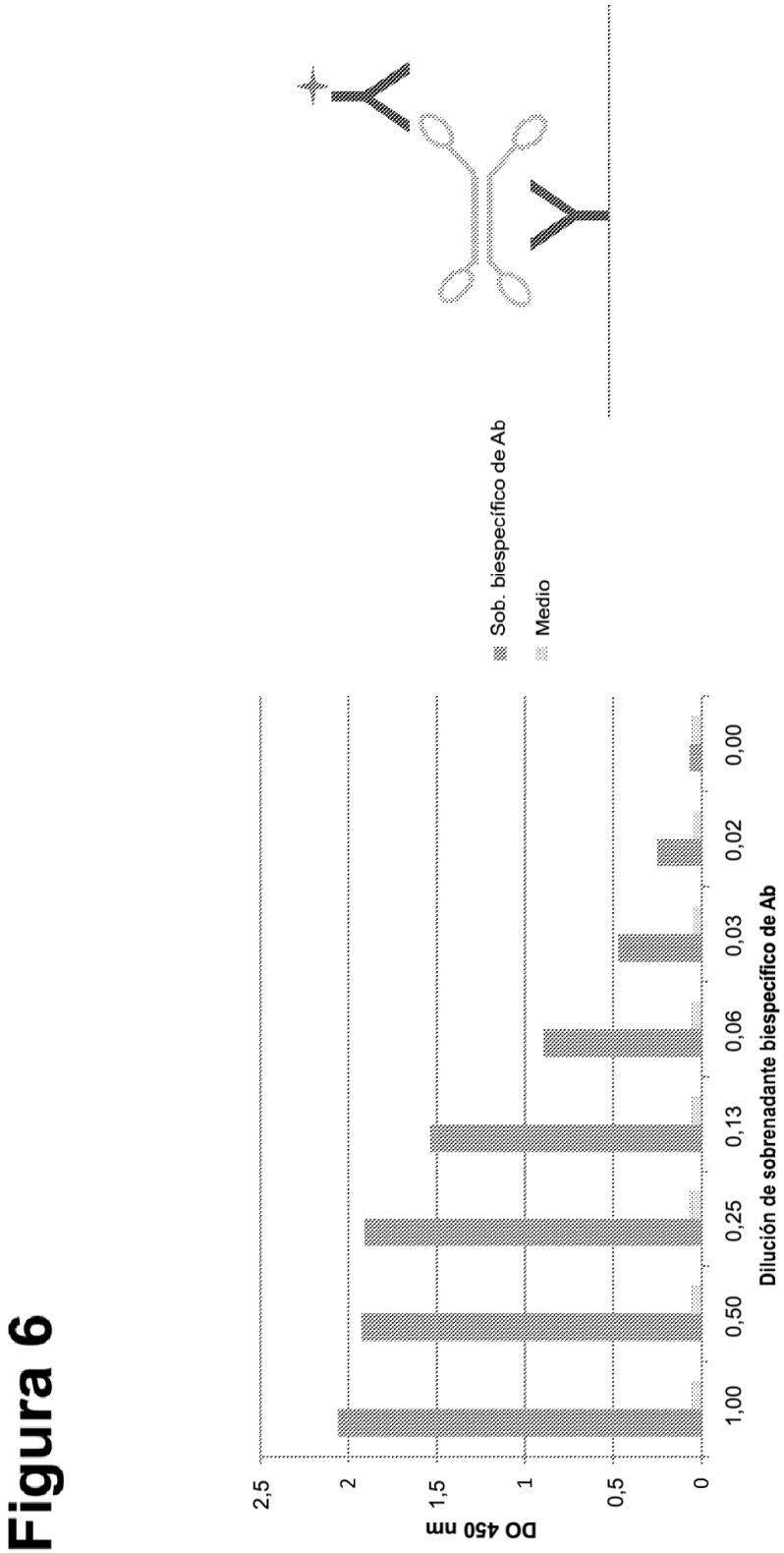
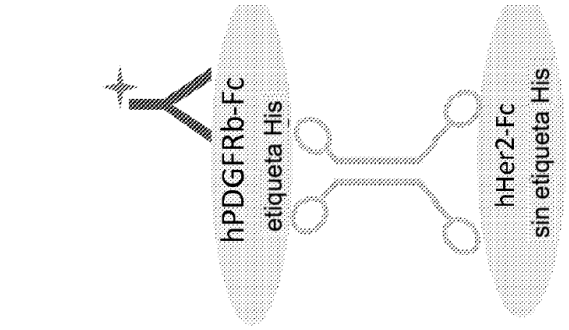

Sob. biespecífico de Ab
Medio
DO 450 nm
2,5
2
1,5
1
0,5
0
1,00
0,50
0,25
0,13
0,06
0,03
0,02
0,00
Dilución de sobrenadante biespecífico de Ab

Figura 7


hPDGFRb-Fc
etiqueta His
hHer2-Fc
sin etiqueta His

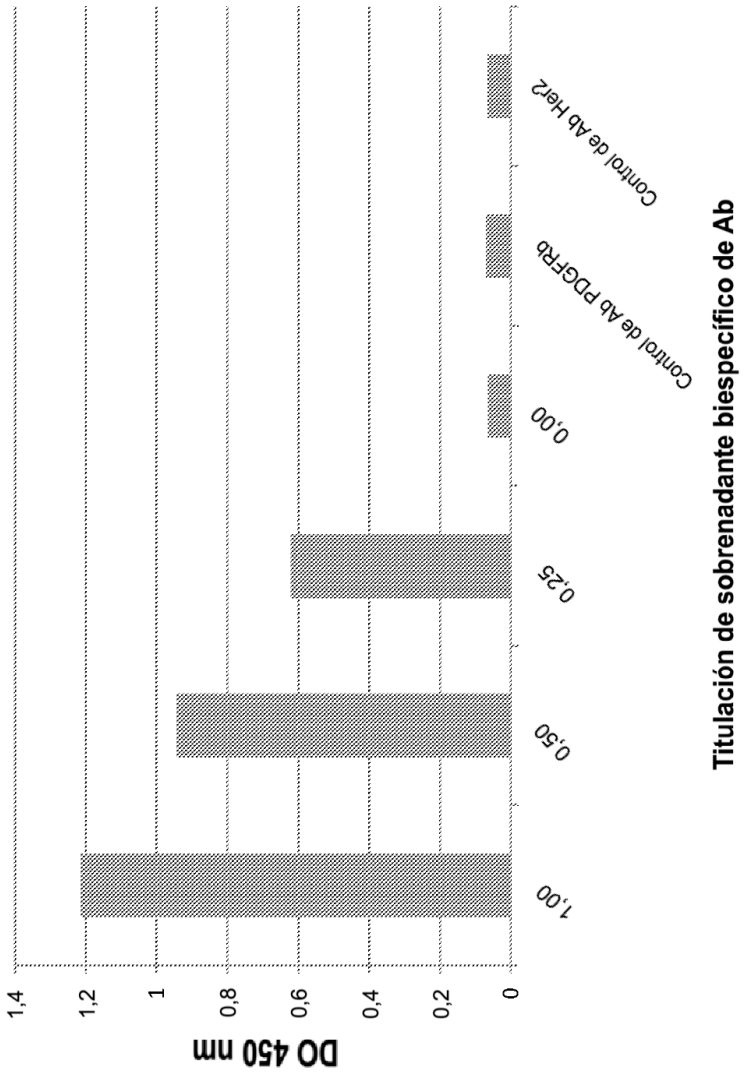

DO 450 nm
1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
1,00
0,50
0,25
0,00
Control de Ab PDGFRb
Control de Ab Her2
Titulación de sobrenadante biespecífico de Ab

Figura 8

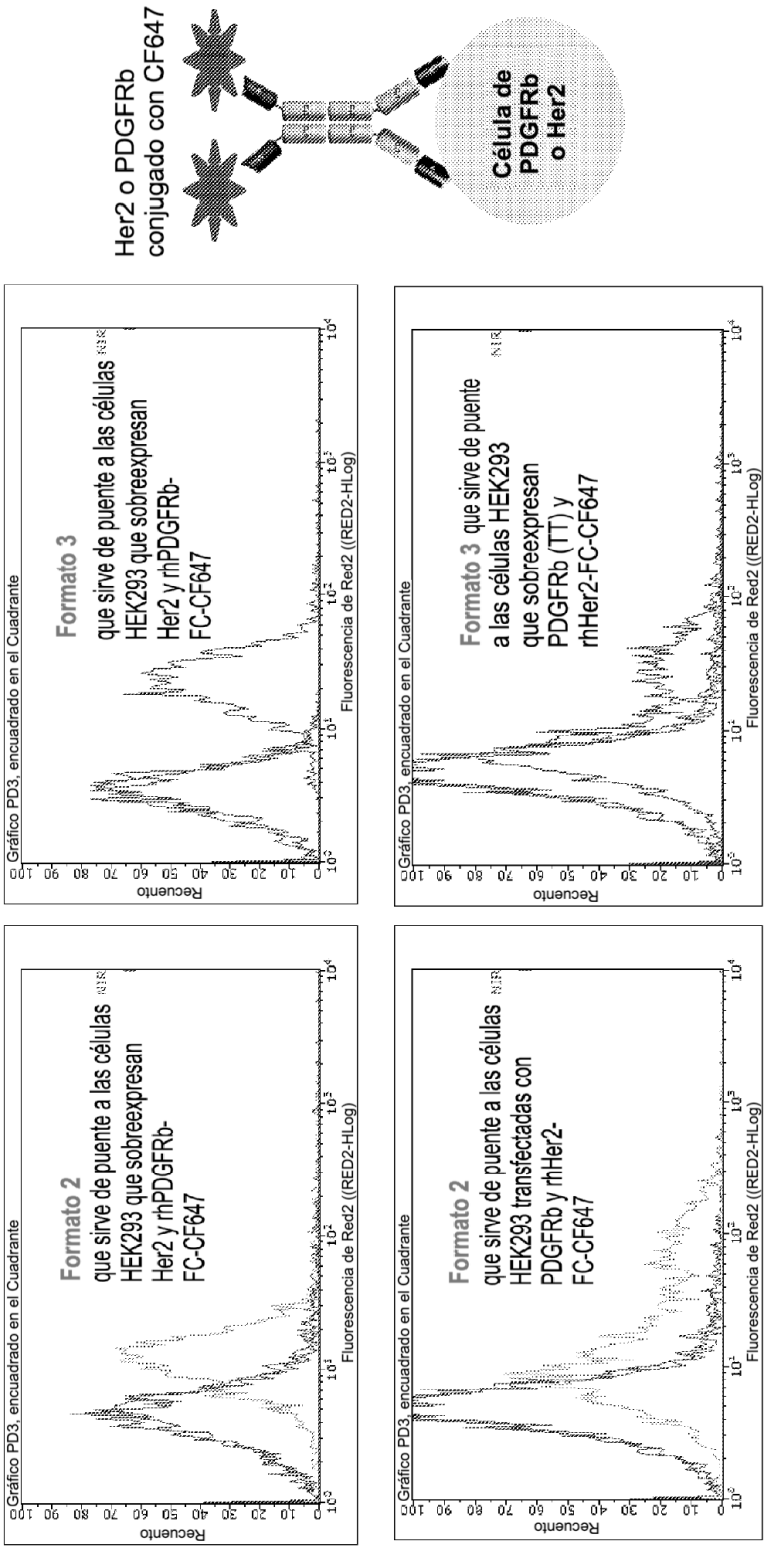

Her2 o PDGFRb
conjugado con CF647
Célula de
PDGFRb
o Her2
Gráfico PD3, encuadrado en el Cuadrante
Formato 2
que sirve de puente a las células
HEK293 que sobreexpresan
Her2 y rhPDGFRb-
FC-CF647
Formato 3
que sirve de puente a las células
HEK293 que sobreexpresan
Her2 y rhPDGFRb-
FC-CF647
Formato 2
que sirve de puente a las células
HEK293 transfectadas con
PDGFRb y rhHer2-
FC-CF647
Formato 3 que sirve de puente
a las células HEK293
que sobreexpresan
PDGFRb (TT) y
rhHer2-FC-CF647
Recuento
Fluorescencia de Red2 ((RED2-HLog)

Figura 9

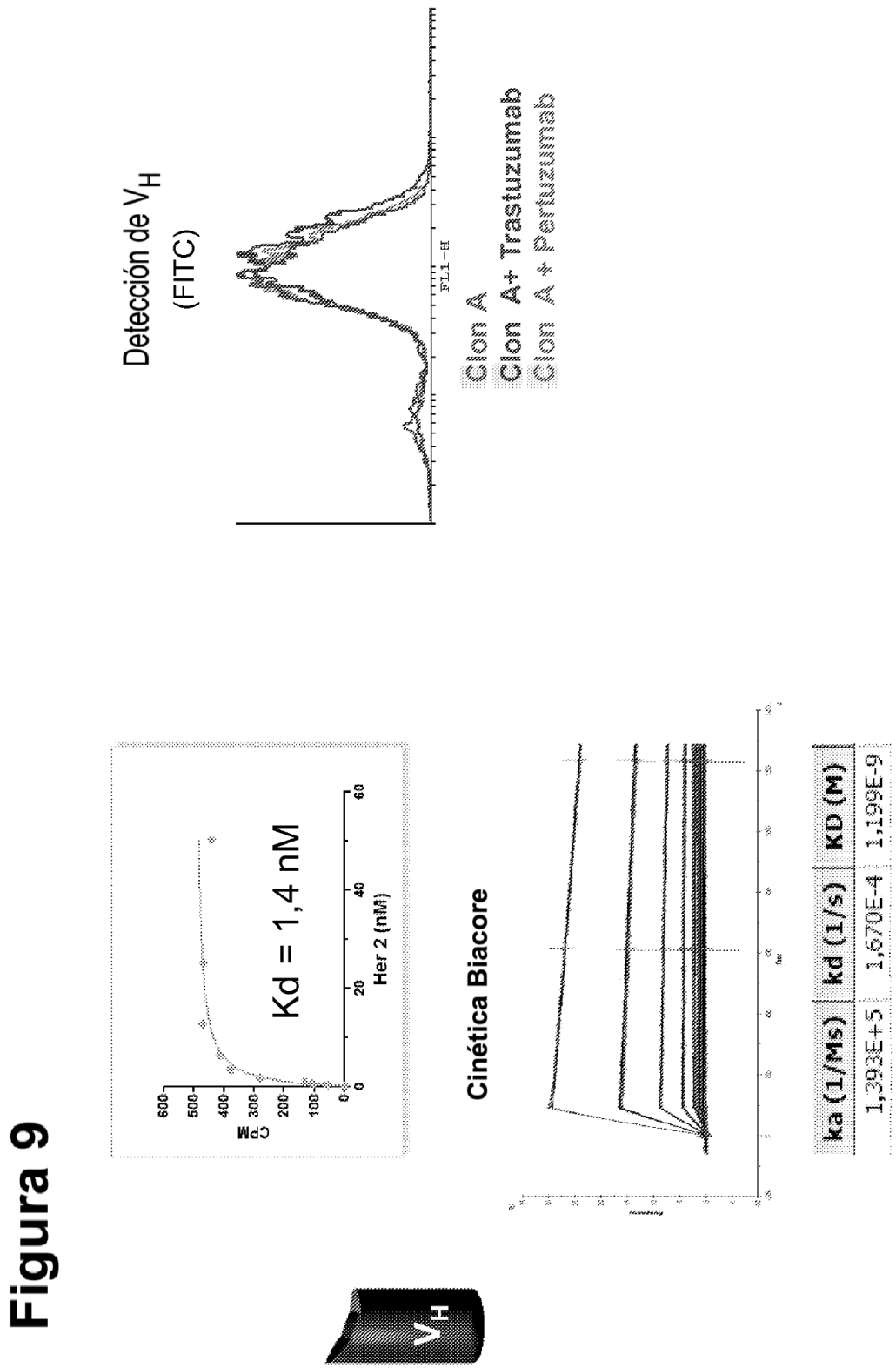

Detección de V_H
(FITC)
FL1-H
Clon A
Clon A+ Trastuzumab
Clon A+ Pertuzumab
CPM
Her 2 (nM)
Kd = 1,4 nM
Cinética Biacore
V_H
ka (1/Ms)
kd (1/s)
KD (M)
1,393E+5
1,670E-4
1,199E-9

Figura 10

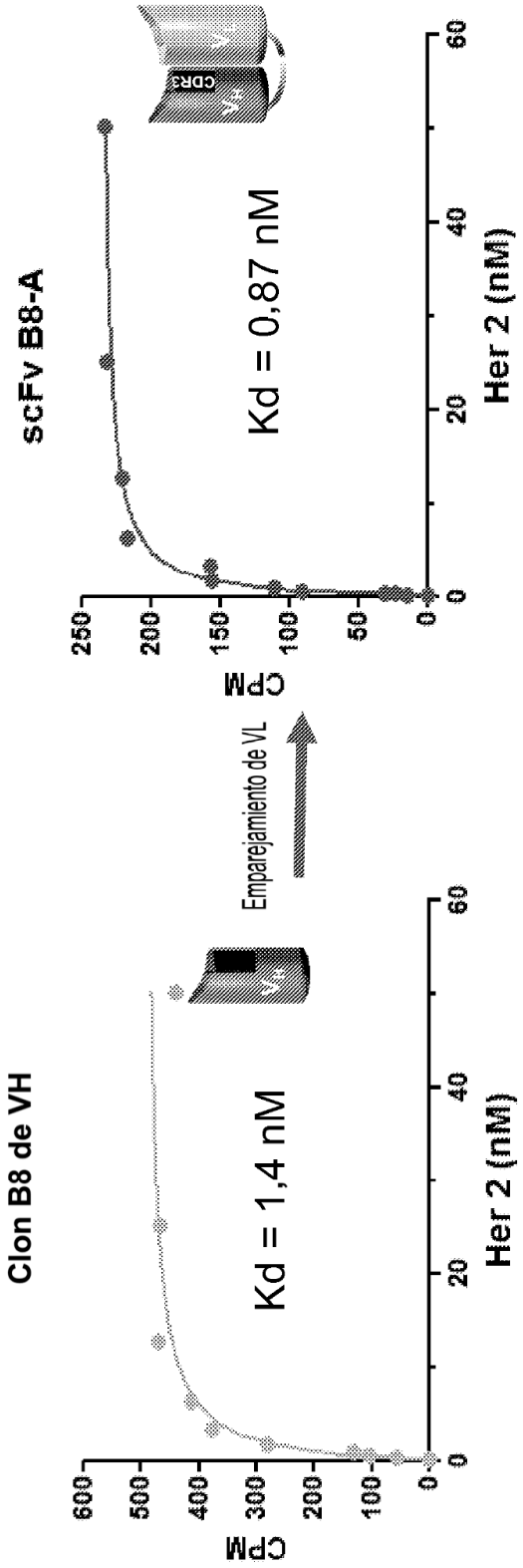

Clon B8 de VH
CPM
Her 2 (nM)
Kd = 1,4 nM
VH
Emparejamiento de VL
scFv B8-A
CPM
Her 2 (nM)
Kd = 0,87 nM
CDR3
VH
VL

Figura 11

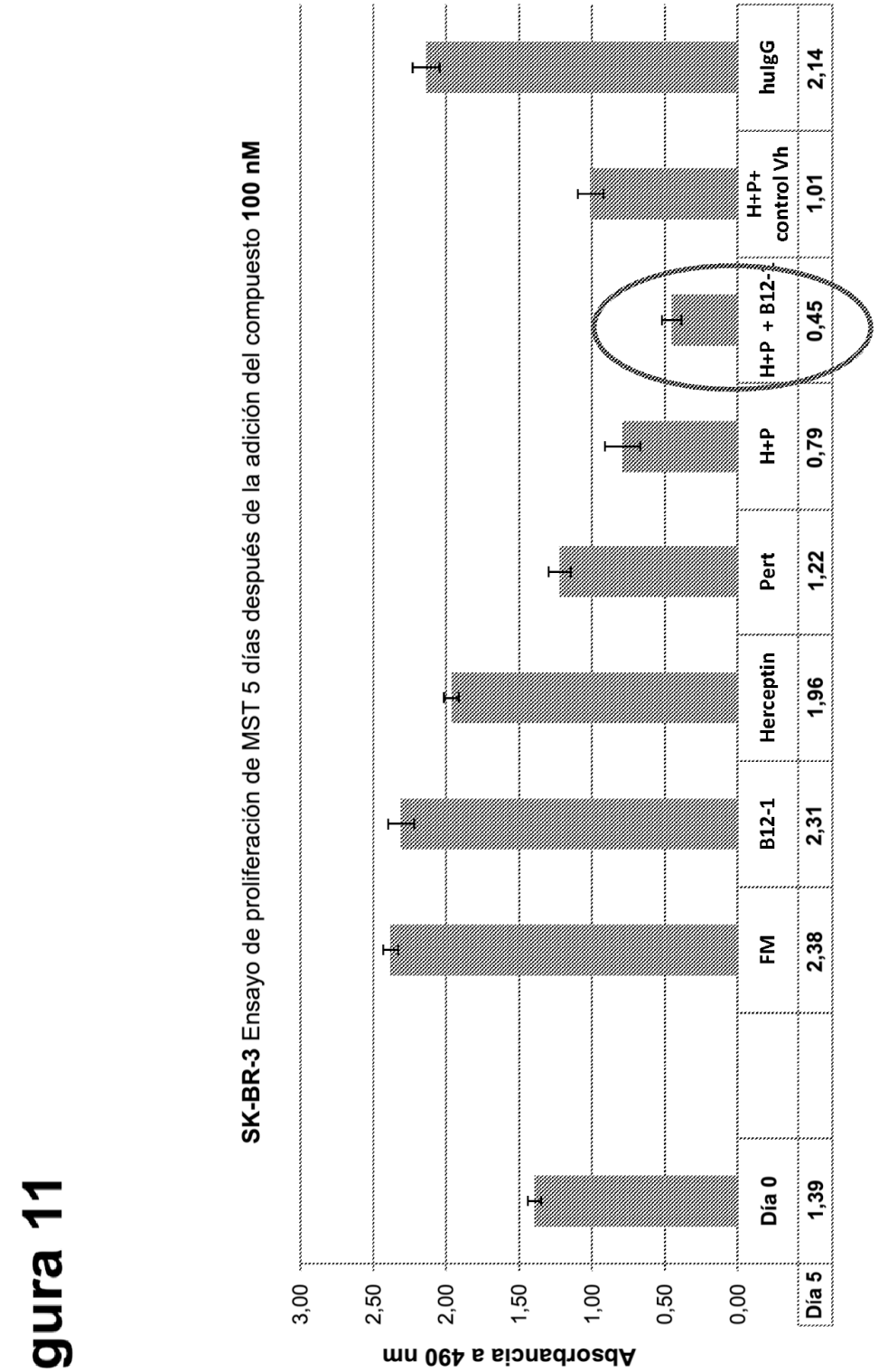
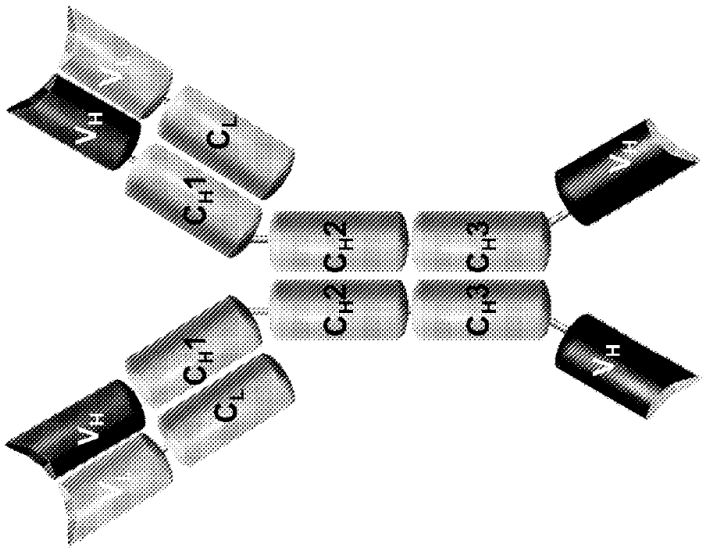

SK-BR-3 Ensayo de proliferación de MST 5 días después de la adición del compuesto 100 nM
Absorbancia a 490 nm
3,00
2,50
2,00
1,50
1,00
0,50
0,00
Día 0
FM
B12-1
Herceptin
Pert
H+P
H+P + B12-1
H+P+ control Vh
hulgG
Día 5
1,39
2,38
2,31
1,96
1,22
0,79
0,45
1,01
2,14

Figura 12


Trastuzumab o Pertuzumab
V_H o scFv Anti-Her2
V_H
V_L
C_H1
C_L
C_H2
C_H3