

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 816 701**

51 Int. Cl.:

C07K 16/46 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.07.2012 PCT/IB2012/053482**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.01.2013 WO13005194**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.07.2012 E 12748555 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.04.2020 EP 2729499**

54 Título: **Fragmentos Fab de anticuerpos mutados multiespecíficos**

30 Prioridad:

07.07.2011 EP 11305872

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

05.04.2021

73 Titular/es:

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (25.0%)**

**3, rue Michel-Ange
75016 Paris, FR;**

**UNIVERSITÉ DE LAUSANNE (25.0%);
AZIENDA SOCIO-SANITARIA TERRITORIALE
PAPA GIOVANNI XXIII (25.0%) y
KADOUCHE, JEAN (25.0%)**

72 Inventor/es:

**KADOUCHE, JEAN;
MACH, JEAN-PIERRE;
MICHIELIN, OLIVIER;
ZOETE, VINCENT;
IWASZKIEWICZ, JUSTYNA;
CERUTTI, MARTINE;
CHOBLET, SYLVIE y
GOLAY, JOSÉE**

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

ES 2 816 701 T3

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

DESCRIPCIÓN

Fragmentos Fab de anticuerpos mutados multiespecíficos

5 La invención se refiere a la producción de moléculas de anticuerpo multiespecíficas, en particular biespecíficas.

De entre los fármacos basados en proteínas, los anticuerpos monoclonales (mAb) presentan una característica particular: actúan como fármaco y como un sistema de administración dirigida. Los mAb recientemente han
10 mostrado un gran potencial en el tratamiento de diversas enfermedades, incluyendo en particular varios tipos de cáncer, contra los que son mucho más específicos que la quimioterapia convencional.

La estructura básica de una molécula de anticuerpo natural es una estructura cuaternaria tetramérica en forma de Y que consiste en dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas, que se mantienen juntas
15 mediante interacciones no covalentes y mediante enlaces disulfuro entre cadenas.

En las especies de mamífero, existen cinco tipos de cadena pesada: α , δ , ϵ , γ y μ , que determinan la clase (isotipo) de la inmunoglobulina: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, respectivamente. Al dominio variable N-terminal de cadena pesada (VH) le sigue una región constante, que contiene tres dominios (numerados CH1, CH2 y CH3 de extremo N-terminal a extremo C-terminal) en las cadenas pesadas γ , α y δ , mientras que la región constante de las cadenas pesadas μ y ϵ está compuesta por cuatro dominios (numerados CH1, CH2, CH3 y CH4 de extremo N-terminal a extremo C-terminal). Los dominios CH1 y CH2 de IgA, IgG e IgD están separados por una bisagra flexible, que varía en longitud según las diferentes clases, y en el caso de IgA e IgG, entre los diferentes subtipos: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 presentan bisagras, respectivamente de 15, 12, 62 (o 77) y 12 aminoácidos, e IgA1 e IgA2 presentan bisagras de 20 y 7 aminoácidos, respectivamente.
20

Existen dos tipos de cadena ligera: λ y κ , que pueden estar asociados a cualquiera de los isotipos de cadena pesada, aunque ambos son del mismo tipo en una molécula de anticuerpo dada. Ambas cadenas ligeras aparentemente son funcionalmente idénticas. A su dominio variable (VL) N-terminal le sigue una región constante que consiste en un dominio único denominado CL.
25

Las cadenas pesadas y ligeras se emparejan mediante interacciones proteína/proteína entre los dominios CH1 y CL, y las dos cadenas pesadas se asocian mediante interacciones proteína/proteína entre sus dominios CH3. La estructura de la molécula de inmunoglobulina se estabiliza generalmente mediante enlaces disulfuro entre cadenas, entre los dominios CH1 y CL y entre las bisagras.
30

La eficacia clínica de los anticuerpos terapéuticos se basa tanto en su función de unión a antígeno como en sus funciones efectoras, que están asociados respectivamente a diferentes partes de la molécula de inmunoglobulina.
35

Las regiones de unión a antígeno corresponden a los brazos de la estructura en forma de Y, cada uno de los cuales consiste en la cadena ligera completa emparejada con los dominios VH y CH1 de la cadena pesada, y se denominan fragmentos Fab (por fragmento de unión a antígeno -"Fragment antigen binding"-). En primer lugar, se generaron fragmentos Fab a partir de moléculas de inmunoglobulina nativas mediante digestión con papaína, que corta la molécula de inmunoglobulina en la región bisagra, en el lado aminoterminal de los enlaces disulfuro entre cadenas, liberando de esta manera dos brazos de unión a antígeno idénticos. Otras proteasas, tales como la pepsina, asimismo cortan la molécula de anticuerpo en la región bisagra, aunque en el lado carboxiterminal de los enlaces disulfuro entre cadenas, liberando fragmentos que consiste en dos fragmentos Fab idénticos y que se mantienen unidos mediante enlaces disulfuro; la reducción de enlaces disulfuro en los fragmentos F(ab')₂ genera fragmentos Fab'.
40

La parte de la región de unión a antígeno correspondiente a los dominios VH y VL se denomina fragmento Fv (por fragmento variable -"Fragment variable"-); contiene las CDR (regiones determinantes de complementariedad), que forman el sitio de unión a antígeno (asimismo denominado paratopo). Además de permitir la dirección específica del anticuerpo a su objetivo, la región de unión a antígeno puede inducir con la unión a su antígeno diana una diversidad de señales biológicas, que pueden ser positivas o negativas dependiendo tanto del antígeno diana como el epítipo reconocido por el anticuerpo en dicho antígeno. Para la utilización en el campo de la terapia del cáncer, generalmente se favorece a los anticuerpos que proporcionan una señal inhibitoria del crecimiento o proapoptótica, resultando en citostasis o en la muerte de las células tumorales (VERMA et al., J. Immunol. 186, 3265-76, 2011).
45

La función efectora del anticuerpo resulta de su unión a moléculas efectoras, tales como las proteínas del complemento, o a receptores de Fc sobre la superficie de células inmunitarias, tales como macrófagos o células asesinas naturales (NK). Resulta en diferentes efectos que conducen a la fagocitosis o lisis del antígeno diana, tal como la fagocitosis dependiente de anticuerpos (ADP), citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) o citotoxicidad mediada por células dependiente del complemento (CDC).
60

La región efectora del anticuerpo que es responsable de su unión a moléculas o células efectoras, correspondiente al tallo de la estructura en forma de Y y contiene los dominios CH2 y CH3 emparejados de la cadena pesada (o
65

los dominios CH2, CH3 y CH4, según la clase del anticuerpo) y se denomina región Fc (por fragmento cristalizable –“Fragment crystallisable”-).

La ADCC, ADP y CDC mediadas por la región Fc desempeñan un papel importante en la actividad terapéutica de los mAb. El mecanismo de ADCC aparentemente es crucial, ya que se ha demostrado que en ratones desnudos deficientes genéticamente en el receptor de Fc gamma, la acción terapéutica contra los xenoinjertos tumorales humanos de los dos mAb clínicamente exitosos principales: anti-HER2 y anti-CD20, resultó anulada prácticamente por completo (CLYNES et al., Nat. Med. 6, 443-6, 2000). El mecanismo de ADP asimismo se ha demostrado que resulta de importancia crucial en varios modelos murinos de tumores humanos (UCHIDA et al., J. Exp. Med. 199: 1659-69, 2004) y CDC asimismo se ha demostrado que desempeña un papel fundamental en la actividad terapéutica de anti-CD20 *in vivo* (DI GAETANO et al., J. Immunol. 171, 1581-7, 2003).

Debido a la identidad de las dos cadenas pesadas y las dos cadenas ligeras, las moléculas de anticuerpo naturales presentan dos sitios de unión a antígeno idénticos y, de esta manera, se unen simultáneamente a dos epítomos idénticos.

En los 1980, se generaron anticuerpos biespecíficos que presentaban en una misma molécula dos sitios de unión a antígeno que reconocían dos epítomos diferentes y que, por lo tanto, eran capaces de unión simultánea a dos dianas diferentes, mediante la fusión de dos células productoras de anticuerpos con especificidades diferentes (MILSTEIN & CUELLO, Nature 305, 537-40, 1983). Se ha demostrado que dichos anticuerpos biespecíficos son capaces de dirigir células T efectoras a células tumorales (STAERZ et al., Nature 314, 628-31, 1985).

Se ha descrito un amplio abanico de aplicaciones de los anticuerpos biespecíficos (SONGSIVILAI & LACHMANN, Clin. Exp. Immunol. 79, 315-21, 1990), incluyendo, por ejemplo, en el campo terapéutico, el reconocimiento de células efectoras (células T citotóxicas, células NK y macrófagos) o de moléculas efectoras (toxinas, fármacos, profármacos, citocinas, isótopos radioactivos y sistema del complemento) y en el campo diagnóstico, la utilización como reactivos en inmunoensayos.

Inicialmente, se prepararon anticuerpos biespecíficos mediante conjugación química, o mediante la utilización de cuadros resultantes de la fusión entre dos estirpes celulares de hibridoma productores de dos mAb diferentes, tal como se presentan en particular en las patentes nº DE 44 19 399 y nº EP 0 826 696. Sin embargo, la conjugación química ocasionalmente puede alterar los sitios de unión a antígeno, resultando en un impacto negativo sobre las propiedades biológicas del anticuerpo. El enfoque del cuadro adolece de la desventaja de que el apareamiento aleatorio de cadenas pesadas y ligeras de dos anticuerpos diferentes conduce teóricamente a diez combinaciones igualmente probables, resultando en una mezcla de moléculas de inmunoglobulina, únicamente una de las cuales es el producto biespecífico deseado, que debe separarse de los productos incorrectamente apareados.

Más recientemente, la ingeniería genética se ha convertido en el método de elección para producir anticuerpos biespecíficos y ha conducido al desarrollo de una amplia diversidad de diferentes formatos de anticuerpo biespecífico recombinante. Una revisión de diferentes enfoques recombinantes de los anticuerpos biespecíficos ha sido propuesta por MARVIN et al. (Acta Pharmacologica sinica, vol. 26, nº 6, 649-658, 1 de junio de 2005).

Algunos de dichos anticuerpos biespecíficos son muy simples y derivan de fragmentos Fv de cadena sencilla (scFv) de dos (o más) anticuerpos diferentes, asociados mediante un conector peptídico apropiado. Dichos anticuerpos resultan relativamente fáciles de producir y debido a que están formados de una única cadena polipeptídica y contienen únicamente las regiones Fv de los anticuerpos parentales, no existe ningún problema de apareamiento incorrecto entre cadenas. Sin embargo, son menores a inmunoglobulinas de longitud completa y no presentan regiones constantes, en particular de la región Fc. Aunque puede resultar ventajoso en algunas aplicaciones, por ejemplo en el caso de que se desee evitar efectos mediados por Fc, es una desventaja en el caso de que se desee una función efectora mediada por Fc, tal como CDC, ADCC o ADP. Además, debido a su pequeño tamaño y falta de región Fc, presentan una semivida muy corta *in vivo*.

Por lo tanto, se han diseñado otros anticuerpos recombinantes biespecíficos, que imitan más estrechamente la molécula de inmunoglobulina natural, y en particular que presentan una región Fc completa. Pueden agruparse en dos formatos principales.

En el primero (scFv de IgG), se fusionan fragmentos scFv de un anticuerpo A con los extremos (generalmente los extremos C-terminales) de las cadenas pesadas de un anticuerpo B. En el anticuerpo resultante, al presentar únicamente un tipo de cadena pesada, que contiene los dominios VH, CH1, CH2 y CH3 del anticuerpo B y los dominios VH y VL del anticuerpo A, y un tipo de cadena ligera que contiene los dominios VL y CL del anticuerpo B, no se produce el apareamiento incorrecto entre cadenas. Dicho formato se describe en, por ejemplo, QU et al. (Blood 111, 2211-9, 2008).

En el segundo, la cadena pesada y la cadena ligera de un anticuerpo A se aparean con la cadena pesada y la cadena ligera de un anticuerpo B. Por ejemplo, el documento nº WO 01/77342 se refiere a anticuerpos multivalentes con dos o más fragmentos Fab que están unidos en tándem mediante conectores peptídicos. Dicho

formato reproduce los anticuerpos biespecíficos producidos por los cuádrumas y, por lo tanto, suscita problemas similares de apareamiento incorrecto. Para resolver el problema del apareamiento incorrecto de las cadenas pesadas, se ha propuesto mutar los dominios CH3 de los anticuerpos a fin de favorecer su heterodimerización (es decir, el apareamiento de la cadena pesada A con la cadena pesada B) y para evitar su homodimerización. Lo anterior se llevó a cabo mediante el enfoque denominado de "botones en ojales" (RIDGWAY et al., Protein Eng, 9, 617-21, 1996; patente US nº 7.695.936). Una mutación de "botón" que consiste en la sustitución de un aminoácido pequeño por uno más grande se introduce en la interfaz de dímero de CH3 de la cadena pesada del anticuerpo A, resultando en un impedimento estérico que evita la homodimerización. Concurrentemente, a fin de estimular la heterodimerización, se introduce una mutación de "ojal" complementaria que consiste en la sustitución de un aminoácido grande por uno más pequeño en el dominio CH3 del anticuerpo B. Para resolver el problema del apareamiento incorrecto de cadena pesada/cadena ligera, se ha propuesto utilizar anticuerpos de diferentes especificidades pero que comparten una cadena ligera común, anteriormente identificada a partir de una biblioteca fágica de scFv (MERCHANT et al., Nat. Biotechnol., 16, 677-81, 1998; patente US nº 7.183.076). La desventaja de dicho enfoque es la dificultad para identificar anticuerpos con una cadena ligera común.

El documento WO 2007/147901 se refiere a la generación de anticuerpos biespecíficos mediante la manipulación de las interfaces de contacto de los dominios CH1 y CL, a fin de revertir la polaridad de las interacciones iónicas existentes. Sin embargo, dicho documento no enseña la creación de la interacción iónica *de novo* entre las interfaces.

El documento WO 2009/089004 describe la generación de anticuerpos biespecíficos, mediante modificación de los dominios CH3 de fragmentos de anticuerpo con el fin de limitar la interacción de homodímeros y favorecer la formación de heterodímeros. Dicho efecto se obtiene mediante sustitución de aminoácidos con carga que participan en interacciones intramoleculares en la interfaz CH3-CH3 o en la interfaz CH1-CL. Dicho documento únicamente sugiere sustituciones que implican aminoácidos con carga. En el contexto de la presente invención se ha descubierto que, mediante la mutación de algunos residuos clave en la interfaz de los dominios CH1 y CL, resulta posible evitar el apareamiento incorrecto de cadena pesada/cadena ligera y, de esta manera, garantizar la correspondencia deseada de las cadenas.

Más específicamente se han descubierto varios grupos de mutaciones adecuados para este fin. En un primer grupo, se intercambia un par de residuos de interfaz polares interactuantes por un par de residuos neutros y formadores de puente salino. Se seleccionó la sustitución de Thr192 por una Glu en la cadena CH1 y el intercambio de Asn137 por una Lys en la cadena CL. Dichos dos residuos mutados forman un puente salino, que se cree que refuerza la especificidad de la asociación, mientras que debe evitarse un apareamiento no deseado por la falta de complementariedad estérica y de carga entre las cadenas de tipo salvaje y variante. Además, se llevó a cabo una sustitución de Ser114 por Ala en la cadena CL para evitar choques estéricos con una cadena lateral de lisinas más grande.

En un segundo grupo de mutaciones, en el contexto de la presente invención se seleccionaron la sustitución de la Leu143 del dominio CH1 por un residuo de Gln, mientras que el residuo situado delante de la cadena CL, que es Val133, se sustituyó por un residuo de Thr. Dicha primera doble mutación constituye el cambio de interacciones hidrofóbicas a polares. Simultáneamente, se seleccionó una mutación de dos serinas interactuantes (Ser188 en la cadena CH1 y Ser176 en la cadena CL) por residuos de valina para llevar a cabo el cambio de interacciones polares a hidrofóbicas. Dicho intercambio del carácter polar/hidrofóbico de las interacciones de interfaz se espera que mantenga sin cambios la afinidad entre los dominios CL y CH1 mutados, reduciendo simultáneamente su afinidad respectiva para otras contrapartidas de tipo salvaje, evitando de esta manera el apareamiento incorrecto en virtud de interacciones desfavorables que se producen en la formación de complejo de cadenas (variantes/de tipo salvaje) incorrectamente apareadas, un par de residuos apolares interactuantes se intercambia por un par de aminoácidos polares, mientras que un par de residuos polares interactuantes se intercambia simultáneamente por un par de residuos hidrofóbicos.

El tercer y cuarto grupos de mutaciones son mutaciones de "botones en ojales". Más específicamente, en el tercer grupo de mutaciones (KH1), Leu124 y Leu143 del dominio CH1 han sido sustituidos respectivamente por un residuo de Ala y un residuo de Glu, mientras que Val133 de la cadena CL ha sido sustituida por un residuo de Trp, y en el cuarto grupo de mutaciones (KH2), Val190 del dominio CH1 ha sido sustituida por un residuo de Ala, y Leu135 y Asn137 de la cadena CL han sido sustituidos, respectivamente, por un Trp y un residuo de Ala.

Los números de posición de secuencia utilizados en la presente memoria para los dominios CH1 y CL se refieren a la numeración de Kabat (Kabat, E.A. et al., Sequences of proteins of immunological interest. 5a edición - US Department of Health and Human Services, NIH publication nº 91-3242, páginas 662, 680 y 689, 1991).

La presente invención se refiere a un fragmento de unión a antígeno multiespecífico tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Además, los fragmentos Fab mutados siguientes se dan a conocer en la presente memoria:

a) un fragmento Fab que consiste en:

* los dominios VH y VL de un anticuerpo de interés,

5 * un dominio CH1 que deriva del dominio CH1 de una inmunoglobulina mediante sustitución del residuo de treonina en la posición 192 de dicho dominio CH1 por un residuo de ácido glutámico, y

10 * un dominio CL que deriva del dominio CL de una inmunoglobulina mediante sustitución del residuo de asparagina en la posición 137 de dicho dominio CL por un residuo de lisina y la sustitución del residuo de serina en la posición 114 de dicho dominio CL por un residuo de alanina,

b) un fragmento Fab que consiste en:

15 * los dominios VH y VL de un anticuerpo de interés,

* un dominio CH1 que deriva del dominio CH1 de una inmunoglobulina mediante sustitución del residuo de leucina en la posición 143 de dicho dominio CH1 por un residuo de glutamina y la sustitución del residuo de serina en la posición 188 de dicho dominio CH1 por un residuo de valina, y

20 * un dominio CL que deriva del dominio CL de una inmunoglobulina mediante sustitución del residuo de valina en la posición 133 de dicho dominio CL por un residuo de treonina y la sustitución del residuo de serina en la posición 176 de dicho dominio CL por un residuo de valina.

c) un fragmento Fab que consiste en:

25 * los dominios VH y VL de un anticuerpo de interés,

30 * un dominio CH1 que deriva del dominio CH1 de una inmunoglobulina IgG mediante sustitución del residuo de leucina en la posición 124 de dicho dominio CH1 por un residuo de alanina y sustitución del residuo de leucina en la posición 143 de dicho dominio CH1 por un residuo de ácido glutámico,

* un dominio CL que deriva del dominio CL de una inmunoglobulina IgG mediante sustitución del residuo de valina en la posición 133 de dicho dominio CL por un residuo de triptófano,

35 d) un fragmento Fab que consiste en:

* los dominios VH y VL de un anticuerpo de interés,

40 * un dominio CH1 que deriva del dominio CH1 de una inmunoglobulina mediante sustitución del residuo de valina en la posición 190 de dicho dominio CH1 por un residuo de alanina, y

45 * un dominio CL que deriva del dominio CL de una inmunoglobulina por sustitución del residuo de leucina en la posición 135 de dicho dominio CL por un residuo de triptófano, y sustitución del residuo de asparagina en la posición 137 de dicho dominio CL por un residuo de alanina.

50 Según una forma de realización preferida, el dominio CH1 deriva de una inmunoglobulina IgG, ventajosamente del subtipo IgG1. El dominio CL es preferentemente de tipo kappa. Preferentemente, para la utilización en terapia humana, la inmunoglobulina a partir de la que se derivan los dominios CH1 y CL mutados es una inmunoglobulina humana.

Los dominios VH y VL pueden derivarse de cualquier anticuerpo, nativo o manipulado genéticamente, que reconoce un epítipo que se desea como diana.

55 Los fragmentos Fab mutados de la invención pueden utilizarse en cualquier constructo de anticuerpos multiespecífico en el que resulte necesario evitar el apareamiento incorrecto de cadena pesada/cadena ligera.

Ventajosamente, se utilizan en un nuevo constructo de anticuerpos multiespecífico diseñado en el contexto de la presente invención, que comprende uno o más fragmentos de unión a antígeno multiespecíficos, cada uno de los cuales consiste esencialmente en fragmentos Fab dispuestos en tándem, separados por conectores apropiados.

60 Un "fragmento de unión a antígeno" se define en la presente memoria como una molécula que presenta dos o más regiones de unión a antígeno, cada una de las cuales reconoce un epítipo diferente. Los diferentes epítopos pueden ser transportados por una misma molécula antigénica o por diferentes moléculas antigénicas.

65 Por lo tanto, un fragmento de unión a antígeno multiespecífico puede comprender por lo menos dos, y hasta cinco, fragmentos Fab diferentes, seleccionados de entre:

- un fragmento Fab (en la presente memoria asimismo definido como un: "Fragmento Fab de tipo salvaje") que comprende dominios CH1 y CL de tipo salvaje de una inmunoglobulina,
- 5
- un fragmento Fab mutado (a) tal como se ha definido anteriormente,
 - un fragmento Fab mutado (b) tal como se ha definido anteriormente,
- 10
- un fragmento Fab mutado (c) tal como se ha definido anteriormente,
 - un fragmento Fab mutado (d) tal como se ha definido anteriormente,

15 Cada fragmento Fab que reconoce un epítipo de interés diferente y dichos fragmentos Fab dispuestos en tándem en cualquier orden, unen el extremo C-terminal del dominio CH1 de un primer fragmento Fab al extremo N-terminal del dominio VH del fragmento Fab siguiente mediante un conector polipeptídico. Generalmente, dicho conector polipeptídico debe presentar una longitud de por lo menos 20, preferentemente de por lo menos 25, y todavía más preferentemente de por lo menos 30, y hasta 80, preferentemente hasta 60, y todavía más preferentemente hasta 40 aminoácidos.

20 Ventajosamente, dicho conector polipeptídico comprende la totalidad o parte de la secuencia de la región bisagra de una o más inmunoglobulinas seleccionadas de IgA, IgG e IgD. En el caso de que el anticuerpo vaya a utilizarse en terapia humana, resultarán preferidas las secuencias bisagra de origen humano.

25 Las secuencias de las regiones bisagra de IgG, IgA e IgD humanas se indican a continuación:

IgA1 (SEC ID nº 1):
VPSTPPTPSPSTPPTSPSPS

IgA2 (SEC ID nº 2):
VPPPPP

30 IgD (SEC ID nº 3):
ESPKAQASSVPTAQPQAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEEKKKEKEKEEQEERETKTP

IgG1 (SEC ID nº 4):
EPKSCDKTHTCPPCP

IgG2 (SEC ID nº 5):
35 ERKCCVECP

IgG3:
ELKTPGLDTHTCPRCP (SEC ID NO: 6) seguido de 0 o 1 a 4 repeticiones de EPKSCDTPPPCPRCP (SEC ID nº 7).

IgG4:
40 ESKYGPPCPSCP (SEC ID NO: 8)

Dicho conector polipeptídico puede comprender la totalidad o parte de la secuencia de la región bisagra de únicamente una inmunoglobulina. En este caso, dicha inmunoglobulina puede pertenecer al mismo isotipo y subclase que la inmunoglobulina de la que se deriva el dominio CH1 contiguo, o a un isotipo o subclase diferente.

45 Alternativamente, dicho conector polipeptídico puede comprender la totalidad o parte de las secuencias de regiones bisagra de por lo menos dos inmunoglobulinas de diferentes isotipos o subclases. En este caso, la parte N-terminal del conector polipeptídico, que sigue directamente al dominio CH1, preferentemente consiste en la totalidad o parte de la región bisagra de una inmunoglobulina perteneciente al mismo isotipo y subclase que la inmunoglobulina de la que deriva dicho dominio CH1.

50 Opcionalmente, dicho conector polipeptídico puede comprender además una secuencia de 2 a 15, preferentemente de 5 a 10 aminoácidos N-terminales del dominio CH2 de una inmunoglobulina.

55 En algunos casos, pueden utilizarse secuencias de regiones bisagra nativas; en otros casos, pueden introducirse mutaciones puntuales en dichas secuencias; en particular, la sustitución de uno o más residuos de cisteína en las secuencias bisagra de IgG1, IgG2 o IgG3 nativa por alanina o serina, a fin de evitar enlaces disulfuro intracadena o entre cadenas no deseados.

60 Un ejemplo no limitativo de un conector polipeptídico que puede utilizarse en un fragmento de unión a antígeno multiespecífico de la invención es un polipéptido que presenta la secuencia a continuación: EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSTPPTPSPSGG (SEC ID nº 9). Dicho polipéptido consiste en la secuencia de longitud completa de la bisagra de IgG1 humana (SEC ID nº 4), seguido de los 9 aminoácidos N-terminales de CH2 de IgG1 humana (APELLGGPS, SEC ID nº 10), por una parte de la secuencia de bisagra de IgA1 humana (TPPTSPSPS, SEC ID nº 11) y por el dipéptido GG, añadido para proporcionar flexibilidad complementaria al conector.

65

Opcionalmente, puede utilizarse una parte más corta de la secuencia N-terminal del dominio CH2 de IgG1 humana. Además, puede utilizarse una parte más larga de la bisagra de IgA1 humana, hasta su secuencia de longitud completa (preferentemente menos el residuo de valina N-terminal). Según una forma de realización particular, dicha secuencia de bisagra de IgA1 humana puede sustituirse por una secuencia artificial, que contiene una alternancia de residuos de treonina, serina y prolina

Por ejemplo, una variante del polipéptido SEC ID nº 9, que asimismo resulta adecuado para la utilización en un fragmento de unión a antígeno multiespecífico de la invención, es un polipéptido que presenta la secuencia a continuación: EPKSCDKTHTCPPCPAPELLPSTPPSPSTPGG (SEC ID nº 12). En dicho polipéptido, a la secuencia de longitud completa de la bisagra de IgG1 humana siguen los 5 aminoácidos N-terminal de CH2 de IgG1 humana (APELL, SEC ID nº 13) y la secuencia PSTPPSPSTP (SEC ID nº 14).

En el caso de un fragmento de unión a antígeno multiespecífico de la invención, que comprende más de dos fragmentos Fab diferentes, los conectores polipeptídicos que separan los fragmentos Fab pueden ser idénticos o diferentes.

Según una forma de realización preferida de un anticuerpo multiespecífico de la invención, presenta dos brazos de unión a antígeno diferentes, consistiendo cada uno de un fragmento de unión a antígeno multiespecífico tal como se ha definido anteriormente. Los brazos de unión a antígeno pueden unirse entre sí de diversas maneras, según el uso pretendido para el anticuerpo.

Si se desea obtener un anticuerpo sin efectos mediados por Fc, el anticuerpo no comprenderá ninguna región c. En este caso, los dos brazos de unión a antígeno pueden unirse entre sí, por ejemplo:

- mediante homodimerización de los brazos de unión a antígeno mediante los enlaces disulfuro entre cadenas proporcionados por el conector o conectores polipeptídicos que separan los fragmentos Fab en el caso de que dicho conector contenga residuos de cisteína, y/o
- a través de la adición en el extremo C-terminal de cada brazo de unión a antígeno, de una extensión polipeptídica que contiene residuos de cisteína que permite la formación de enlaces disulfuro entre cadenas y la homodimerización de dicha extensión polipeptídica, resultando en una estructura de tipo bisagra; a título de ejemplos no limitativos, dicha extensión polipeptídica puede ser, por ejemplo, una secuencia de bisagra de una IgG1, IgG2 o IgG3,
- a través de un conector semirrígido que une los extremos C-terminales de las cadenas pesadas de los dos brazos de unión a antígeno para formar una única cadena polipeptídica y mantener dichos brazos de unión a antígeno a una distancia suficiente entre sí.

Alternativamente, en el caso de que se deseen funciones efectoras, tales como CDC, ADCC o ADP, un anticuerpo multiespecífico de la invención comprenderá además un dominio Fc que proporciona dichas funciones efectoras. La elección del dominio Fc dependerá del tipo de funciones efectoras que se desean.

En este caso, un anticuerpo multiespecífico de la invención presenta una estructura de tipo inmunoglobulina, que comprende:

- dos brazos de unión a antígeno multiespecíficos idénticos tal como se ha definido anteriormente,
- los dominios CH2 y CH3 dimerizados de una inmunoglobulina,
- La región bisagra de una IgA, IgG o IgD, que une los extremos C-terminales de los dominios CH1 de los brazos de unión a antígeno a los extremos N-terminales de los dominios CH2, o alternativamente, los dominios CH4 de una IgM o IgE después de los dominios CH3, estando unidos los extremos C-terminales de los dominios CH1 de los brazos de unión a antígeno en este caso directamente a los extremos N-terminales de los dominios CH2.

Preferentemente, los dominios CH2 y CH3 y la región bisagra o los dominios CH4 derivan de una misma inmunoglobulina o de inmunoglobulinas del mismo isotipo y subclase que los dominios CH1 del brazo de unión a antígeno.

Pueden utilizarse los dominios CH2, CH3, y eventualmente CH4, así como las regiones bisagra de inmunoglobulinas nativas. Asimismo resulta posible mutarlas, si se desea, por ejemplo a fin de modular la función efectora del anticuerpo. En algunos casos, puede omitirse la totalidad o parte del dominio CH2 o CH3.

Otro objetivo de la invención es un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica un fragmento de unión a antígeno multiespecífico tal como se define en las reivindicaciones. Dicho polinucleótido puede comprender

además secuencias adicionales: en particular, puede comprender ventajosamente una secuencia codificante de una secuencia líder o péptido de señal que permite la secreción de dicha cadena proteica.

5 La presente invención comprende además vectores recombinantes, en particular vectores de expresión, que comprenden un polinucleótido de la invención, asociado a elementos de control de la transcripción y traducción, que son activos en la célula hospedadora seleccionada. Los vectores que pueden utilizarse para construir vectores de expresión según la invención son conocidos por sí mismos y se seleccionarán en particular como función de la célula hospedadora que se pretende utilizar.

10 La célula hospedadora puede transformarse con un polinucleótido de la invención. Preferentemente, dicha célula hospedadora se transforma con un polinucleótido codificante de una cadena pesada de un fragmento de unión a antígeno o de un anticuerpo multiespecífico de la invención, y dos polinucleótidos codificantes de dos cadenas ligeras diferentes: una primera cadena ligera que se aparea específicamente con una primera región VH/CH1 de dicha cadena pesada; una segunda cadena ligera que se aparea específicamente con una segunda región VH/CH1
15 de dicha cadena pesada y por lo menos una de dichas cadenas ligeras es una cadena ligera de un fragmento Fab mutado según la reivindicación 1. Opcionalmente, dicha célula hospedadora puede transformarse adicionalmente con un tercer polinucleótido codificante de una tercera cadena ligera diferente de la primera y segunda cadenas ligeras, y que se aparea específicamente con una tercera región VH/CH1 de dicha cadena pesada y eventualmente con un cuarto polinucleótido codificante de una cuarta cadena ligera diferente de la primera, segunda y tercera
20 cadenas ligeras y que se aparea específicamente con una cuarta región VH/CH1 de dicha cadena pesada, y posiblemente con un quinto polinucleótido codificante de una quinta cadena ligera diferente de la primera, segunda, tercera y cuarta cadena ligera, y que se aparea específicamente con una quinta región VH/CH1 de dicha cadena pesada.

25 Dichos polinucleótidos pueden insertarse en un mismo vector de expresión, o en vectores de expresión separados.

Las células hospedadoras que pueden utilizarse en el contexto de la presente invención pueden ser células procarióticas o eucarióticas. Entre las células eucarióticas que pueden utilizarse, se hace mención particular de células vegetales, células de levadura, tales como *Saccharomyces*, células de insecto, tales como células de
30 *Drosophila* o de *Spodoptera*, y células de mamífero, tales como HeLa, CHO, 3T3, C127, BHK, células COS, etc.

La construcción de vectores de expresión de la invención y la transformación de las células hospedadoras pueden llevarse a cabo mediante las técnicas convencionales de la biología molecular.

35 Todavía otro objetivo de la invención es un método para preparar un fragmento de unión a antígeno o un anticuerpo de la invención. Dicho método comprende cultivar una célula hospedadora de la invención y recuperar dicho fragmento de unión a antígeno o anticuerpo a partir de dicho cultivo.

40 En el caso de que la proteína sea secretada por la célula hospedadora, puede recuperarse directamente a partir del medio de cultivo; en caso contrario, la lisis celular se lleva a cabo previamente. A continuación, el anticuerpo puede purificarse a partir del medio de cultivo o a partir del lisado celular, mediante procedimientos convencionales, conocidos por sí mismos por el experto en la materia, por ejemplo mediante precipitación fraccionada, en particular precipitación con sulfato amónico, electroforesis, filtración en gel, cromatografía de afinidad, etc.

45 Los anticuerpos multiespecíficos de la invención pueden utilizarse en todas las aplicaciones de anticuerpos multiespecíficos. En particular, puede utilizarse para obtener medicamentos útiles en un amplio abanico de aplicaciones terapéuticas. Dichos productos medicinales asimismo forman parte del objeto de la invención.

50 En particular, los anticuerpos multiespecíficos de la invención pueden utilizarse para el tratamiento de diversas enfermedades mediante inmunoterapia, incluyendo, por ejemplo: la inmunoterapia pasiva para patologías malignas, los tumores hematológicos y sólidos o enfermedades autoinmunitarias, inflamación, rechazo del injerto, trasplante, inmunoterapia activa, mediante modulación de la interacción entre diferentes poblaciones celulares, en particular células inmunitarias durante enfermedades autoinmunitarias o inflamación; inmunoterapia adoptiva que combina células inmunitarias con anticuerpos multiespecíficos; internalización de anticuerpos neutralizantes en un
55 compartimiento intracelular seleccionado.

A título de ejemplos no limitativos:

- 60 • pueden utilizarse anticuerpos multiespecíficos de la invención dirigidos contra diferentes antígenos expresados por una célula diana, a fin de inducir su muerte por apoptosis, su regulación negativa o, a la inversa, su activación;
- puede utilizarse anticuerpos multiespecíficos de la invención dirigidos contra antígenos expresados sobre células diana efectoras, a fin de puentear los dos tipos de células a fin de inducir, por ejemplo, la eliminación
65 de las células diana, por las células efectoras;

- anticuerpos multiespecíficos dirigidos contra diferentes factores circulantes solubles para eliminar o bloquear simultáneamente dichos factores circulantes solubles, por ejemplo la eliminación simultánea de VEGF y PDGF durante el curso de la terapia de cáncer, o la eliminación (o bloqueo) simultánea de diferentes moléculas que inhiben la actividad de la inmunoterapia, tal como CTLA4, muerte celular programada 1 (PD1) o TIM3 o BTLA, o en el campo de la terapia antiinflamatoria, la utilización de anticuerpo multiespecífico dirigido contra diferentes citocinas inflamatorias, tales como factor de necrosis tumoral (TNF) e interleucina-1 beta (IL1- β).

La presente invención se entenderá más claramente a partir de la descripción adicional a continuación, que se refiere a ejemplos no limitativos de la preparación y propiedades de un fragmento de unión a antígeno multiespecífico de acuerdo con la invención.

Ejemplo 1: diseño de un anticuerpo biespecífico anti-CD5/anti-HLA-DR

Diseño de fragmentos Fab mutantes

Los anticuerpos seleccionados para la construcción de anticuerpos biespecíficos eran anticuerpo anti-CD5 y un anticuerpo anti-HLA-DR, ambos descritos en la patente PCT nº WO 2010/145895.

Bajo su forma nativa, dichos anticuerpos eran anticuerpos monoclonales (mAb) murinos, de los isotipos IgG2a e IgG1, respectivamente, con cadenas ligeras kappa. Ambos mAb se transformaron previamente en mAb quiméricos de ratón/humanos con los dominios constantes de la cadena pesada de subclase IgG1 humana y la parte constante de las cadenas ligeras de tipo kappa, mientras que los dominios variables de ambas cadenas se mantuvieron de origen de ratón.

Se introdujeron dos grupos diferentes de mutaciones complementarias en sitios seleccionados de las cadenas CH1 y CL del anticuerpo anti-CD5, manteniendo el anticuerpo anti-HLA-DR en su forma nativa.

Los sitios de mutación en el anticuerpo anti-CD5 se seleccionaron por ser importantes para la unión CL/CH1, aunque conservando los residuos más esenciales que participan en un plegado correcto.

Se utilizaron los enfoques siguientes, denominados “residuos con carga” y “intercambio de hidrofobicidad-polaridad”.

En el enfoque de “residuos cargados”, se intercambió una pareja de residuos de interfaz polar interactuantes por una pareja de residuos neutros y formadores de puente salino. La introducción de un puente salino se conjeturó que reforzaba la especificidad de la asociación, mientras que debía evitarse un apareamiento no deseado por la falta de complementariedad estérica y de carga entre las cadenas de tipo salvaje y variantes. Tras amplios ensayos *in silico*, se seleccionó la sustitución de Thr192 por una Glu en la cadena CH1 e intercambio de Asn137 por una Lys en la cadena CL. Dichos dos residuos mutados forman un puente salino. Además, se realizó una sustitución de Ser114 por Ala en la cadena CL para evitar choques estéricos con una cadena lateral de lisinas más grande. El mutante resultante se denomina posteriormente en la presente memoria “mutante CR3”.

Para el enfoque de “intercambio de hidrofobicidad-polaridad”, se obtuvieron los dominios constantes modificados mediante la introducción de una mutación cuádruple (doble mutación en cada cadena). Dicha modificación intercambia la naturaleza de dos interacciones residuo-residuo en la interfaz CH1/CL de IgG. Se intercambia una pareja de residuos apolares interactuantes por una pareja de aminoácidos polares, mientras que una pareja de residuos polares interactuantes se intercambia simultáneamente por una pareja de residuos hidrófobos. Dichos intercambios del carácter polar/hidrófobo de las interacciones de interfaz se conjeturó que mantenía la afinidad entre los dominios CH y CH1 mutados sin cambios, reduciendo simultáneamente su afinidad respectiva para otras contrapartidas de tipo salvaje, evitando de esta manera el apareamiento incorrecto en virtud de interacciones no favorables que se producen con la formación de complejos de cadenas incorrectamente apareados (variante/tipo salvaje).

Tras los ensayos *in silico* de muchas mutaciones potenciales, en el contexto de la presente invención se seleccionó sustituir Leu143 del dominio CH1 por un residuo Gln, mientras que el residuo situado delante en la cadena CL, es decir Val133, se sustituyó por un residuo de Thr. Dicha primera doble mutación constituye el intercambio de interacciones hidrófobas a polares. Simultáneamente, se seleccionó una mutación de dos serinas interactuantes (Ser188 en la cadena CH1 y Ser176 en la cadena CL) en residuos de valina para llevar a cabo el cambio de interacciones polares a hidrofóbicas. El mutante resultante se denominó a continuación en la presente memoria “mutante mut4”.

Las mutaciones seleccionadas se resumen en la tabla 1, a continuación:

Tabla I

Modificaciones	CH1 de cadena pesada	CL de cadena ligera
Residuos con carga <i>mutante CR3</i>	Thr192Glu,	Asn137Lys y Ser114Ala
Cambio de hidrofobicidad-polaridad <i>mutante mut4</i>	Leu143Gln y Ser188Val	Val133Thr y Ser176Val

5 Se introdujeron otras mutaciones utilizando el enfoque de "botones en ojales" (RIDGWAY et al., Protein Eng, 9, 617-21, 1996).

Se resumen dichas mutaciones en la tabla II, a continuación:

Tabla II

10

	CH1/Cadena pesada	CL/Cadena ligera
KH1	Leu124Ala y Leu143Glu	Val133Trp
KH2	Val190Ala	Leu135Trp y Asn137Ala

15

Se evaluaron las energías libres de unión de los complejos mutados, utilizando el método MM-GBSA. Simultáneamente, se crearon los modelos de los complejos incorrectamente apareados y se calcularon sus energías de interacción mediante la misma metodología. Para las modificaciones seleccionadas, se estimó que el complejo entre las cadenas CL y CH1 modificadas era tan estable como el complejo de tipo salvaje, mientras que se observaron interacciones significativamente desfavorables en los complejos incorrectamente apareados.

Diseño de un conector polipeptídico

20

Se diseñó un conector polipeptídico para unir el extremo C-terminal de la región CH1 del anticuerpo anti-HLADR al extremo N-terminal de la región VH del anticuerpo anti-CD5 mutante.

25

Dicho conector polipeptídico comprende una región bisagra de IgG1 de longitud completa, seguido de los 9 aminoácidos N-terminal de CH2 de IgG1 humana, por una parte de la secuencia de la bisagra de IgA1 humana y por el dipéptido GG. Presentaba la secuencia a continuación: EPKSCDKTHTCPPAPELLGGPSTPPTSPSPGG (SEC ID nº 9)

30

Ejemplo 2: construcción de un baculovirus recombinante que expresa el anticuerpo biespecífico anti-HLADR (MAB1) y anti-CD5 (MAB2).

Se expresó el anticuerpo biespecífico y se produjo utilizando el sistema de expresión de células de baculovirus/insecto.

35

Dicha producción requirió la síntesis de una cadena pesada modificada que comprendía el dominio VH/CH1/bisagra de un mAb 1 fusionado con la cadena pesada de longitud completa de mAb2 y separada por un conector que comprendía, por ejemplo (en el presente constructo de los presentes inventores), la bisagra inferior extendida con un péptido derivado de la bisagra natural de IgA1 humana + GG.

40

Las dos cadenas ligeras diferentes, una específica del primer anticuerpo y la otra específica del segundo anticuerpo se sintetizaron independientemente y se aparearon con las cadenas pesadas relevantes, debido a las mutaciones recíprocas introducidas en los diferentes dominios CL y CH1 tal como se ha indicado anteriormente.

45

Podría resultar más fácil construir dos baculovirus diferentes: el primero que expresa la cadena pesada fusionada y únicamente una cadena ligera y el segundo que expresa la cadena pesada fusionada y la segunda cadena ligera, y coinfectar células de insecto con la mezcla. Sin embargo, dicho enfoque es más largo y resultaría muy difícil controlar la estequiometría de cada miembro de la pareja. Por lo tanto, en el contexto de la presente invención se decidió construir únicamente un virus recombinante que expresaba la cadena pesada fusionada y las dos cadenas ligeras.

50

Lo anterior requirió la introducción en dicho baculovirus de dos secuencias idénticas para los dominios CL y dos secuencias idénticas para los dominios de CH1-bisagra (CH1-Hg) de la cadena pesada. Dicha identidad puede inducir una recombinación homóloga que conduce a una reorganización del genoma y a la pérdida de información genética.

55

Con el fin de evitar dicho fenómeno, en el contexto de la presente invención se introdujo únicamente una secuencia codificante de tipo salvaje, siendo la segunda sintética (modificación de todos los codones). En esta última, la secuencia de ADN era diferente de la original, aunque codificaba una proteína idéntica (100%) a la de tipo salvaje.

2.1 Construcción del ADNc codificante de cadena pesada fusionada

Fab anti-HLADR + conector

5 Se construyó un gen sintético codificante del dominio CH1 del anticuerpo anti-HLADR fusionado con el conector polipeptídico de SEC ID nº 9 utilizando la hibridación de oligonucleótidos solapantes sintéticos.

10 Tras la clonación en un plásmido pUC y el control de las secuencias, se introdujo dicho gen sintético, en lugar de la secuencia de tipo salvaje en el plásmido pOCy1KCH1SII/LinkerA1PstI/VHanti-HLADR, entre la secuencia codificante del dominio VH anti-HLADR y la secuencia codificante del péptido de extensión indicado en el ejemplo 1, anteriormente. El plásmido resultante se denominó pOCy1KCH1εconectorA1/VH.

Fab anti-CD5 mutado:

15 A fin de garantizar el apareamiento correcto entre cadenas pesadas y ligeras, se introdujeron las mutaciones CR3 y mut4 (KH1 o KH2) en el dominio CH1 de la fracción Fab anti-CD5. Se digirió el plásmido pUCCylmutT192E (es decir, para el mutante CR3) con NheI/BstXI y el fragmento portador de la secuencia mutada se purificó y se insertó en pUCKPSCy1/VHCD5 digerido con NheI/BstXI, proporcionando pUCKPSCy1/VHCD5-CR3.

20 De la misma manera, se construyó pUCKPSCy1/VHCD5-mut4, (pUCKPSCy1/VHCD5-KH1 y pUCKPSCy1/VHCD5-KH2).

Cadena pesada fusionada de longitud completa:

25 Se construyó el ADNc codificante de las cadenas pesadas fusionadas de longitud completa, proporcionando pVTanti-HLADR/conectorA1/antiCD5/CR3, pVTanti-HLADR/conectorA1/antiCD5/mut4, (pVTanti-HLADR/conectorA1/antiCD5/KH1, pVTanti-HLADR/conectorA1/antiCD5/KH2), respectivamente.

30 Los vectores de transferencia resultantes se denominaron pVTanti-HLADR/conectorA1/antiCD5/CR3 y pVTanti-HLADR/conectorA1/antiCD5/mut4 (pVTanti-HLADR/conectorA1/antiCD5/KH1 y pVTanti-HLADR/conectorA1/antiCD5/KH2), respectivamente.

2.2 Construcción del ADNc codificante de la cadena ligera

Construcción de un nuevo vector de transferencia

35 La producción de un anticuerpo biespecífico totalmente funcional requiere la coexpresión de: (i) una cadena pesada fusionada tal como se ha indicado anteriormente y (ii) dos cadenas ligeras, portando la cadena ligera específica de anti-CD5 las mutaciones (CR3, mut4, KH1 o KH2) y la cadena ligera de anti-HLADR (mAb1). Lo anterior requiere seleccionar un tercer locus, aparte de los loci clásicos de polihedrina y p10, para insertar una tercera secuencia codificante en el genoma de baculovirus. Por lo tanto, se seleccionó un locus denominado "gp37" (CHENG et al. J. Gen. Virol., 82, 299-305, 2001) que no resulta esencial para la replicación baculovírica, permitiendo la inserción de un gen foráneo.

45 Se construyó un nuevo vector de transferencia (pVTgp37) que contenía un sitio de clonación XbaI único bajo el control de un promotor P10 sintético, flanqueado por secuencias de gp37.

Construcción de un dominio CL sintético

50 Tal como se ha indicado anteriormente para la reconstitución del dominio CH1 de la cadena pesada, se sintetizó el dominio CL sintético utilizando oligonucleótidos sintéticos solapantes. Se generaron dos subfragmentos: CKFr1 y CKFr2.

55 Tras la clonación en un plásmido pUC y el control de las secuencias, se introdujeron CKFr1 y CKFr2, en lugar de la secuencia de tipo salvaje codificante del dominio Ck en el plásmido pUCK/VL anti-HLADR.

Introducción de la cadena ligera en el vector de transferencia de gp37

60 La secuencia reconstituida codificante de la cadena ligera que contenía el dominio constante sintético Ck se aisló tras la digestión con XbaI y se introdujo en el vector de transferencia pVTgp37 en el sitio XbaI único, proporcionando el constructo final pVTgp37P10S1CKεVL anti-HLADR.

2.3 Construcción de virus recombinantes

65 La construcción de un virus recombinante que expresa el anticuerpo biespecífico requiere dos etapas: (i) la construcción de un primer baculovirus que expresa únicamente la cadena ligera de mAb 1, el anticuerpo anti-HLADR, (ii) la construcción del virus que expresa el anticuerpo biespecífico, anti-CD5/anti-HLADR.

Construcción de un virus recombinante que expresa el anticuerpo anti-HLADR

5 Con este fin, se cotransfectaron células Sf9 con pVTgp37P10S1CKεVL/anti-HLADR y con ADN extraído de un baculovirus modificado que expresaba el gen polihedrina bajo el control del promotor de gp37 en el locus gp37.

Se aislaron virus recombinantes que mostraban un fenotipo “polihedrina negativo” y el genoma de los cuatro virus recombinantes se controló mediante transferencia southern utilizando el ADNc kappa sintético como sonda. Se seleccionó un virus recombinante denominado BacLC/anti-HLADR.

10 Construcción de virus recombinantes que expresan el anticuerpo biespecífico

15 Se cotransfectaron células Sf9 con vectores de transferencia portadores del ADNc codificante de las cadenas pesadas fusionadas pVTanti-HLADR/conectorA1/anti-CD5 (CR3, mut4, KH1 o KH2) y vectores de transferencia portadores del ADNc codificante de las cadenas ligeras de mAb2 pVTVLIICD5CkmutCR3, pVTVLIICD5Ckmut4, (pVTVLIICD5CkKH1 o pVTVLIICD5CkKH2) en presencia de ADN vírico extraído de BacLC/anti-HLADR. Los clones productores se cribaron mediante ELISA. El genoma de los virus recombinantes se controló mediante transferencia southern, utilizando ADNc codificantes de la región constante γ1 y la región constante κ humanas, respectivamente, como sondas. Se utilizaron dos de los clones seleccionados (clon C683 para anti-CD5/anti-HLADR(CR3) y clon C977 para anti-CD5/anti-HLADR(mut4) para la producción de anticuerpos.

20 2.4 Producción y purificación de los anticuerpos recombinantes

25 Se sembraron células Sf9 a una densidad de 600,000 células/ml en 400 ml de medio libre de suero en botellas giratorias y se infectaron con el clon C683 o el clon C977 a una multiplicidad de infección de 2 UFP por célula. Tras 4 días de incubación a 28°C, se recolectó el sobrenadante y los anticuerpos recombinantes secretados se purificaron en proteína A-sefarosa (GE Healthcare). Se determinó la concentración de anticuerpos biespecíficos purificados mediante la utilización del ensayo BCA, tal como recomendaba el fabricante Pierce, y con IgG bovina (ref. de estándar: Pierce 23209) a modo de estándar.

30 La estructura de los anticuerpos biespecíficos finales se muestra en la figura 1.

35 Leyenda de la figura 1: mAb 1: Fab anti-HLA-D; mAb 2: Fab mutante anti-CD5; conector: conector polipeptídico; bisagra: bisagra de IgG1 humana; Fc: región Fc de IgG1 humana. Debido a la presencia de 2 residuos de cisteína de la bisagra de IgG1, los dos brazos de unión a antígeno se conectaron mediante dos puentes disulfuro entre cadenas.

40 El peso molecular de los anticuerpos anti-CD5/anti-HLADR mutantes purificados se evaluó en Superose 6. Más de 90% de las moléculas purificadas en proteína A-sefarosa presentaba un peso molecular estimado de aproximadamente 299 kDa en Superose 6, estando correlacionado de esta manera con el peso molecular teórico de 260 kDa (PM calculado sin glicanos) para el anticuerpo biespecífico recombinante de la figura 1.

45 Estos anticuerpos se analizaron adicionalmente mediante SDS-PAGE bajo condiciones reductoras o no reductoras. Los resultados se muestran en la figura 2.

Leyenda de la figura 2: (A) muestras analizadas bajo condiciones reductoras; (B) muestras analizadas bajo condiciones no reductoras; BS: anticuerpo biespecífico; mAb: IgG1 de control recombinante anti-HLADR.

50 El tamaño de la cadena pesada de los anticuerpos biespecíficos estimado en dicho gel corresponde al peso molecular calculado de 78 000 Da de la cadena pesada fusionada del anticuerpo de la figura 1.

Estos análisis indican que la metodología descrita en la presente memoria conduce a la formación de una molécula que resulta de la asociación de dos cadenas pesadas fusionadas con dos parejas de cadenas ligeras.

55 **Ejemplo 3: propiedades funcionales de anti-CD5/anti-HLADR (CR3)**

Funcionalidad de los sitios de unión

60 Resulta importante mostrar que los anticuerpos biespecíficos eran capaces de unirse mediante 2 sitios de unión a anticuerpo diferentes. Con este objetivo, en el contexto de la presente invención se sometió a ensayo la unión a células que expresaban CD5 o HLADR mediante citometría de flujo. Brevemente, todos los anticuerpos a estudio se acoplaron con ficoeritrina (PE) utilizando el kit de marcaje de IgG humana (o de ratón) R-ficoeritrina Zenon. A continuación, se incubaron estirpes celulares con anticuerpos biespecíficos anti-CD5, anti-HLADR, CR3 marcados con PE o anticuerpos IgG1 irrelevantes de ratón o humanos de control, se lavaron y después se analizaron mediante citometría de flujo.

Los resultados de la unión a la estirpe celular Jurkat CD5⁺/HLADR⁻ y a la estirpe celular JOK1 CD5⁺/HLA-DR⁺ se muestran en las figuras 3 y 4, respectivamente.

Leyenda de la figura 3: la estirpe celular Jurkat (CD5⁺/HLADR⁻) se tiñó con anti-CD5 de ratón marcado con PE (anti-CD5m), anti-HLADR de ratón (anti-HLADRm), anticuerpo quimérico biespecífico anti-CD5/anti-HLADR CR3 o anticuerpo IgG1 humano o de ratón de control (IgG1_h e IgG1_m, respectivamente), todos marcados con PE. A continuación, las células se analizaron mediante citometría de flujo estándar. Se muestran los histogramas superpuestos de cada anticuerpo, con los valores de intensidad media de fluorescencia (IMF) indicados entre paréntesis para cada anticuerpo. 1. mIgG-PE 1 µg (IMF=2.6); 2. anti-CD5m-PE 1 µg (IMF=17); 3. anti-HLADRm-PE 1 µg (IMF=2,5); 4. IgG1_h-PE 1 µg (IMF=3.9); 5. anti-CD5/anti-HLADR/chi-PE CR3 1 µg (IMF=103).

Leyenda de la figura 4: la estirpe celular JOK1 (CD5⁺/HLADR⁺) se tiñó con anti-CD5 de ratón marcado con PE (anti-CD5m), anti-HLADR de ratón (anti-HLADRm), anticuerpo quimérico biespecífico anti-CD5/anti-HLADR CR3 o anticuerpos IgG1 humanos o de ratón de control (IgG1_m y IgG1_h, respectivamente), todos marcados con PE. A continuación, las células se analizaron mediante citometría de flujo estándar. Se muestran los histogramas superpuestos de cada anticuerpo, con los valores de intensidad media de fluorescencia (IMF) indicados entre paréntesis para cada anticuerpo. 1. IgG1_m-PE 1 µg (IMF=25); 2. (Sombreado) anti-CD5m-PE 1 µg (IMF=18); 3. anti-HLADRm-PE 1 µg (IMF=432); 4. IgG1_h-PE 1 µg (IMF=3); 5. anti-CD5/anti-HLADR/chi-PE CR3 1 µg (IMF=3521).

La figura 3 muestra que tanto anti-CD5 de ratón como CR3 biespecífico son capaces de unirse a la estirpe celular Jurkat CD5⁺, mientras que el anticuerpo anti-HLADR no, tal como se esperaba. De esta manera, el anticuerpo biespecífico de CR3 reconoce el antígeno CD5 en la estirpe celular positiva para CD5.

La figura 4 muestra que los anticuerpos anti-HLADR de ratón y anticuerpos biespecíficos de CR3 se unen con elevada intensidad a la estirpe celular JOK CD5⁺/HLADR⁺, mientras que el anticuerpo anti-CD5 de ratón no, tal como se esperaba. Lo anterior demuestra que el anticuerpo de CR3 biespecífico reconoce el antígeno HLADR en una estirpe celular HLADR⁺.

En el contexto de la presente invención se concluye que el anticuerpo biespecífico de CR3 reconoce ambas especificidades (CD5 y HLADR) correctamente.

Unión a antígenos expresados sobre una misma célula

A continuación, en el contexto de la presente invención se deseaba documentar adicionalmente que el anticuerpo biespecífico de CR3 que habían mostrado que era capaz de unirse a sus 2 dianas al expresarse sobre la misma superficie celular, se encontraba en cis. Con este fin, en el contexto de la presente invención se identificó por primera vez una muestra de paciente de LLC-B que expresaba aproximadamente la misma cantidad de CD5 que de HLADR. Se incubaron células de pacientes de LLC-B con anti-CD5 de ratón, anti-HLADR de ratón o anticuerpo de IgG1 de ratón de control durante 30 minutos a temperatura ambiente y después con anticuerpo secundario anti-IgG de ratón marcado con FITC. Tras el lavado, las células se analizaron mediante citometría de flujo estándar. Tal como se muestra en la figura 5A, las células expresaban cantidades similares de CD5 y HLADR, con intensidades medias de fluorescencia de 65 y 98, respectivamente.

Con el fin de demostrar que el anticuerpo biespecífico anti-CD5/anti-HLADR CR3 se une a ambos antígenos en las mismas células, en el contexto de la presente invención se llevó a cabo a continuación un experimento de bloqueo cruzado en la misma muestra de LLC-B. Las células se incubaron con 1 µg/ml de anticuerpo quimérico biespecífico de CR3, en presencia o en ausencia de exceso (10 µg/ml) de anticuerpos anti-CD5 de ratón o anti-HLADR de ratón, o ambos. Tras el lavado, se detectó la unión de anticuerpo biespecífico de CR3 mediante incubación con un anticuerpo monoclonal secundario marcado con FITC (Sigma-Aldrich), específico para Fc humana e incapaz de unirse a Fc de ratón (datos no representados).

Leyenda de la figura 5:

Panel A: las células de pacientes de LLC-B se incubaron con anti-CD5 de ratón (mCD5), anti-HLADR de ratón (mDR) o anticuerpo IgG irrelevante de ratón (mIgG) como control. Tras el lavado, las células se tiñeron con anticuerpo secundario antiratón marcado con FITC y después se analizaron mediante citometría de flujo estándar. Las IMF para mCD5 y mDR se indican entre paréntesis.

Panel B: las células del mismo paciente que en A se incubaron con 1 µg/ml de CR3 quimérico solo (línea gruesa oscura) o en presencia de 10 µg/ml de anti-CD5 de ratón (línea gris clara) o anti-HLADR de ratón (línea gris oscuro) o ambas (línea discontinua). Tras el lavado, las células se incubaron con anticuerpo monoclonal anti-Fc humana marcado con FITC, se lavaron y se analizaron mediante citometría de flujo. Los histogramas superpuestos para cada condición se muestran con el IMF obtenido en cada caso, indicado en la parte superior de cada curva. BS: biespecífico; m: ratón; h: humano; chi: quimérico.

	Control negativo (anti-IgG humana-FITC)	IMF 6
	BI_ch-CR3 1 µg/ml	97
	BI_ch-CR3 1 µg/ml + mCD5 10 µg/ml	72
	BI_ch-CR3 1 µg/ml + mDR 10 µg/ml	54
	BI_ch-CR3 1 µg/ml + mCD5 + mDR 10 µg/ml	20

Tal como se muestra en la figura 5B, el anticuerpo biespecífico de CR3 solo resultó en una intensidad media de fluorescencia (IMF) de 97. La competición con anti-CD5 o anti-HLADR únicamente desplazó solo parcialmente CR3 (IMF 72 y 54, respectivamente). En contraste, la adición de ambos anticuerpos juntos desplazó el anticuerpo biespecífico de CR3 prácticamente por completo (IMF: 20). Estos datos sugieren que el anticuerpo biespecífico de CR3 se une a las células mediante la fracción CD5 o HLADR y su desplazamiento requiere la competición con una mezcla de anticuerpos anti-CD5 y anti-HLADR.

En el contexto de la presente invención se concluye a partir de estos datos que el anticuerpo biespecífico de CR3, el anticuerpo quimérico anti-CD5/anti-HLADR puede unirse tanto a HLADR como a CD5 en la misma célula.

Ejemplo 4: funcionalidad de la fracción Fc y de la fracción de unión a antígeno de los anticuerpos biespecíficos

Fracción Fc

La fracción Fc de las moléculas de anticuerpo son capaces de activar diversas funciones inmunitarias, tales como la fagocitosis (ADP) y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) mediante la unión a FcγR sobre los macrófagos (FcγRI, II y III) y células NK (FcγRIII), respectivamente. Debido a que los anticuerpos biespecíficos construidos presentan una fracción Fc derivada de IgG1 humana, en el contexto de la presente invención se sometió a ensayo si era funcional y, por lo tanto, capaz de mediar en dichas funciones mediadas inmunitariamente.

Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) por células asesinas naturales

En primer lugar, en el contexto de la presente invención se determinó si la parte Fc de la molécula biespecífica de CR3 era activa al unirse cualquier de sus paratopos a su molécula respectiva. En el contexto de la presente invención se analizó la ADCC, mediada por la unión de Fc a las células NK, indujo en una diana CD5⁺/HLA-DR⁻, tal como células Jurkat y sobre dianas HLA-DR⁺/CD5⁻, tal como células JOK1 y dianas doble positivas JOK1.5.3. Las células NK se purificaron a partir de células mononucleares de sangre periférica mediante selección con perlas inmunológicas. Las células diana se marcaron con succinimidil-éster de diacetato de carboxifluoresceína (CFSE) 1 µM a 4°C durante 20 minutos, se lavaron y se cultivaron con células NK purificadas a 37°C durante 4 horas en una proporción de efector a diana (E:D) de 10:1. A continuación, las células se marcaron con 7AAD y se analizaron mediante citometría de flujo. Se midió el porcentaje de eliminación como porcentaje de dianas positivas para 7AAD (CFSE⁺) con respecto al total de células CFSE⁺.

Se muestran los resultados en la figura 6.

Leyenda de la figura 6: JURKAT (CD5⁺HLADR⁻, panel A), JOK1 (CD5⁺HLADR⁺, panel B) y JOK1 5.3 (CD5⁺HLADR⁺, panel C) se marcaron con CFSE y se utilizaron en ensayos de ADCC en presencia de células NK humanas en una proporción E:D de 10:1 y 1 µg/ml de anti-CD5 quimérico (anti-CD5_chi) o anti-HLADR quimérico (anti-HLADR_chi) o 2 µg/ml de anticuerpo biespecífico de CR3. Se midió la citotoxicidad mediante citometría de flujo tras 4 horas a 37°C.

Los datos muestran que el anticuerpo biespecífico de CR3 media en la ADCC en la totalidad de las 3 estirpes celulares (33-78% de citotoxicidad). En contraste, anti-CD5_chi y anti-HLADR_chi son citotóxicos únicamente para estirpes celulares CD5⁺ o HLADR⁺, respectivamente.

En el contexto de la presente invención se concluye que la fracción Fc del anticuerpo biespecífico de CR3 es funcional, permitiendo que el anticuerpo medie en la ADCC de dianas que expresan CD5, HLADR o ambos antígenos.

Fagocitosis

Con el fin de confirmar la funcionalidad de la parte Fc de la molécula de CR3 con respecto a la unión a FcγR presente sobre los macrófagos (FcγRI, FcγRII y FcγRIII), y la unión simultánea de sus paratopos a sus moléculas

respectivas, en el contexto de la presente invención se evaluó la ADP *in vitro*. Se purificaron los monocitos CD14⁺ a partir de células mononucleares de donantes sanos mediante separación celular magnética con microperlas anti-CD14, siguiendo las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotec). Se cultivaron en portaobjetos con cámara e 8 pocillos (LabTek, Nunc) a razón de 2×10^5 /pocillo durante 6 a 7 días en medio RPMI 1640 complementado con suero de feto bovino al 20% y 20 ng/ml de rM-CSF humano (R&D Systems). A continuación, se llevó a cabo la fagocitosis de células diana LLC-B (CD5⁺/HLA-DR⁺) por dichos macrófagos. Se añadió un total de 2×10^5 dianas LLC-B en cada pocillo en presencia o en ausencia de 0.01 a 0.1 µg/ml de anticuerpo biespecífico de CR3 o mAb anti-CD20 rituximab. Tras 2 h a 37°C, los portaobjetos se enjuagaron suavemente en PBS, se fijaron y se tiñeron con May-Gruenwald Giemsa. Se evaluó la fagocitosis mediante recuento bajo el microscopio de por lo menos 200 células en cada condición experimental, utilizando el software de procesamiento y análisis de imágenes ImageJ 1.38 y calculando el porcentaje de macrófagos que engullen por lo menos una célula tumoral diana con respecto a los macrófagos totales.

Los resultados se muestran en la figura 7.

Leyenda de la figura 7: el porcentaje de fagocitosis se muestra en el eje Y y las concentraciones de anticuerpos utilizadas se muestran en el eje X, comprendidas entre 0.01 y 1 µg/ml de anticuerpo biespecífico de CR3 o anticuerpo mono-específico anti-CD20 rituximab (RTX). 0: sin adición de anticuerpo.

Los datos posteriormente muestran que el anticuerpo biespecífico de CR3 media en aproximadamente 40% de fagocitosis sobre el nivel de fondo de 0.1-1 µg/ml, de manera similar al rituximab. El anticuerpo de control negativo trastuzumab (anti-HER2) no media en la fagocitosis (datos no representados).

De esta manera, en el contexto de la presente invención se concluye que la fracción Fc de la molécula de anticuerpo biespecífico de CR3 es funcional y puede mediar en la fagocitosis de células diana por macrófagos mediante interacción de Fc con FcγR sobre dichas células.

Fracción de unión a antígeno

Eliminación redirigida por células asesinas inducidas por citocinas por anticuerpo biespecífico de CR3

A continuación, en el contexto de la presente invención se determina si los paratopos de anticuerpo biespecífico de CR3 pueden unirse a sus antígenos diana presentes sobre 2 tipos celulares diferentes.

Las células asesinas inducidas por citocinas (CIK) son linfocitos doble positivos CD3⁺CD56⁺ generados *in vitro* mediante estimulación de células mononucleares de sangre periférica con interferón gamma, anti-CD3 y expansión *in vitro* durante 3 a 4 semanas con interleucina-2 (SCHMIDT WOLFF et al. J. Exp. Med. 174:139-149; 1991). Las células CIK poseen una actividad citotóxica natural significativa contra células tumorales, aunque no células normales *in vitro*, de manera similar a las células NK. Sin embargo, las células CIK no expresan FcγR y, por lo tanto, no median en la ADCC en presencia de anticuerpo IgG mono-específicos tales como el rituximab. Las células CIK expresan CD5. Por este motivo, las células CIK pueden redirigirse contra células tumorales que son positivas para HLADR aunque no contra las negativas, ya que el anticuerpo biespecífico de CR3 reconoce CD5 sobre CIK y HLA-DR sobre la diana tumoral. De manera diferente de la ADCC, dicha eliminación redirigida utiliza las dos especificidades de Fab del anticuerpo y no la parte Fc.

Método

Se cultivaron células mononucleares de sangre periférica a razón de 3×10^6 /ml en medio X-VIVO 15 libre de suero (BioWhittaker, Walkersville, MD, EE.UU.) con 1000 U/ml de IFN-γ (Gammakine; Boehringer Ingelheim, Vienna, Austria) añadidos el día 0. Se añadieron cincuenta ng/ml anti-CD3 (OKT-3, Janssen-Cilag S.p.a., Italia) el día 1 y 500 U/ml de rIL-2 incluidos en el medio desde el día 1 en adelante. Se llevó a cabo la expansión durante 21 a 28 días, ajustando las células a 1×10^6 /ml en medio fresco que contiene rIL-2 cada 3 a 4 días y. Al final de la expansión, las células CIK citotóxicas CD3⁺/CD5⁺/CD56⁺ eran 40% a 70% de la población. El resto de las células eran mayoritariamente células precursoras CIK CD3⁺/CD56⁻.

Las estirpes celulares tumorales diana humanas BJAB (CD5⁻/HLA-DR⁺), JOK1.5.3 (CD5⁺/HLA-DR⁺), Jurkat (CD5⁺/HLA-DR⁻) y KCL22 (CD5⁻/HLA-DR⁻) se mantuvieron en medio RPMI-1640 (Lonza, Basel, Suiza) complementado con suero de feto bovino al 10% (Euroclone, Wetherby, West Yorkshire, Reino Unido), L-glutamina 2 mM (Euroclone) y gentamicina 110 µM (PHT Pharma, Milano, Italia).

Para los ensayos de citotoxicidad redirigida, las estirpes celulares diana se marcaron durante 30 minutos a 37°C con calceína-AM 3.5 µM (Fluka, Sigma-Aldrich Company, Ayrshire, Reino Unido). Tras el lavado, las células diana marcadas se distribuyeron en placas de 96 pocillos a razón de 5×10^3 /pocillo. Se añadieron células CIK en proporciones de efectoras a diana de 10:1 en presencia o en ausencia de 1 µg/ml de anticuerpo biespecífico de CR3. Tras 4 horas, las células sedimentaron mediante centrifugaron, se recogieron 100 µl de sobrenadante y se determinó la liberación de calceína utilizando un lector de microplacas de fluorescencia (GENios, TECAN, Austria

GmbH, Salzburg, Austria) con excitación a 485 nm y emisión a 535 nm. Se calculó el porcentaje (%) de lisis específica como: $(\text{Liberación de calceína de ensayo} - \text{liberación espontánea de calceína}) \times 100 / (\text{liberación máxima de calceína} - \text{liberación espontánea de calceína})$ Se consiguió la lisis máxima mediante la adición de Triton X-100 al 1%.

5

Se muestran los resultados en la figura 8.

Leyenda de la figura 8: Se incubaron las estirpes celulares diana cargadas con calceína-AM, BJAB, JOK1.5.3, Jurkat y KCL22 en presencia (columnas blancas) o en ausencia (columnas negras) de 1 µg/ml de anticuerpo biespecífico de CR3 y en presencia de células CIK en una proporción de efectoras:diana de 10:1. Tras 4 horas, se recogieron los sobrenadantes y se midió la calceína liberada. Los datos mostraron el porcentaje medido de lisis (eje Y) como medias y desviaciones estándares de 2 a 6 experimentos separados con cada estirpe celular. CTRL: Control sin anticuerpo.

10

Los resultados muestran que el porcentaje de eliminación (lisis) *in vitro* de dianas positivas para HLADR (BJAB, JOK1.5.3) pero no negativas para HLADR (Jurkat, KCL22) se encuentra incrementado en 50-60% mediante la adición de 1 µg/ml de anticuerpo de CR3 en presencia de células CIK en una proporción de efectoras:diana de 10:1. Lo anterior demuestra que el puente intercelular formado por el anticuerpo biespecífico de CR3 potencia drásticamente la eliminación de las dianas HLADR⁺ por células CIK. No se observó potenciación de la eliminación de las dianas negativas para HLADR, demostrando especificidad.

20

La especificidad de la potenciación del anticuerpo biespecífico de CR3 del efecto citotóxico de células CIK con respecto a las células T normales se demostró adicionalmente de la manera siguiente: Se incubaron células diana BJAB HLADR⁺ con diferentes cantidades de células mononucleares de sangre periférica como células efectoras a proporciones de efectoras:diana comprendidas entre 1:1 y 10:1 en presencia o en ausencia de 1 µg/ml de CR3. Se midió la lisis a las 4 horas.

25

Se muestran los resultados en la figura 9.

Leyenda de la figura 9: Se llevaron a cabo experimentos de citotoxicidad con PBMC como efectoras y BJAB como células diana en diferentes proporciones efectoras:diana, en presencia (círculos negros) y en ausencia (círculos blancos) de anticuerpo biespecífico de CR3. Eje X: proporción de efectoras:diana; eje Y porcentaje de lisis; CR3: anticuerpo biespecífico de CR3; CTRL: control sin anticuerpos.

30

No se observó efecto del anticuerpo de CR3 sobre la lisis de las dianas HLADR⁺ por células T normales.

35

Estos resultados muestran que el anticuerpo biespecífico divalente de CR3 puede utilizarse junto con células asesinas inducidas por citocinas (CIK) en el tratamiento de inmunoterapia adoptiva. En este caso, se utilizan las diferentes especificidades de las 2 parejas de Fab: una pareja (en este caso, anti-HLADR) que reconoce la célula diana y la otra (anti-CD5), las células CIK efectoras. Estos resultados indican que podrían insertarse diferentes antígenos diana, tales como HER1, HER2, EpCAM, CD19, CD20 u otros, en lugar de HLADR. Los resultados indican que podrían utilizarse otros antígenos expresados por células efectoras en lugar de CD5, tales como CD3 expresado por linfocitos T, FcγRIII o NKG2D presente sobre células NK o FcγRI-III sobre macrófagos en el marco de diferentes formas de terapia del cáncer.

40

45

Eliminación redirigida por células asesinas inducidas por citocinas por anticuerpo biespecífico MUT4

En el contexto de la presente invención se determina si el anticuerpo biespecífico de MUT4 puede unirse a sus antígenos diana presentes en 2 tipos celulares diferentes y redirigir la eliminación de las células asesinas inducidas por citocinas CD5⁺ (CIK) a la diana de linfoma HLADR⁺ (JOK1.5.3). CIK son linfocitos T dobles positivos CD3⁺CD56⁺ activados que se generaron *in vitro* mediante estimulación de células mononucleares de sangre periférica con interferón gamma, anti-CD3 y expansión *in vitro* durante 3 a 4 semanas con interleucina-2 (SCHMIDT WOLFF et al. J. Exp. Med. 174:139-149; 1991). Las células CIK poseen una actividad citotóxica natural significativa contra células tumorales, aunque no células normales *in vitro*, de manera similar a las células NK. Sin embargo, las células CIK no expresan FcγR y, por lo tanto, no median en la ADCC en presencia de anticuerpo IgG mono-específicos tales como el rituximab. Las células CIK expresan CD5. Por este motivo, las células CIK pueden redirigirse a células tumorales positivas para HLADR pero no a las negativas para HLADR, ya que el anticuerpo biespecífico de MUT4 reconoce CD5 sobre las CIK y HLADR sobre la diana tumoral. De manera diferente de la ADCC, dicha eliminación redirigida utiliza las dos especificidades de Fab del anticuerpo y no la parte Fc.

50

55

60

Método

Las células mononucleares de sangre periférica se cultivaron a 3×10^6 /ml en medio X-VIVO 15 libre de suero (BioWhittaker, Walkersville, MD, EE.UU.) con 1000 U/ml de IFN-γ (Gammakine; Boehringer Ingelheim, Vienna, Austria) añadidos el día 0. Se añadieron 50 ng/ml de anti-CD3 (OKT-3, Janssen-Cilag S.p.a., Italia) el día 1 y 500 U/ml de rIL-2 incluido en el medio a partir del día 1 en adelante. Se llevó a cabo la expansión durante 21 a 28

65

días, ajustando las células a 1×10^6 /ml en medio fresco que contiene rHL-2 cada 3 a 4 días y. Al final de la expansión, las células CIK citotóxicas $CD3^+/CD5^+/CD56^+$ eran aproximadamente 50% de la población. El resto de las células eran mayoritariamente células precursoras CIK $CD3^+/CD56^-$.

5 La estirpe celular diana tumoral humana JOK1.5.3 ($CD5^+/HLADR^+$) se mantuvo en medio RPMI-1640 (Lonza, Basel, Suiza) complementado con suero de feto bovino al 10% (Euroclone, Wetherby, West Yorkshire, Reino Unido), L-glutamina 2 mM (Euroclone) y gentamicina 110 μ M (PHT Pharma, Milano, Italia).

10 Para los ensayos de citotoxicidad redirigida, se marcaron estirpes celulares diana durante 30 minutos a 37°C con calceína-AM 3.5 μ M (Fluka, Sigma-Aldrich Company, Ayrshire, Reino Unido). Tras el lavado, las células diana marcadas se distribuyeron en placas de 96 pocillos a razón de 5×10^3 /pocillo. Se añadieron las células CIK en una proporción de efectoras a diana de 10:1 en presencia o en ausencia de 1 o 5 μ g/ml de anticuerpo biespecífico de MUT4, anticuerpo de CR3 o rituximab (RTX) como controles. Tras 4 horas, las células sedimentaron mediante centrifugaron, se recogieron 100 μ l de sobrenadante y se determinó la liberación de calceína utilizando un lector de microplacas de fluorescencia (GENios, TECAN, Austria GmbH, Salzburg, Austria) con excitación a 485 nm y emisión a 535 nm. Se calculó el porcentaje (%) de lisis específica como: $(\text{Liberación de calceína de ensayo} - \text{liberación espontánea de calceína}) \times 100 / (\text{liberación máxima de calceína} - \text{liberación espontánea de calceína})$ Se consiguió la lisis máxima mediante la adición de Triton X-100 al 1%.

20 Los resultados se muestran en la figura 10.

25 Leyenda de la figura 10: las células diana cargadas de calceína-AM JOK1.5.3 se incubaron en presencia o en ausencia de 1 o 5 μ g/ml de anticuerpos biespecíficos de MUT4, de CR3 o rituximab (RTX) y en presencia de células CIK en una proporción de efectoras:diana de 10:1. Tras 4 horas, se recogieron los sobrenadantes y se midió la calceína liberada. Los datos muestran el porcentaje medido de lisis (eje Y) como medias y desviaciones estándares de 2 experimentos independientes. -: control sin anticuerpo.

30 Los resultados muestran que el porcentaje de eliminación (lisis) *in vitro* de JOK15.3 positivas para HLADR se encontraba incrementado en 60% a 70% mediante la adición de 1 a 5 μ g/ml de anticuerpo de MUT4 y en 40% a 50% mediante la adición de anticuerpo de CR3, en presencia de células CIK en una proporción de efectoras:diana de 10:1. El rituximab, en contraste, no presenta ningún efecto significativo. Lo anterior demuestra que el puente intercelular formado por el anticuerpo biespecífico de MUT4 potencia drásticamente la eliminación de las dianas $HLADR^+$ por células CIK, de manera similar o más elevada a la obtenida con CR3.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
 KADOUCHE, Jean
 5 MACH, Jean-Pierre
 MICHELIN, Olivier
 ZOETE, Vincent
 IWASZKIEWICZ, Justyna
 10 CERUTTI, Martine
 CHOBLET, Sylvie
 GOLAY, Josée

<120> ANTICUERPOS MULTIESPECÍFICOS

15 <130> MJP11-F644-319PCT

<150> EP 11 305 872.1
 <151> 2011-07-07

20 <160> 14

<170> PatentIn versión 3.5

25 <210> 1
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 1
 Val Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro
 1 5 10 15

30 Ser Pro Ser

<210> 2
 <211> 6
 <212> PRT
 35 <213> Homo sapiens

<400> 2
 Val Pro Pro Pro Pro Pro
 1 5

40 <210> 3
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

45 <400> 3
 Glu Ser Pro Lys Ala Gln Ala Ser Ser Val Pro Thr Ala Gln Pro Gln
 1 5 10 15

Ala Glu Gly Ser Leu Ala Lys Ala Thr Thr Ala Pro Ala Thr Thr Arg
 20 25 30

Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Lys Glu Lys Glu Lys Glu
 35 40 45

Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro
 50 55

50 <210> 4
 <211> 15

ES 2 816 701 T3

<212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 5 1 5 10 15

<210> 5
 <211> 15
 <212> PRT
 10 <213> Homo sapiens

<400> 5
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10 15

15 <210> 6
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20 <400> 6
 Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro Arg Cys
 1 5 10 15

Pro

<210> 7
 <211> 15
 <212> PRT
 25 <213> Homo sapiens

<400> 7
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
 30 1 5 10 15

<210> 8
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

35 <400> 8
 Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro
 1 5 10

40 <210> 9
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 45 <223> Conector polipeptídico

<400> 9
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser
 20 25 30

Gly Gly

50 <210> 10
 <211> 9

ES 2 816 701 T3

<212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10
 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 5 1 5

<210> 11
 <211> 8
 <212> PRT
 10 <213> Homo sapiens

<400> 11
 Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser
 1 5

15 <210> 12
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Conector polipeptídico

<400> 12
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu Pro Ser Thr Pro Pro Ser Pro Ser Thr Pro Gly Gly
 20 25 30

25 <210> 13
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30 <400> 13
 Ala Pro Glu Leu Leu
 1 5

35 <210> 14
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> Fragmento de conector

<400> 14
 Pro Ser Thr Pro Pro Ser Pro Ser Thr Pro
 1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Fragmento de unión a antígenos multiespecífico que comprende por lo menos los dos fragmentos Fab diferentes siguientes:

- un fragmento Fab de tipo salvaje que consiste en dominios CH1 y CL de tipo salvaje de una inmunoglobulina y los dominios VH y VL de un anticuerpo que reconoce un epítipo de interés; y
- un fragmento Fab mutado que consiste en:
 - los dominios VH y VL de un anticuerpo que reconoce un epítipo de interés;
 - un dominio CH1 del isotipo IgG que se deriva del dominio CH1 de una inmunoglobulina humana mediante la sustitución del residuo de treonina en la posición 192 de dicho dominio CH1 con un residuo de ácido glutámico, en el que los números de posición de secuencia se refieren a numeración de Kabat; y
 - un dominio CL del tipo kappa que se deriva del dominio CL de una inmunoglobulina humana mediante la sustitución del residuo de asparagina en la posición 137 de dicho dominio CL con un residuo de lisina y la sustitución del residuo de serina en la posición 114 de dicho dominio CL con un residuo de alanina, en el que los números de posición de secuencia se refieren a la numeración de Kabat;

en el que cada fragmento Fab reconoce un epítipo de interés diferente y dichos fragmentos Fab están dispuestos en tándem en cualquier orden, estando conectado el extremo C-terminal del dominio CH1 de un primer fragmento Fab al extremo N-terminal del dominio VH del fragmento Fab siguiente mediante un conector polipeptídico.

2. Fragmento de unión a antígenos multiespecífico según la reivindicación 1, en el que el conector polipeptídico presenta una longitud de por lo menos 20 aminoácidos.

3. Fragmento de unión a antígenos multiespecífico según la reivindicación 1, en el que el conector polipeptídico comprende la totalidad o parte de la secuencia de la región bisagra de una o más inmunoglobulinas seleccionadas de entre IgA, IgG e IgD.

4. Fragmento de unión a antígenos multiespecífico según la reivindicación 1, en el que el conector polipeptídico presenta la secuencia siguiente:

EPKSCDKTHTCPPAPPELLGGPSTPPTSPSPGG

5. Anticuerpo multiespecífico que presenta dos brazos de unión a antígenos idénticos, consistiendo cada uno en un fragmento de unión a antígenos multiespecífico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

6. Anticuerpo multiespecífico según la reivindicación 5, que presenta una estructura de tipo inmunoglobulina, que comprende:

- dos brazos de unión a antígenos idénticos, consistiendo cada uno en un fragmento de unión a antígenos multiespecífico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4,
- los dominios CH2 y CH3 dimerizados de una inmunoglobulina;
- la región bisagra de una IgA, IgG o IgD, que conecta los extremos C-terminales de los dominios CH1 de los brazos de unión a antígenos a los extremos N-terminales de los dominios CH2.

7. Célula hospedadora transformada con:

- un polinucleótido que codifica una cadena pesada de un fragmento de unión a antígenos multiespecífico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o de un anticuerpo multiespecífico según la reivindicación 5 o 6, comprendiendo dicha cadena pesada una primera región VH/CH1 y una segunda región VH/CH1; y
- por lo menos dos polinucleótidos que codifican dos cadenas ligeras diferentes:
 - una primera cadena ligera que se empareja específicamente con una primera región VH/CH1 de dicha cadena pesada;
 - una segunda cadena ligera que se empareja específicamente con una segunda región VH/CH1 de dicha cadena pesada y

siendo por lo menos una de dichas cadenas ligeras una cadena ligera de un fragmento Fab mutado como se

define en la reivindicación 1.

5 8. Célula hospedadora según la reivindicación 7, que se transforma adicionalmente con un tercer polinucleótido que codifica una tercera cadena ligera que es diferente de las primera y segunda cadenas ligeras y que se empareja específicamente con una tercera región VH/CH1 de dicha cadena pesada.

10 9. Método para preparar un fragmento de unión a antígenos multiespecífico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o anticuerpo multiespecífico según la reivindicación 5 o 6, en el que dicho método comprende cultivar una célula hospedadora según la reivindicación 7 u 8 y recuperar dicho fragmento de unión a antígenos o anticuerpo a partir de dicho cultivo.

10. Fragmento de unión a antígenos multiespecífico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o anticuerpo multiespecífico según la reivindicación 5 o 6, para la utilización como un medicamento.

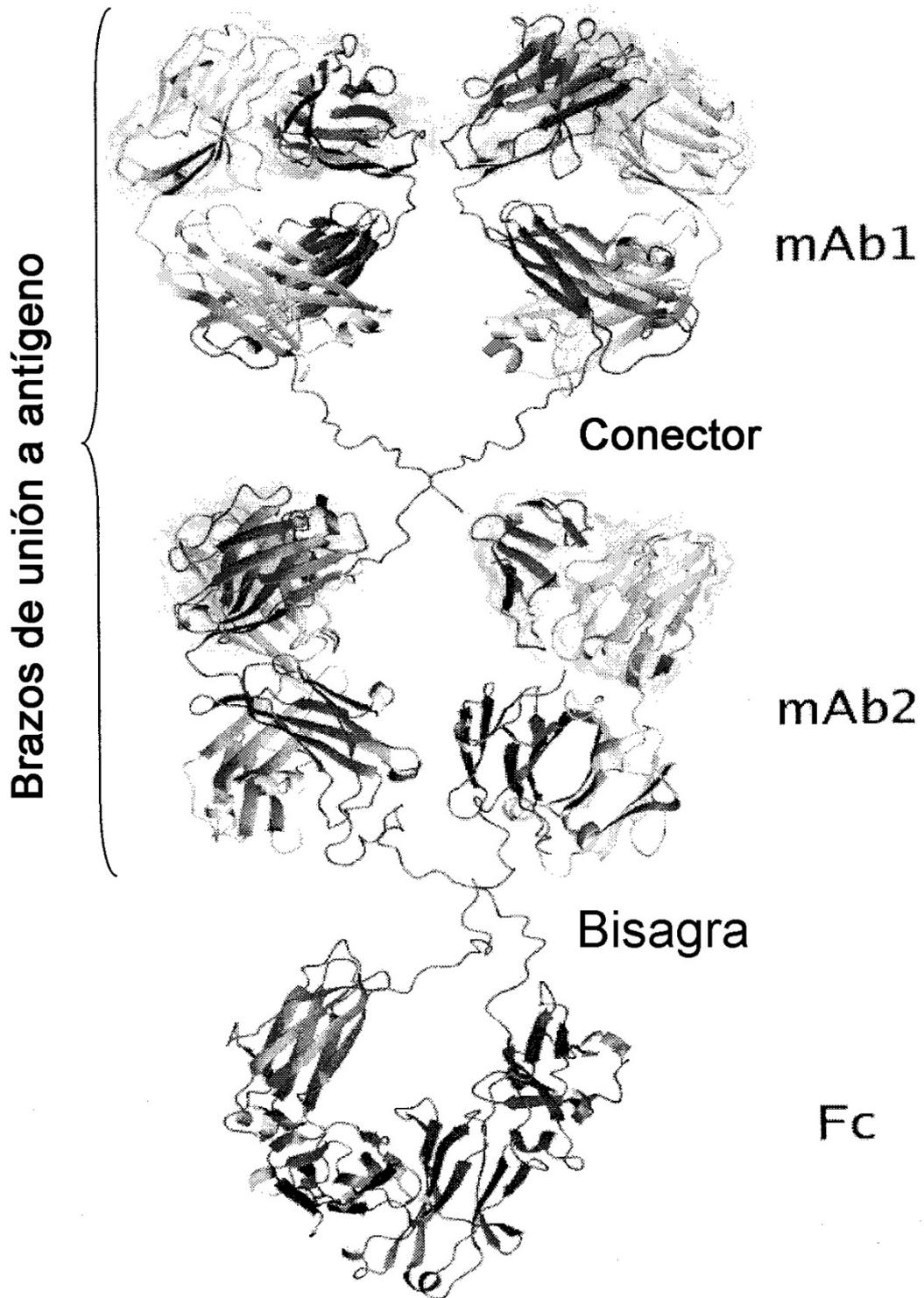


Figura 1

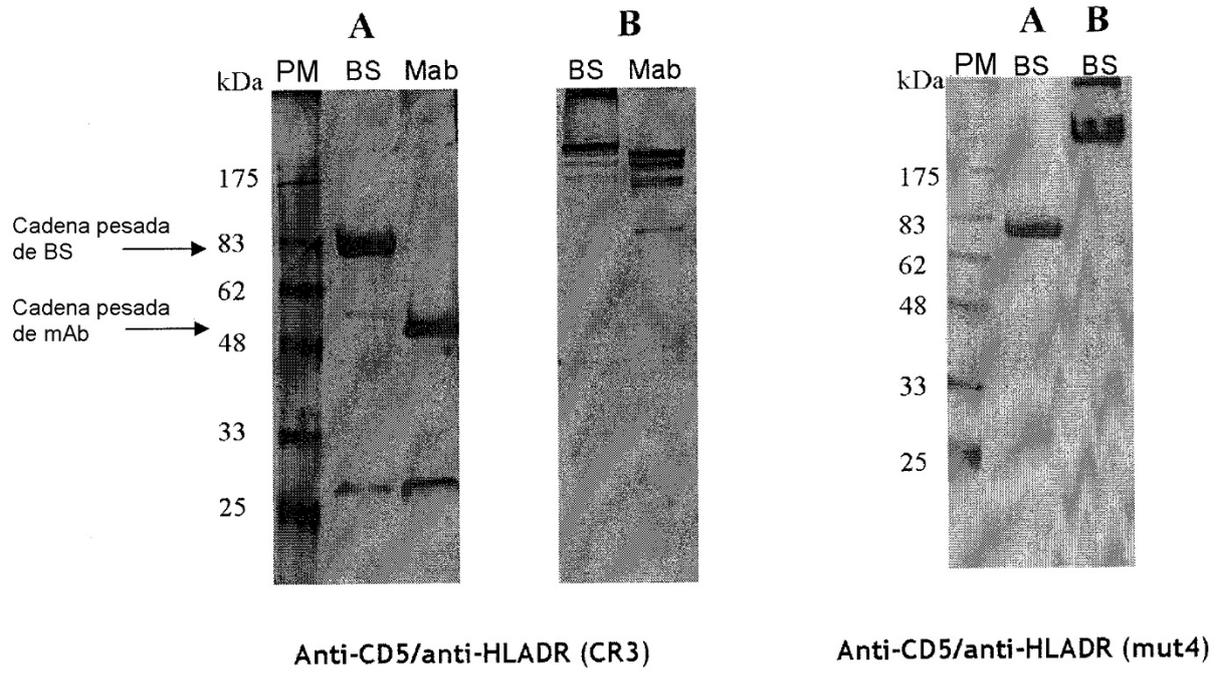


Figura 2

Jurkat (CD5+/HLADR-)

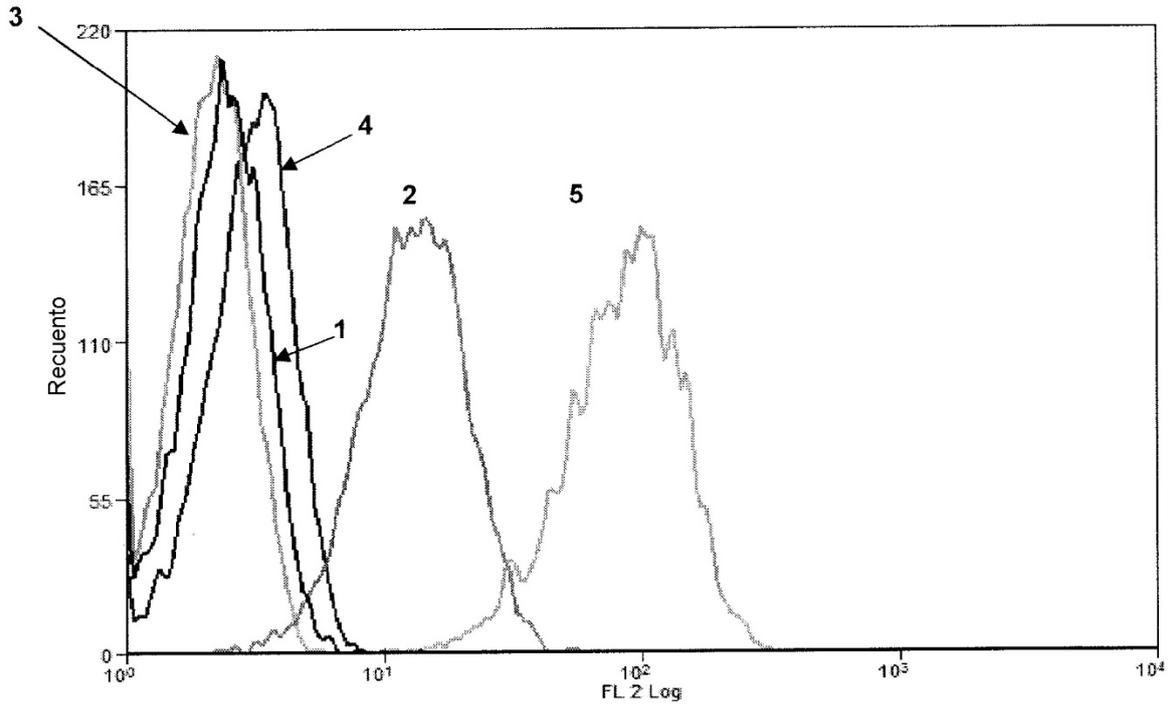


Figura 3

JOK wt (CD5-/HLADR+)

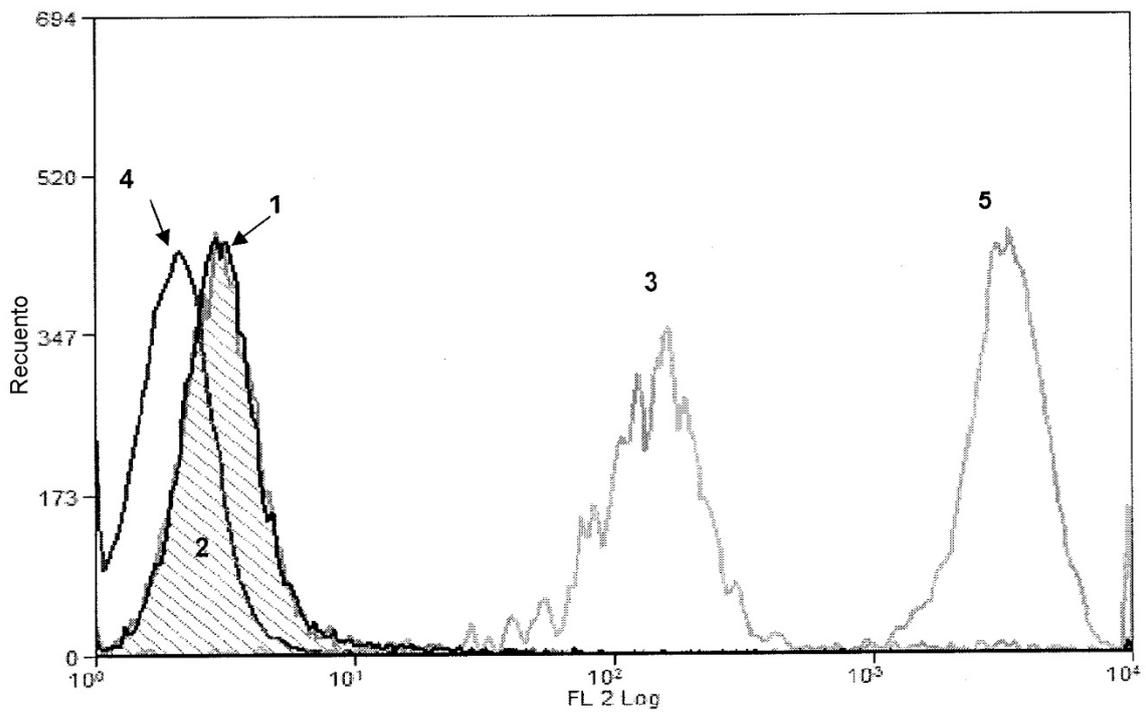


Figura 4

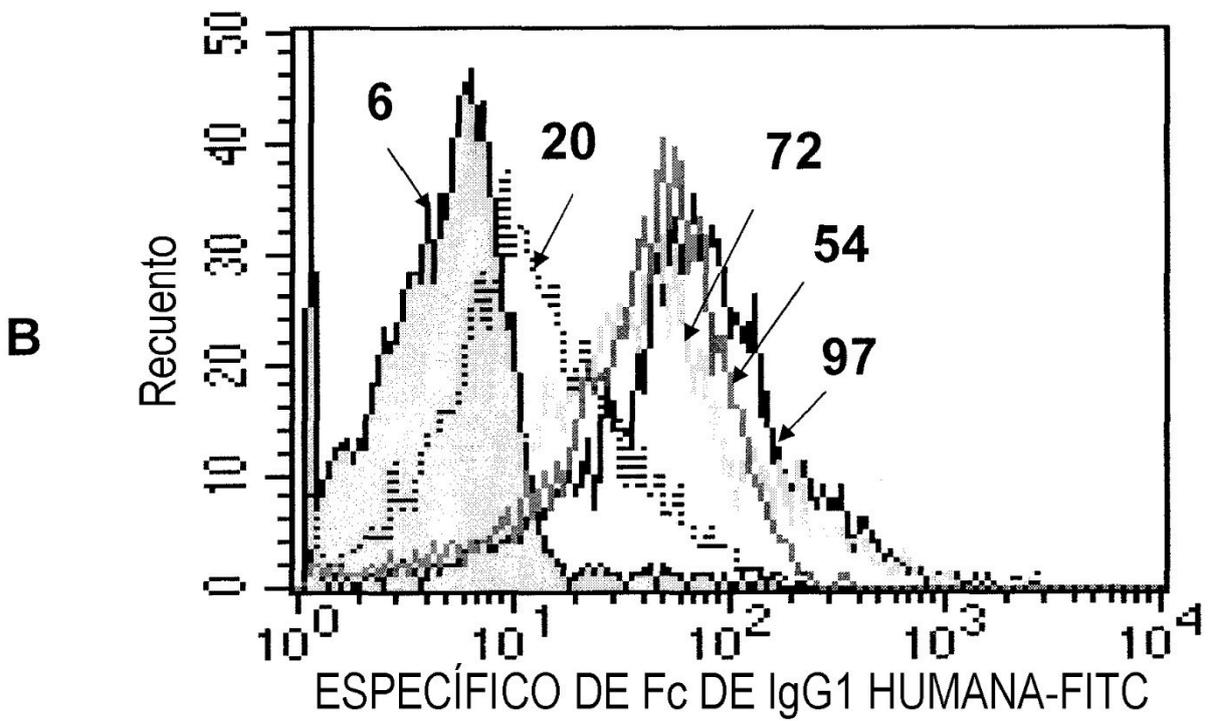
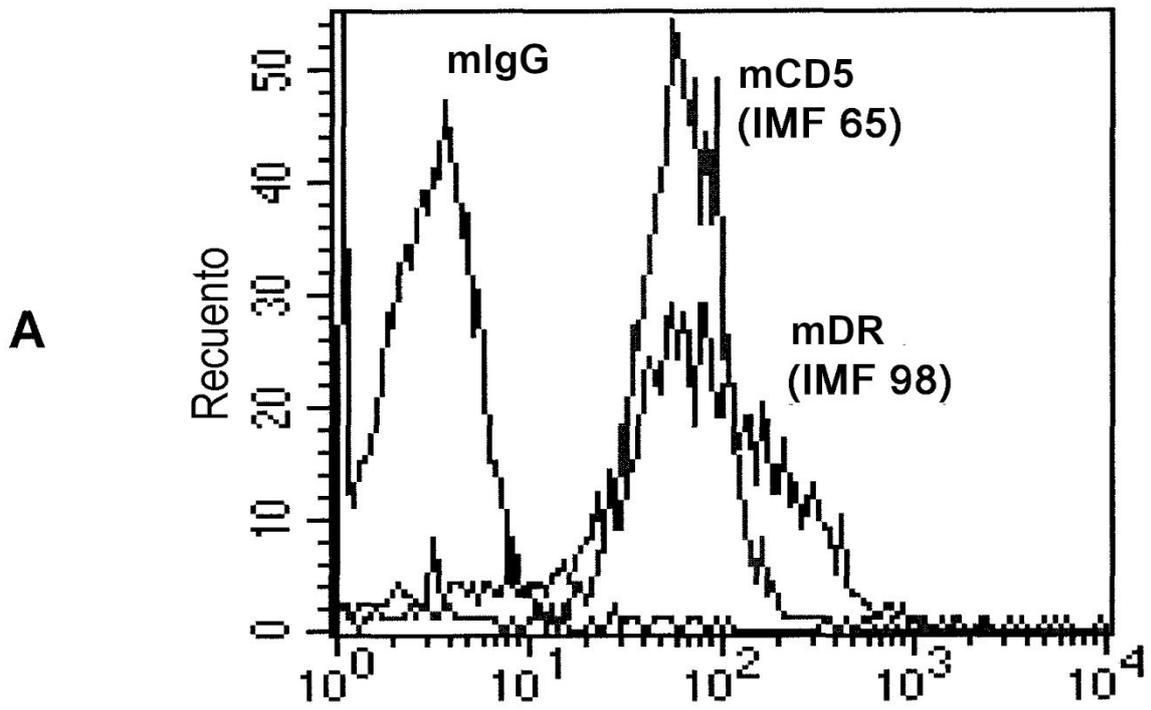


Figura 5

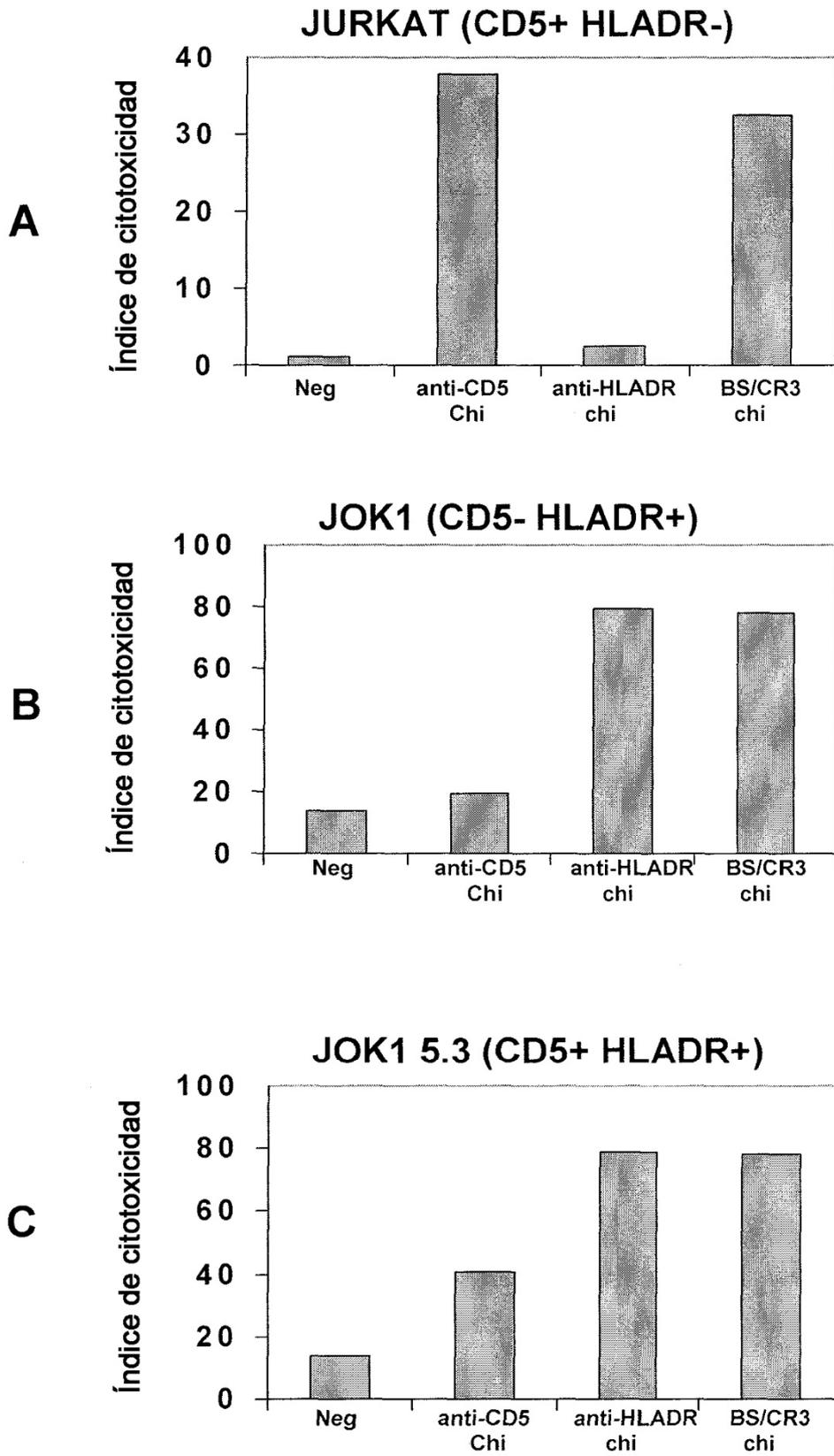


Figura 6

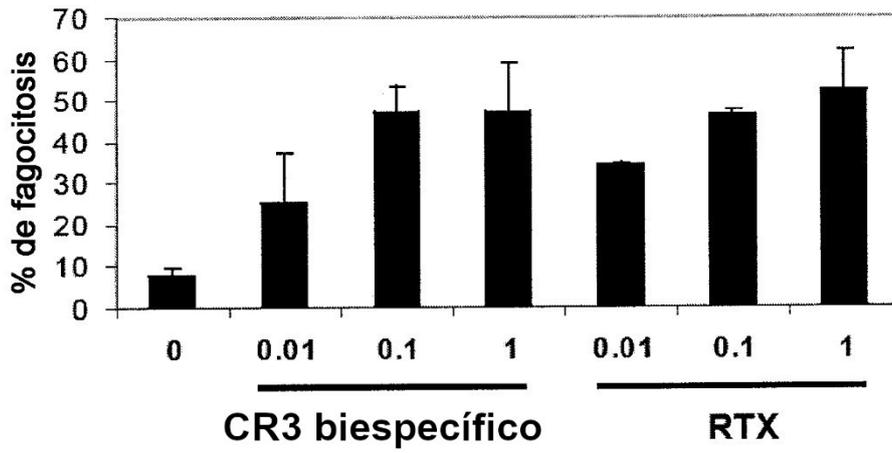


Figura 7

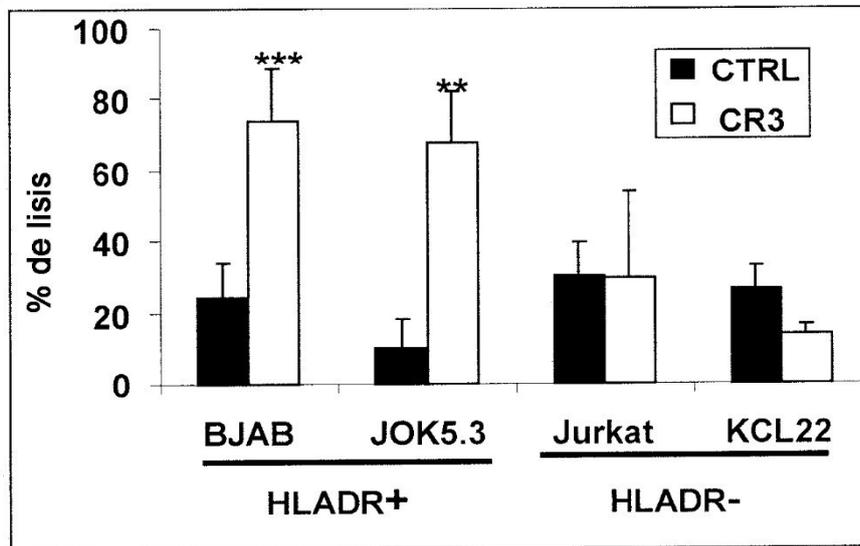


Figura 8

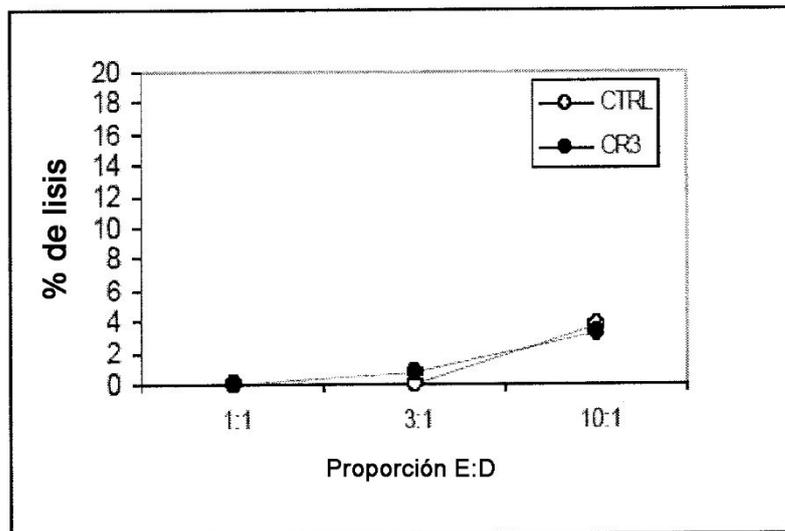


Figura 9

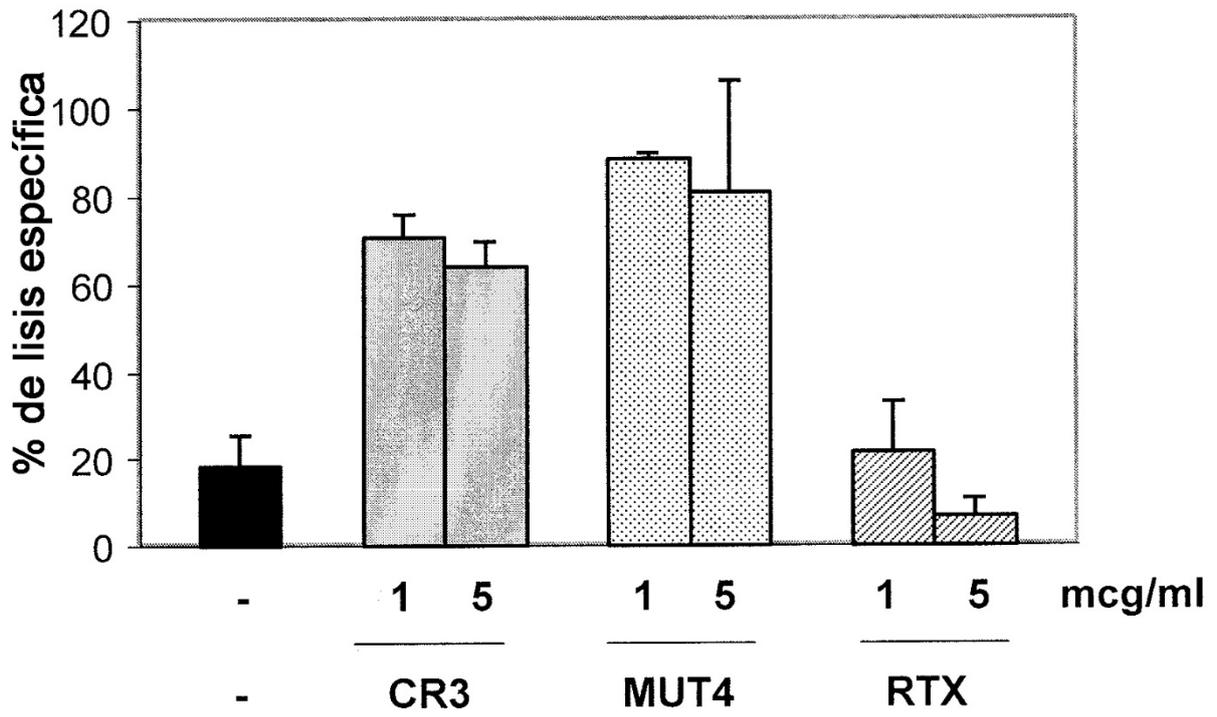


Figura 10