

"ANTICUERPOS HETERODIMÉRICOS QUE SE UNEN A CD3 Y A ANTÍGENOS TUMORALES"

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica la prioridad según los artículos 35
5 U.S.C. §119(e) y §120 de la Solicitud de Patente Provisional de
Estados Unidos n.º 62/159.111, presentada el 8 de mayo de 2015, la
Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos n.º 62/251.005,
presentada el 4 de noviembre de 2015 y la Solicitud de Patente
Provisional de Estados Unidos n.º 62/250.971, presentada el 4 de
10 noviembre de 2015, el documento U.S.S.N. 14/952.714, presentado
el 11 de noviembre de 2015 y el documento PCT/US2015/062772,
presentado el 25 de noviembre de 2015, todos ellos incorporados
expresamente en el presente documento por referencia en su
totalidad, con referencia particular a las figuras, leyendas y
15 reivindicaciones del presente documento.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Se han usado satisfactoriamente agentes terapéuticos basados
en anticuerpos para tratar una diversidad de enfermedades,
incluyendo cánceres y trastornos autoinmunitarios/inflamatorios. Sin
20 embargo aún se necesitan mejoras en esta clase de fármacos,
particularmente con respecto al aumento de su eficacia clínica. Una
vía que se está explorando es la obtención por ingeniería genética
de sitios de unión a antígeno adicionales y nuevos en fármacos
basados en anticuerpos de tal forma que una sola molécula de
25 inmunoglobulina se acople al mismo tiempo con dos antígenos

diferentes. Dichos formatos de anticuerpo no nativos o alternos que se acoplan con dos antígenos diferentes con frecuencia se denominan biespecíficos. Debido a la diversidad considerable de la región variable del anticuerpo (Fv) se hace posible producir un Fv
5 que reconozca prácticamente cualquier molécula, el enfoque típico para la generación biespecífica es la introducción de nuevas regiones variables en el anticuerpo.

Se han explorado varios formatos de anticuerpo alternos para la dirección biespecífica (Chames y Baty, 2009, mAbs 1[6]:1-9;
10 Holliger y Hudson, 2005, Nature Biotechnology 23[9]:1126-1136; Kontermann, mAbs 4(2):182 (2012), y todos ellos se incorporan expresamente en el presente documento por referencia). Inicialmente, se prepararon anticuerpos biespecíficos fusionando dos líneas celulares que producían, cada una, un solo anticuerpo monoclonal
15 (Milstein et al., 1983, Nature 305:537-540). Aunque el hibridoma o cuadroma híbrido resultante producía anticuerpos biespecíficos, solo eran una población minoritaria y se necesitaba una purificación extensiva para aislar el anticuerpo deseado. Una solución de ingeniería genética para esto fue el uso de fragmentos de anticuerpo
20 para preparar biespecíficos. Como dichos fragmentos carecen de la estructura cuaternaria compleja de un anticuerpo de longitud completa, las cadenas ligera y pesada variables pueden unirse en construcciones genéticas individuales. Se han generado fragmentos de anticuerpo de muchas formas diferentes, incluyendo diacuerpos,
25 diacuerpos monocatenarios, scFv en tándem y Fab₂ biespecíficos

(Chames y Baty, 2009, mAbs 1[6]:1-9; Holliger y Hudson, 2005, Nature Biotechnology 23[9]:1126-1136; incorporado expresamente en el presente documento por referencia). Aunque estos formatos pueden expresarse a altos niveles en bacterias y pueden tener efectos beneficiosos de penetración favorables debido a su pequeño tamaño, se eliminan rápidamente *in vivo* y pueden presentar obstáculos de fabricación relacionados con su producción y estabilidad. Una causa principal de estos inconvenientes es que los fragmentos de anticuerpo típicamente carecen de la región constante del anticuerpo con sus propiedades funcionales asociadas, incluyendo un mayor tamaño, alta estabilidad y unión a diversos receptores Fc y ligandos que mantienen una larga semivida en suero (es decir, el receptor Fc neonatal FcRn) o servir como sitios de unión para la purificación (es decir proteína A y proteína G).

Un trabajo más reciente ha intentado solucionar los inconvenientes de los biespecíficos basados en fragmentos mediante la creación por ingeniería genética de una unión doble en formatos de tipo anticuerpo de longitud completa (Wu et al., 2007, Nature Biotechnology 25[11]:1290-1297; USSN12/477.711; Michaelson et al., 2009, mAbs 1[2]:128-141; PCT/US2008/074693; Zuo et al., 2000, Protein Engineering 13[5]:361-367; USSN09/865.198; Shen et al., 2006, J Biol Chem 281[16]:10706-10714; Lu et al., 2005, J Biol Chem 280[20]:19665-19672; PCT/US2005/025472; incorporado expresamente en el presente documento por referencia). Estos formatos solucionan algunos de los obstáculos de los biespecíficos

de fragmentos de anticuerpo, principalmente porque contienen una región Fc. Un inconveniente significativo de estos formatos es que, como construyen nuevos sitios de unión a antígeno en la parte superior de las cadenas constantes homodiméricas, la unión al nuevo antígeno siempre es bivalente.

Para muchos antígenos que son atractivos como codianas en un formato biespecífico terapéutico, la unión deseada es monovalente más bien que bivalente. Para muchos receptores inmunitarios, la activación celular se realiza por entrecruzamiento de una interacción de unión monovalente. El mecanismo de entrecruzamiento típicamente está mediado por complejos inmunitarios de anticuerpo/antígeno, o a través del acoplamiento de una célula efectora a una célula diana. Por ejemplo, los receptores Fc gamma de baja afinidad (FcγR) tales como FcγRIIa, FcγRIIb y FcγRIIIa se unen de forma monovalente a la región Fc del anticuerpo. La unión monovalente no activa a las células que expresan estos FcγR; sin embargo, tras la formación de complejos inmunitarios o el contacto entre una célula y otra, los receptores se entrecruzan y agrupan en la superficie celular, llevando a la activación. En el caso de receptores responsables de mediar la destrucción celular, por ejemplo, FcγRIIIa en células citolíticas naturales (NK), el entrecruzamiento de receptores y la activación celular se produce cuando la célula efectora se acopla a la célula diana en un formato de alta avidez (Bowles y Weiner, 2005, J Immunol Methods 304: 88-99, incorporado expresamente por referencia).. De forma similar, en

las células B, el receptor inhibidor FcγRIIb regula negativamente la activación de células B solo cuando se acopla en un complejo inmunitario con el receptor de células B de la superficie celular (BCR), un mecanismo que está mediado por la formación de complejos inmunitarios de IgG solubles con el mismo antígeno que se reconoce por el BCR (Heyman 2003, Immunol Lett 88[2]: 157-161; Smith y Clatworthy, 2010, Nature Reviews Immunology 10: 328-343; incorporado expresamente por referencia). Como otro ejemplo, se produce activación por CD3 de células T solo cuando su receptor de células T asociado (TCR) se acopla al MHC cargado con antígeno sobre células presentadoras de antígeno en una sinapsis célula a célula de alta avidéz (Kuhns et al., 2006, Immunity 24: 133-139). De hecho, el entrecruzamiento bivalente no específico de CD3 usando un anticuerpo anti-CD3 induce una tormenta de citocinas y toxicidad (Perruche et al., 2009, J Immunol 183[2]: 953-61; Chatenoud y Bluestone, 2007, Nature Reviews Immunology 7: 622-632; incorporado expresamente por referencia). De esta manera, para el uso clínico práctico, el modo preferido de co-acoplamiento de CD3 para la destrucción redirigida de células diana es una unión monovalente que da como resultado la activación solo después del acoplamiento con la diana co-acoplada.

CD38, también conocido como ADP cíclico ribosa hidrolasa, es una glicoproteína transmembrana de tipo II con un largo dominio extracelular C terminal y un corto dominio citoplásmico N terminal. Entre las células hematopoyéticas, una colección de efectos

funcionales se han atribuido a la señalización mediada por CD38, incluyendo proliferación de linfocitos, liberación de citocinas, regulación del desarrollo y supervivencia de células B y células mieloides, e inducción de la maduración de células dendríticas. CD38 carece de regulación en muchas malignidades hematopoyéticas y en líneas celulares derivadas de diversas malignidades hematopoyéticas incluyendo el linfoma no Hodgkin (NHL), linfoma de Burkitt (BL), mieloma múltiple (MM), leucemia linfocítica crónica B (B-CLL), leucemia linfocítica aguda B y T (ALL), linfoma de células T (TCL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia de células pilosas (HCL), Linfoma de Hodgkin (HL) y leucemia mieloide crónica (CML). Por otra parte, la mayoría de las células madre pluripotentes primitivas del sistema hematopoyético son CD38-. A pesar del reciente progreso en el descubrimiento y desarrollo de agentes anticancerosos, muchas formas de cáncer que implican tumores que expresan CD38 siguen teniendo un mal pronóstico. De esta manera, existe la necesidad de métodos mejorados para tratar dichas formas de cáncer.

El antígeno CD19 de células B (CD19, también conocido como antígeno de superficie de células B B4, Leu-12) es un marcador de superficie de todas las células B humanas que se expresa desde las primeras etapas del desarrollo de células pre-B hasta la diferenciación terminal en células plasmáticas. CD19 promueve la proliferación y supervivencia de células B maduras. Se asocia en un complejo con CD21 en la superficie celular. También se asocia con

CD81 y Leu-13 y potencia la señalización del receptor de células B (BCR). Junto con BCR, CD19 modula umbrales de señalización intrínsecos e inducidos por receptores de antígenos críticos para la expansión clonal de células B e inmunidad humoral. En colaboración con CD21, asocia el sistema inmunitario adaptativo y el innato. Tras la activación, la cola citoplásmica de CD19 se fosforila, lo cual conduce a la unión por quinasas de la familia Src y el reclutamiento de la PI-3 quinasa. Es una diana de inmunoterapia atractiva para cánceres de origen linfóide ya que también se expresa en la inmensa mayoría de células NHL así como en algunas leucemias.

Se han evaluado varios anticuerpos o conjugados de anticuerpo que se dirigen a CD19 en estudios preclínicos o en ensayos clínicos para el tratamiento de cánceres. Estos anticuerpos o conjugados de anticuerpo anti-CD19 incluyen, pero sin limitación, MT-103 (un anticuerpo CD19/CD3 biespecífico monocatenario; Hoffman et al, 2005 Int J Cancer 115: 98-104; Schlereth et al, 2006 Cancer Immunol Immunother 55: 503-514), un diacuerpo CD19/CD16 (Schlenzka et al, 2004 Anti-cancer Drugs 15: 915-919; Kipriyanov et al, 2002 J Immunol 169: 137-144), BU12-saporina (Flavell et al, 1995 Br J Cancer 72: 1373-1379), y anti-CD19-idarrubicina (Rowland et al, 1993 Cancer Immunol Immunother 55: 503-514); todos incorporados expresamente por referencia.

CD123, también conocido como receptor alfa de interleucina 3 (IL-3R α), se expresa en células dendríticas, monocitos, eosinófilos y basófilos. CD123 también se expresa de forma constitutiva por

células madre/progenitoras hematopoyéticas comprometidas, por la mayoría de las células de linaje mieloide (CD13+, CD14+, CD33+, CD15low), y por algunas células CD19+. Está ausente de las células CD3+.

5 De esta manera, aunque los biespecíficos generados a partir de fragmentos de anticuerpo sufren obstáculos biofísicos y farmacocinéticos, un inconveniente de los construidos con formatos de tipo anticuerpo de longitud completa es que se acoplan a antígenos co-diana de forma multivalente en ausencia del antígeno
10 diana primario, llevando a una activación no específica y posiblemente a toxicidad. La presente invención resuelve este problema mediante la introducción de nuevos anticuerpos biespecíficos dirigidos a CD3 y CD38.

BREVE SUMARIO DE LA INVENCION

15 Por consiguiente, en un aspecto, la presente invención proporciona anticuerpos heterodiméricos que comprenden: a) un primer monómero que comprende: i) una primera cadena pesada que comprende: 1) un primer dominio pesado variable; 2) una primera cadena pesada constante que comprende un primer dominio Fc; 3)
20 un scFv que comprende un dominio ligero variable de scFv, un enlazador de scFv y un dominio pesado variable de scFv; donde dicho scFv está unido covalentemente al extremo C de dicho dominio de Fc usando un enlazador de dominios; b) un segundo monómero que comprende una segunda cadena pesada que comprende un
25 segundo dominio pesado variable y una segunda cadena pesada

constante que comprende un segundo dominio de Fc; y c) una cadena ligera común que comprende un dominio ligero variable y un dominio ligero constante.

En un aspecto adicional, la invención proporciona anticuerpos heterodiméricos que comprenden: a) un primer monómero que comprende: i) una primera cadena pesada que comprende: 1) un primer dominio pesado variable; 2) un primer dominio pesado constante que comprende un primer dominio Fc; y 3) un primer dominio ligero variable, en donde dicho primer dominio ligero variable está unido covalentemente al extremo C de dicho primer dominio Fc usando un enlazador de dominios; b) un segundo monómero que comprende: i) un segundo dominio pesado variable; ii) un segundo dominio pesado constante que comprende un segundo dominio Fc; y iii) un tercer dominio pesado variable, en donde dicho segundo dominio pesado variable está unido covalentemente al extremo C de dicho segundo dominio Fc usando un enlazador de dominios; c) una cadena ligera común que comprende un dominio ligero variable y un dominio ligero constante.

En un aspecto adicional, la invención proporciona anticuerpos heterodiméricos que comprenden: a) un primer monómero que comprende: i) una primera cadena pesada que comprende: 1) un primer dominio pesado variable; 2) una primera cadena pesada constante que comprende un primer dominio CH1 y un primer dominio Fc; 3) un scFv que comprende un dominio ligero variable de scFv, un enlazador de scFv y un dominio pesado variable de scFv;

donde dicho scFv está unido covalentemente entre el extremo C de dicho dominio CH1 y el extremo N de dicho primer dominio Fc usando enlazadores de dominios; b) un segundo monómero que comprende una segunda cadena pesada que comprende un segundo dominio pesado variable y una segunda cadena pesada constante
5 que comprende un segundo dominio Fc; y c) una cadena ligera común que comprende un dominio ligero variable y un dominio ligero constante.

En un aspecto adicional, la invención proporciona anticuerpos heterodiméricos que comprenden: a) un primer monómero que
10 comprende: i) una primera cadena pesada que comprende: 1) un primer dominio pesado variable; 2) un primer dominio pesado constante que comprende un primer dominio Fc; y 3) un primer dominio ligero variable, en donde dicho segundo dominio ligero
15 variable está unido covalentemente entre el extremo C del dominio CH1 de dicho primer dominio pesado constante y el extremo N de dicho primer dominio Fc usando enlazadores de dominios; b) un segundo monómero que comprende: i) un segundo dominio pesado variable; ii) un segundo dominio pesado constante que comprende un
20 segundo dominio Fc; y iii) un tercer dominio pesado variable, en donde dicho segundo dominio pesado variable está unido covalentemente al extremo C de dicho segundo dominio Fc usando un enlazador de dominios; c) una cadena ligera común que comprende un dominio ligero variable y un dominio ligero constante.

En un aspecto adicional, la invención proporciona anticuerpos heterodiméricos que comprenden: a) un primer monómero que comprende: i) una primera cadena pesada que comprende: 1) un primer dominio pesado variable; 2) una primera cadena pesada constante que comprende un primer dominio CH1 y un primer dominio Fc; 3) un scFv que comprende un dominio ligero variable de scFv, un enlazador de scFv y un dominio pesado variable de scFv; en donde dicho scFv está unido covalentemente entre el extremo C de dicho dominio CH1 y el extremo N de dicho primer dominio Fc usando enlazadores de dominios; b) un segundo monómero que comprende un segundo dominio Fc; y c) una cadena ligera que comprende un dominio ligero variable y un dominio ligero constante.

En algunos aspectos, el primer y el segundo dominios de Fc tienen un conjunto de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en S364K/E357Q : L368D/K370S; L368D/K370S: S364K; L368E/K370S: S364K; T411T/E360E/Q362E: D401K; L368D/K370S: S364K/E357L y K370S: S364K/E357Q. Además, el o los dominios pesados variables y el o los dominios ligeros variables se unen a un primer antígeno tumoral diana (TTA), el scFv se une a un segundo TTA o a CD3 humano. En algunas realizaciones, el TTA se selecciona del grupo que consiste en CD19, CD20 y CD123.

En un aspecto adicional, la invención proporciona dominios anti-CD3 de unión a antígeno que tienen CDR y/o los dominios variables y/o las secuencias de scFv representadas en las Figuras

para H1.32_L1.47, H1.89_L1.47, H1.90_L1.47, H1.33_L1.47 y H1.31_L1.47. La invención proporciona además composiciones de ácido nucleico, composiciones de vectores de expresión y células hospedadoras.

5 En un aspecto adicional, la invención proporciona anticuerpos heterodiméricos que comprenden a) un primer monómero que comprende: i) un primer dominio Fc; ii) un scFv anti-CD3 que comprende un dominio ligero variable de scFv, un enlazador de scFv y un dominio pesado variable de scFv; en donde dicho scFv está
10 unido covalentemente al extremo N de dicho dominio Fc usando un enlazador de dominios; b) un segundo monómero que comprende una cadena pesada que comprende: i) un dominio variable pesado; y ii) un dominio constante de cadena pesada que comprende un segundo dominio Fc; y c) una cadena ligera que comprende un dominio ligero
15 variable y un dominio constante ligero variable; en donde el scFv anti-CD3 se selecciona del grupo que consiste en anti-CD3 H1.32_L1.47, anti-CD3 H1.89_L1.47, anti-CD3 H1.90_L1.47 y anti-CD3 H1.33_L1.47 (SEQ ID NO:XX). El dominio variable pesado y el dominio variable ligero se unen a TTA (incluyendo, pero sin
20 limitación a CD19, Cd20, CD38 y CD123).

 En un aspecto adicional, la invención proporciona dominios de unión a anticuerpo anti-CD20 que comprenden: a) un dominio ligero variable que comprende una vICDR1 que tiene la secuencia RASWSVSYIH (SEQ ID NO:XX), una vICDR2 que tiene la secuencia
25 ATSNLAS (SEQ ID NO:XX), y una vICDR3 que tiene la secuencia

QQWTHNPPT (SEQ ID NO:XX); y b) un dominio pesado variable comprende una vhCDR1 que tiene la secuencia SYNMH (SEQ ID NO:XX), una vhCDR2 que tiene la secuencia AIYPGNGATSYSQKFQG (SEQ ID NO:XX) y una vhCDR3 que tiene la
5 secuencia SYYMGGDWYFDV (SEQ ID NO:XX). En algunas realizaciones, los dominios de unión a anticuerpo anti-CD20 tienen las secuencias de C2B8 H1.202_L1.113.

En un aspecto adicional, la invención proporciona dominios de unión a anticuerpo anti-CD20 que comprenden: a) un dominio ligero
10 variable que comprende una vlCDR1 que tiene la secuencia RASSSVSYIH (SEQ ID NO:XX), una vlCDR2 que tiene la secuencia ATSNLAS (SEQ ID NO:XX), y una vlCDR3 que tiene la secuencia QQWTSNPPT (SEQ ID NO:XX); y b) un dominio pesado variable
comprende una vhCDR1 que tiene la secuencia SYNMH (SEQ ID
15 NO:XX), una vhCDR2 que tiene la secuencia AIYPGNGDTSYNQKFQG (SEQ ID NO:XX) y una vhCDR3 que tiene la secuencia STYYGGDWYFNV (SEQ ID NO:XX).

En algunas realizaciones, los dominios de unión al anticuerpo anti-CD20 tienen las secuencias de C2B8_ H1L1.

20 En un aspecto adicional, la invención proporciona anticuerpos heterodiméricos que comprenden a) un primer monómero que comprende: i) un primer dominio de Fc; ii) un scFv anti-CD3 que comprende un dominio ligero variable de scFv, un enlazador de scFv y un dominio pesado variable de scFv; en donde dicho scFv está
25 unido covalentemente al extremo N de dicho dominio de Fc usando

un enlazador de dominios; b) un segundo monómero que comprende una cadena pesada que comprende: i) un dominio variable pesado; y ii) un dominio constante de cadena pesada que comprende un segundo dominio de Fc; y c) una cadena ligera que comprende un dominio ligero variable y un dominio constante ligero variable; en donde las cadenas ligera y pesada variables forman un dominio de unión de C2B8 H1.202_L1.113 o CDB8_H1L1.

En un aspecto adicional, la invención proporciona anticuerpos heterodiméricos que comprenden a) un primer monómero que comprende: i) un primer dominio Fc; ii) un scFv anti-CD3 que comprende un dominio ligero variable de scFv, un enlazador de scFv y un dominio pesado variable de scFv; en donde dicho scFv está unido covalentemente al extremo N de dicho dominio Fc usando un enlazador de dominios; b) un segundo monómero que comprende una cadena pesada que comprende: i) un dominio variable pesado; y ii) un dominio constante de cadena pesada que comprende un segundo dominio Fc; y c) una cadena ligera que comprende un dominio ligero variable y un dominio constante ligero variable. En esta realización, los dominios variables se unen a CD123 y pueden tener las secuencias de 7G3_H1.109_L1.47.

En aspectos adicionales, la presente invención proporciona anticuerpos heterodiméricos seleccionados del grupo que consiste en XENP15049, XENP15051; XENP15050, XENP13676, XENP14696, XENP15629, XENP15053, XENP15630, XENP15631, XENP15632, XENP15633, XENP15634, XENP15635, XENP15636, XENP15638,

XENP15639, XENP13677, XENP14388, XENP14389, XENP14390, XENP14391, XENP14392, XENP14393, XENP16366, XENP16367, XENP16368, XENP16369, XENP16370, XENP16371, XENP16372, XENP16373, XENP16375, XENP16376, XENP16377, XENP14045 e
5 XENP13928. También se proporcionan ácidos nucleicos, vectores de expresión y células hospedadoras, además de métodos para fabricar estas proteínas y tratar a los pacientes con ellas.

En aspectos adicionales, la presente invención proporciona anticuerpos heterodiméricos que comprenden un conjunto de 6 CDR
10 (vhCDR1, vhCDR2, vhCDR3, vlCDR1, vlCDR2 y vlCDR3) de las regiones variables de uno de los dominios de unión a antígeno de un anticuerpo heterodimérico seleccionado del grupo que consiste en XENP15049, XENP15051; XENP15050, XENP13676, XENP14696, XENP15629, XENP15053, XENP15630, XENP15631, XENP15632,
15 XENP15633, XENP15634, XENP15635, XENP15636, XENP15638, XENP15639, XENP13677, XENP14388, XENP14389, XENP14390, XENP14391, XENP14392, XENP14393, XENP16366, XENP16367, XENP16368, XENP16369, XENP16370, XENP16371, XENP16372, XENP16373, XENP16375, XENP16376, XENP16377, XENP14045 y
20 XENP13928. También se proporcionan ácidos nucleicos, vectores de expresión y células hospedadoras, además de métodos para fabricar estas proteínas y tratar a los pacientes con ellas.

En aspectos adicionales, la presente invención proporciona anticuerpos heterodiméricos que comprenden dos conjuntos de CDR,
25 un primer conjunto de cada una de las 6 CDR (vhCDR1, vhCDR2,

vhCDR3, vlCDR1, vlCDR2 y vlCDR3) de las regiones variables de uno de los dominios de unión a antígeno, y un segundo conjunto de las regiones variables de los segundos dominios de unión a antígeno, distintos, de un anticuerpo heterodimérico seleccionado del grupo que consiste en XENP15049, XENP15051; XENP15050, XENP13676, XENP14696, XENP15629, XENP15053, XENP15630, XENP15631, XENP15632, XENP15633, XENP15634, XENP15635, XENP15636, XENP15638, XENP15639, XENP13677, XENP14388, XENP14389, XENP14390, XENP14391, XENP14392, XENP14393, XENP16366, XENP16367, XENP16368, XENP16369, XENP16370, XENP16371, XENP16372, XENP16373, XENP16375, XENP16376, XENP16377, XENP14045 y XENP13928. También se proporcionan ácidos nucleicos, vectores de expresión y células hospedadoras, además de métodos para fabricar estas proteínas y tratar a los pacientes con ellas.

En aspectos adicionales, la presente invención proporciona anticuerpos heterodiméricos que comprenden dos conjuntos de dominios vh y vl, un primer conjunto de las regiones variables de uno de los dominios de unión a antígeno y el segundo conjunto de las regiones variables de los segundos dominios de unión a antígeno, distintos, de un anticuerpo heterodimérico seleccionado del grupo que consiste en XENP15049, XENP15051; XENP15050, XENP13676, XENP14696, XENP15629, XENP15053, XENP15630, XENP15631, XENP15632, XENP15633, XENP15634, XENP15635, XENP15636, XENP15638, XENP15639, XENP13677, XENP14388, XENP14389,

XENP14390, XENP14391, XENP14392, XENP14393, XENP16366, XENP16367, XENP16368, XENP16369, XENP16370, XENP16371, XENP16372, XENP16373, XENP16375, XENP16376, XENP16377, XENP14045 y XENP13928. También se proporcionan ácidos nucleicos, vectores de expresión y células hospedadoras, además de métodos para fabricar estas proteínas y tratar a los pacientes con ellas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las Figuras 1A, 1B y 1C representan varios formatos de la presente invención. Se representan dos formas del “abridor de botellas”, uno con el dominio de unión a antígeno anti-CD3 que comprende un scFv y el dominio de unión a antígeno anti-TTA que comprende un Fab, y otro con estos invertidos. También se muestran los formatos mAb-Fv, mAb-scFv, Central-scFv y Central-Fv. Aunque se representan de tal manera que tienen el anti-CD3 como el scFv, como se analiza en el presente documento, puede cambiarse y combinarse cualquier secuencia de Fv; es decir, puede cambiarse el anti-CD3 y los dominios anti-TTA de los mAb-Fv, mAb-scFv, central-scFv y central-Fv. Además, se muestran formatos “uno-armado”, donde un monómero solo comprende un dominio de Fc, tanto un brazo Central-scFv como un brazo Central-Fv. También se muestra un formato de scFv doble.

La Figura 2 representa las secuencias de las construcciones anti-CD3_H1.30_L1.47 “Alto CD3”, incluyendo los dominios pesado y ligero variables (CDR subrayadas), así como las vl y vhCDR

individuales, así como una construcción de scFv con un enlazador cargado (doblemente subrayado). Como ocurre en todas las secuencias representadas en las Figuras, este enlazador cargado puede reemplazarse por un enlazador no cargado o un enlazador cargado diferente, cuando sea necesario.

La Figura 3 representa las secuencias de la construcción de anti-CD3_H1.32_L1.47 “Alto-Int #1”, incluyendo los dominios ligero y pesado variables (CDR subrayadas), así como las vl y vhCDR individuales, así como una construcción de scFv con un enlazador cargado (doblemente subrayado). Como ocurre en todas las secuencias representadas en las Figuras, este enlazador cargado puede reemplazarse por un enlazador no cargado o un enlazador cargado diferente, cuando sea necesario.

La Figura 4 representa las secuencias de la construcción anti-CD3_H1.89_L1.47 “Alto-Int #2”, incluyendo los dominios ligero y pesado variables (CDR subrayadas), así como las vl y vhCDR individuales, así como una construcción de scFv con un enlazador cargado (doblemente subrayado). Como ocurre en todas las secuencias representadas en las Figuras, este enlazador cargado puede reemplazarse por un enlazador no cargado o un enlazador cargado diferente, cuando sea necesario.

La Figura 5 representa las secuencias de la construcción anti-CD3_H1.90_L1.47 “Alto-Int #3”, incluyendo los dominios ligero y pesado variables (CDR subrayadas), así como las vl y vhCDR individuales, así como una construcción de scFv con un enlazador

cargado (doblemente subrayado). Como ocurre en todas las secuencias representadas en las Figuras, este enlazador cargado puede reemplazarse por un enlazador no cargado o un enlazador cargado diferente, cuando sea necesario.

5 La Figura 6 representa las secuencias de la construcción anti-CD3_H1.90_L1.47 "Int", incluyendo los dominios ligero y pesado variables (CDR subrayadas), así como las vl y vhCDR individuales, así como una construcción de scFv con un enlazador cargado (doblemente subrayado). Como ocurre en todas las secuencias
10 representadas en las Figuras, este enlazador cargado puede reemplazarse por un enlazador no cargado o un enlazador cargado diferente, cuando sea necesario.

 La Figura 7 representa las secuencias de la construcción anti-CD3_H1.31_L1.47 "Bajo", incluyendo los dominios ligero y pesado
15 variables (CDR subrayadas), así como las vl y vhCDR individuales, así como una construcción de scFv con un enlazador cargado (doblemente subrayado). Como ocurre en todas las secuencias representadas en las Figuras, este enlazador cargado puede reemplazarse por un enlazador no cargado o un enlazador cargado
20 diferente, cuando sea necesario.

 La Figura 8 representa las secuencias de la construcción alto CD38: OKT10_H1.77_L1.24, incluyendo los dominios ligero y pesado variables (CDR subrayadas), así como las vl y vhCDR individuales, así como una construcción de scFv con un enlazador cargado
25 (doblemente subrayado).

La Figura 9 representa las secuencias de la construcción de CD38 intermedio: OKT10_H1L1.24, incluyendo los dominios ligero y pesado variables (CDR subrayadas), así como las vl y vhCDR individuales, así como una construcción de scFv con un enlazador cargado (doblemente subrayado).

La Figura 10 representa la secuencia de la construcción Bajo CD38: OKT10_H1L1, incluyendo los dominios pesado y ligero variables (CDR subrayadas), así como las vl y vhCDR individuales, así como una construcción de scFv con un enlazador cargado (doblemente subrayado).

La Figura 11 representa las secuencias de XENP15331.

La Figura 12 representa las secuencias de XENP13243.

La Figura 13 representa las secuencias de XENP14702.

La Figura 14 representa las secuencias de XENP15426.

La Figura 15 representa las secuencias de XENP14701.

La Figura 16 representa las secuencias de XENP14703.

La Figura 17 representa las secuencias de XENP13243.

La Figura 18 representa las secuencias de XENP18967.

La Figura 19 representa las secuencias de XENP18971.

La Figura 20 representa las secuencias de XENP18969.

La Figura 21 representa las secuencias de XENP18970.

La Figura 22 representa las secuencias de XENP18972.

La Figura 23 representa las secuencias de XENP18973.

La Figura 24 representa las secuencias de XENP15055.

La Figura 25 representa las secuencias de XENP13544.

La Figura 26 representa las secuencias de XENP13694.

La Figura 27 representa las secuencias de ϵ de CD3 humana.

La Figura 28 representa la longitud completa (SEQ ID NO:130) y el dominio extracelular (ECD; SEQ ID NO:131) de la proteína CD38 humana.

La Figura 29A-29E representa pares útiles de conjuntos de variantes de heterodimerización (incluyendo las variantes de sesgo y pl). En la figura 29E, hay variantes para las que no hay variantes del "monómero 2" correspondientes; estas son variantes de pl que pueden usarse solas en cualquier monómero, o incluirse en el lado del Fab de un abridor de botella, por ejemplo, y puede usarse un enlazador de scFv cargado apropiado en el segundo monómero que utiliza un scFv como segundo dominio de unión a antígeno. En la Figura 33 se muestran enlazadores cargados adecuados.

La Figura 30 representa una lista de regiones constantes de anticuerpo variante isostérico y sus sustituciones respectivas. pl₍₋₎ indica variantes de pl inferior, mientras que pl₍₊₎ indica variantes de pl superior. Estas pueden combinarse de forma opcional e independiente con otras variantes de heterodimerización de la invención (y también otros tipos de variantes, como se indica en el presente documento).

La Figura 31 representa variantes de ablación útiles que anular la unión a FcγR (denominadas algunas veces "variantes knock out" o "KO").

La Figura 32 muestra dos realizaciones particularmente útiles de la invención.

La Figura 33 representa varios enlazadores de scFv cargados que encuentran utilidad en el aumento o disminución del pl de anticuerpos heterodiméricos que utilizan uno o más scFv como componente. El enlazador positivo (+H) encuentra utilidad particular en la presente invención, especialmente con secuencias de vl y vh de anti-CD3 mostradas en el presente documento. Un enlazador de scFv individual de la técnica anterior con una sola carga se denomina "Whitlow", de Whitlow et al., Protein Engineering 6(8): 989-995 (1993). Debe tenerse en cuenta que este enlazador se usó para reducir la agregación y aumentar la estabilidad proteolítica de los scFv.

La Figura 34 representa una lista de variantes de Fc con sesgo hacia la formación de heterodímeros obtenidas por ingeniería genética con rendimientos de heterodímeros (determinados por HPLC-CIEX) y estabilidades térmicas (determinadas por DSC). La estabilidad térmica no determinada se indica por "n.d."

Figura 35 Rendimientos de expresión de biespecíficos después de purificación por afinidad en proteína A.

Figura 36 Cromatogramas de purificación de intercambio catiónico.

Figura 37 Ensayo de citotoxicidad de células T redirigidas, incubación 24 h, 10.000 células RPMI8226, 400.000 células T. Los

artículos de ensayo son biespecíficos anti-CD38 x anti-CD3. La detección fue por LDH

Figura 38 Ensayo de citotoxicidad de células T redirigidas, 24 h de incubación, 10.000 células RPMI8226, 500.000 PBMC humanas.

5 Los artículos de ensayo son biespecíficos anti-CD38 x anti-CD3. La detección fue por LDH

La Figura 39 representa las secuencias de XENP14419.

La Figura 40 representa las secuencias de XENP14420.

La Figura 41 representa las secuencias de XENP14421.

10 La Figura 42 representa las secuencias de XENP14422.

La Figura 43 representa las secuencias de XENP14423.

Figura 44 Ensayo de citotoxicidad de células T redirigidas, 96 h de incubación, 40.000 células RPMI8226, 400.000 PBMC humanas.

15 Los artículos de ensayo son Fab-scFv-Fc anti-CD38 x anti-CD3. La detección se realizó por citometría de flujo, específicamente a la desaparición de células CD38+.

Figura 45 Análisis adicional de ensayo de citotoxicidad de células T redirigidas descrito en la Figura 1. La primera fila muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (MFI) del marcador de
20 activación CD69 sobre células CD4+ y CD8+ detectadas por citometría de flujo. La segunda fila muestra el porcentaje de células T CD4+ y CD8+ que son Ki-67+, una medida de la proliferación celular. La tercera fila muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (MFI) intracelular del inhibidor de granzyme B PI-9 en células T
25 CD4+ y CD8+ detectado por citometría de flujo.

Figura 46 Diseño de estudio de ratón para examinar la actividad antitumoral de Fab-scFv-Fc biespecíficos anti-CD38 x anti-CD3.

5 Figura 47 Tamaño tumoral medido por IVIS® en función del tiempo y el tratamiento

Figura 48 Imágenes bioluminiscentes IVIS® (Día 10)

Figura 49 Reducción de células CD38⁺ en monos cinomolgos después de dosis únicas de los artículos de ensayo indicados

10 Figura 50 Activación de células T medida por Intensidad Media de Fluorescencia de CD69 (MFI) en monos cinomolgos, la codificación de colores es como en la Figura 49.

Figura 51 Niveles en suero de IL-6, después de dosis únicas de los artículos de ensayo indicados.

15 La Figura 52 representa las secuencias de XENP15427.

La Figura 53 representa las secuencias de XENP15428.

La Figura 54 representa las secuencias de XENP15429.

La Figura 55 representa las secuencias de XENP15430.

La Figura 56 representa las secuencias de XENP15431.

La Figura 57 representa las secuencias de XENP15432.

20 La Figura 58 representa las secuencias de XENP15433.

La Figura 59 representa las secuencias de XENP15434.

La Figura 60 representa las secuencias de XENP15435.

La Figura 61 representa las secuencias de XENP15436.

La Figura 62 representa las secuencias de XENP15437.

25 La Figura 63 representa las secuencias de XENP15438.

La Figura 64 muestra las afinidades de unión en un ensayo Biacore.

La Figura 65 muestra la pureza de Heterodímeros durante la generación de grupos estables usando relaciones variadas de
5 cadena Ligera, Fab-Fc y scFv-Fc.

Figura 66 Reducción de IgG2 e IgM humana por biespecíficos anti-CD38 x anti-CD3 en un modelo de ratón huPBMc.

La Figura 67 representa scFv variantes de anti-CD3 humanizados, con estabilidad optimizada. Se proporcionan
10 sustituciones con respecto a la secuencia de scFv H1_L1.4. La numeración de aminoácidos es la numeración de Kabat.

Figura 68. Secuencias de aminoácidos de scFv variantes de anti-CD3 humanizados, de estabilidad optimizada. Las CDR están subrayadas. Para cada combinación de cadena pesada/cadena ligera,
15 se indican cuatro secuencias: (i) scFv con etiqueta 6xHis C-terminal, (ii) scFv solo, (iii) VH sola, (iv) VL sola.

Figura 69 Ensayo de citotoxicidad de células T redirigidas, 24 h de incubación, 10.000 células RPMI8226, 500.000 PBMc. Los
20 artículos de ensayo son Fab-scFv-Fc anti-CD38 (OKT10_H1L1, OKT10_H1.77_L1.24) x anti-CD3. La detección se realizó por LDH.

Figura 70 estudio de reducción de Ig en huPBL-SCID. Los artículos de ensayo se dosificaron 8 días después del injerto de PBMc a 0.03, 0.3 o 3 mg/kg. La vía de administración fue intraperitoneal. Se tomaron muestras de sangre 14 días después del

injerto de PBMC, se procesaron a suero y se ensayaron con respecto a IgM e IgG2 humana.

La Figura 71 representa las secuencias de XENP15049.

La Figura 72 representa las secuencias de XENP15051.

5 La Figura 73 representa las secuencias de XENP15050.

La Figura 74 representa las secuencias de XENP13676.

La Figura 75 representa las secuencias de XENP14696.

La Figura 76 representa las secuencias de XENP15629.

La Figura 77 representa las secuencias de XENP15053.

10 La Figura 78 representa las secuencias de XENP15630.

La Figura 79 representa las secuencias de XENP15631.

La Figura 80 representa las secuencias de XENP15632.

La Figura 81 representa las secuencias de XENP15633.

La Figura 82 representa las secuencias de XENP15634.

15 La Figura 83 representa las secuencias de XENP15635.

La Figura 84 representa las secuencias de XENP15636.

La Figura 85 representa las secuencias de XENP15638.

La Figura 86 representa las secuencias de XENP15639.

La Figura 87 representa las secuencias de XENP13677.

20 La Figura 88 representa las secuencias de XENP14388.

La Figura 89 representa las secuencias de XENP14389.

La Figura 90 representa las secuencias de XENP14390.

La Figura 91 representa las secuencias de XENP14391.

La Figura 92 representa las secuencias de XENP14392.

25 La Figura 93 representa las secuencias de XENP14393.

La Figura 94 representa las secuencias de XENP16366.

La Figura 95 representa las secuencias de XENP16367.

La Figura 96 representa las secuencias de XENP16368.

La Figura 97 representa las secuencias de XENP16369.

5 La Figura 98 representa las secuencias de XENP16370.

La Figura 99 representa las secuencias de XENP16371.

La Figura 100 representa las secuencias de XENP16372.

La Figura 101 representa las secuencias de XENP16373.

La Figura 102 representa las secuencias de XENP16374.

10 La Figura 103 representa las secuencias de XENP16375.

La Figura 104 representa las secuencias de XENP16376. En la Figura 121 se muestran las secuencias de CDR, vh y vl del brazo de Fab de anti-CD20.

La Figura 105 representa las secuencias de XENP16377.

15 La Figura 106 representa las secuencias de los antígenos CD20 y CD123.

Figura 107 determinación por resonancia de plasmón de superficie de la afinidad por CD3. Los artículos de ensayo son Fab-scFv-Fc anti-CD20 (C2B8_H1.202_L1.113) x anti-CD3. Se unió covalentemente CD3 $\delta\epsilon$ -Fc humano (Sino Biological) a la superficie de la microplaca. Los artículos de ensayo se sometieron a pases a 3.125, 12.5, 50 y 200 nM.

20

Figura 108 determinación por resonancia de plasmón de superficie de la afinidad por CD3. Los artículos de ensayo son Fab-scFv-Fc anti-CD20 (C2B8_H1.202_L1.113) x anti-CD3. Se unió

25

covalentemente CD3 $\delta\epsilon$ -Fc de mono cinomolgus (Sino Biological) a la superficie de la microplaca. Los artículos de ensayo se sometieron a pases a 3.125, 12.5, 50 y 200 nM.

5 Figura 109 determinación por resonancia de plasmón de superficie de la afinidad por CD3. Los artículos de ensayo son Fab-scFv-Fc anti-CD20 (C2B8_H1.202_L1.113) x anti-CD3. Se unió covalentemente CD3 $\delta\epsilon$ -Fc humano (Sino Biological) a la superficie de la microplaca. Los artículos de ensayo se sometieron a pases a 31.25, 125, 500 y 2000 nM.

10 Figura 110 determinación por resonancia de plasmón de superficie de la afinidad por CD3. Los artículos de ensayo son Fab-scFv-Fc anti-CD20 (C2B8_H1.202_L1.113) x anti-CD3. Se unió covalentemente CD3 $\delta\epsilon$ -Fc de mono cinomolgus (Sino Biological) a la superficie de la microplaca. Los artículos de ensayo se sometieron a pases a 31.25, 125, 500 y 2000 nM.

15 Figura 111 determinación por resonancia de plasmón de superficie de la afinidad por CD3. Los artículos de ensayo son Fab-scFv-Fc anti-CD20 (C2B8_H1.202_L1.113) x anti-CD3. Se unió covalentemente CD3 $\delta\epsilon$ -Fc de mono cinomolgus (Sino Biological) a la superficie de la microplaca. Los artículos de ensayo se sometieron a pases a 31.25, 125, 500 y 2000 nM.

20 Figura 112 Ensayo de citotoxicidad de células T redirigidas, 24 h de incubación, 10.000 células Ramos, 250.000 PBMC. Los artículos de ensayo son Fab-scFv-Fc anti-CD20 (C2B8_H1.202_L1.113) x anti-CD3. La detección se realizó por LDH.

25

Figura 113 Ensayo de citotoxicidad de células T redirigidas, 24 h de incubación, 20.000 células Jeko, 200.000 PBMC (con reducción de CD19). Los artículos de ensayo son Fab-scFv-Fc anti-CD20 (C2B8_H1.202_L1.113) x anti-CD3. La detección se realizó por citometría de flujo, específicamente a la desaparición de células CD19⁺.

Figura 114 producción de IL-6 después de 24 h para el experimento descrito en la Figura 113.

Figura 115 Ensayo de citotoxicidad de células T redirigidas, 5 h de incubación, 20.000 células Jeko, 500.000 PBMC (con reducción de CD19). Los artículos de ensayo son Fab-scFv-Fc anti-CD20 (C2B8_H1L1) x anti-CD3. La detección se realizó por citometría de flujo, específicamente a la desaparición de células CD19⁺.

Figura 116 Ensayo de citotoxicidad de células T redirigidas, 24 h de incubación, 20.000 células Jeko, 500.000 PBMC (con reducción de CD19). Los artículos de ensayo son Fab-scFv-Fc anti-CD20 (C2B8_H1.202_L1.113) x anti-CD3. La detección se realizó por citometría de flujo, específicamente a la desaparición de células CD19⁺.

Figura 117 producción de IL-6 después de 24 h para el experimento descrito en la Figura 113.

Figura 118 Ensayo de citotoxicidad de células T redirigidas, 24 h de incubación, 10.000 células RPMI8226, 500.000 PBMC. Los artículos de ensayo son Fab-scFv-Fc anti-CD38 (OKT10_H1L1, OKT10_H1.77_L1.24) x anti-CD3. La detección se realizó por LDH.

Figura 119 estudio de reducción de Ig en huPBL-SCID. Los artículos de ensayo se dosificaron 1 y 8 días después del injerto de PBMC a 5 mg/kg. La vía de administración fue intraperitoneal. Se tomaron muestras de sangre 14 días después del injerto de PBMC, se procesaron a suero y se ensayaron con respecto a IgG2 e IgM humana.

Figura 120 estudio de reducción de Ig en huPBL-SCID. Los artículos de ensayo se dosificaron 8 días después del injerto de PBMC a 0.03, 0.3 o 3 mg/kg. La vía de administración fue intraperitoneal. Se tomaron muestras de sangre 14 días después del injerto de PBMC, se procesaron a suero y se ensayaron con respecto a IgM e IgG2 humana.

La Figura 121 representa las secuencias de Alto CD20 C2B8_H1.202_L1.113. El enlazador cargado representado es (+H), aunque pueden usarse otros enlazadores cargados o no cargados, tales como los representados en la Figura 33.

La Figura 122 representa las secuencias de Bajo CD20 C2B8_H1L1. El enlazador cargado representado es (+H), aunque pueden usarse otros enlazadores cargados o no cargados, tales como los representados en la Figura 33.

La Figura 123 representa las secuencias de CD123 7G3_H1.109_L1.57. El enlazador cargado representado es (+H), aunque pueden usarse otros enlazadores cargados o no cargados, tales como los representados en la Figura 33.

La Figura 124 muestra una matriz de posibles combinaciones para la invención. Una “A” significa que las CDR de las secuencias de CD3 mencionadas pueden combinarse con las CDR de la TTA en el lado derecho. Es decir, las vhCDR de la secuencia de CD3 H1.30 de cadena pesada variable y las vlCDR de la cadena ligera variable de la secuencia de CD3 L1.57 pueden combinarse con las vhCDR de la secuencia de CD38 OKT10 H1.77 y las vlCDR de la secuencia de OKT10L1.24. Una “B” significa que las CDR de las construcciones de CD3 pueden combinarse con los dominios ligero y pesado variables de la TTA. Es decir, las vhCDR de la secuencia de CD3 H1.30 de cadena pesada variable y las vlCDR de la cadena ligera variable de la secuencia de CD3 L1.57 pueden combinarse con la secuencia de CD38 OKT10 H1.77 de dominio pesado variable y la secuencia de OKT10L1.24. Una “C” está invertida, de tal forma que el dominio pesado variable y el dominio ligero variable de las secuencias de CD3 se usan con las CDR de las TTA. Una “D” es cuando están combinadas las dos cadenas ligeras variables y pesadas variables de cada uno. Una “E” es cuando el scFv del CD3 se usa con la CDR de la TTA, y una “F” es cuando el scFv del CD3 se usa con los dominios pesado variable y ligero variable del dominio de unión a antígeno de TTA. Todas estas combinaciones pueden realizarse en formatos de abridor de botella, por ejemplo, con cualquiera de los formatos de esqueleto mostrados en la Figura 162, o en formatos alternativos, tales como los formatos mAb-Fv, mAb-scFv, Central-scFv, Central-Fv o scFv doble de la Figura 1, incluyendo los esqueletos de formato

mostrados en las Figuras 131 y 132). Sin embargo, en general, es preferible evitar los formatos que incluyan la unión bivalente de CD3. Es decir, puede añadirse "A" (CDR de CD3 X CDR de TTA) a secuencias de abridor de botella (incluyendo las de la Figura 162 o, incluso, de diferentes variantes de heterodimerización) o en un esqueleto de mAb-scFv de la Figura 132, un formato central-scFv, un formato mAb-Fv o un formato central-Fv.

Figura 125. Esquema de Fab-scFv-Fc biespecíficos anti-CD123 x anti-CD3.

Figura 126. Tabla que muestra variantes modificadas por ingeniería genética para aumentar la afinidad y estabilidad de 7G3_H1L1.

Figura 127. Tabla que muestra las propiedades de variantes de 7G3 humanizadas que tienen optimizadas la estabilidad y la afinidad final.

Figura 128. Unión del biespecífico XENP14045 (anti-CD123 x anti-CD3) que se une a la línea celular de AML positiva para CD123, KG-1a.

Figura 129. Citotoxicidad de células T redirigida (RTCC) de XENP14045 que destruye las células KG-1a.

Figura 130. RTCC de XENP14045 con células KG-1a usando diferentes relaciones entre células efectoras y diana (E:T), que demuestra la "destrucción en serie" por células T generadas por XENP14045.

Figura 131. Niveles séricos de fármaco de XENP14045 2 mg/kg administrado IV a ratones C57BL/6. La semivida del biespecífico fue de 6.2 días.

Figura 132. Destrucción de células dendríticas plasmocitoides (PDC) y basófilos sanguíneos CD123+ en monos cynomolgus que recibieron una sola dosis IV de XENP14045 a 0.01, 0.1 o 1 mg/kg.

Figura 133. Destrucción de células dendríticas plasmocitoides (PDC) y basófilos CD123+ en la médula ósea de monos cynomolgus que recibieron una sola dosis IV de XENP14045 a 0.01, 0.1 o 1 mg/kg.

Figura 134. Redistribución de células T después de una sola dosis IV de XENP14045 en monos cynomolgus.

Figura 135. Inducción por CD69 de células T después de una sola dosis IV de XENP14045 en monos cynomolgus.

Figura 136A-136C. Secuencias de la invención. Las regiones CDR están subrayadas.

Figura 137. Pureza de heterodímeros durante la generación de grupos estables usando relaciones variadas de cadena Ligera, Fab-Fc y scFv-Fc (parte superior). Pureza de heterodímeros de diversas condiciones del grupo F2 (parte inferior).

Figura 138. SEC que muestra la alta pureza del material de la línea celular XENP14045 después de una purificación de dos etapas.

La Figura 139 representa la destrucción por células T de células CD123+.

La Figura 140 representa el mecanismo biespecífico para reclutar células T citotóxicas para destruir blastos y células madre de AML.

La Figura 141 representa la producción eficaz del biespecífico
5 XENP14045.

La Figura 142 muestra que el anticuerpo biespecífico XENP14045 se une a células de AML humana, teniendo una KD de 8.1 nM con la proteína CD3 humana.

La Figura 143 muestra que el anticuerpo biespecífico
10 XENP14045 presenta reacción cruzada con células de primate, y tiene una KD de 5.7 nM con CD3 cyno.

La Figura 144 muestra que el anti-CD123 X anti-CD3 destruye líneas celulares de AML humana.

La Figura 145 muestra que el anti-CD123 X anti-CD3 destruye
15 líneas celulares de AML humana.

La Figura 146 muestra la prolongada semivida del biespecífico en ratones.

La Figura 147 muestra la dosis individual en monos.

La Figura 148 muestra la reducción de células CD123+ en
20 monos en basófilos sanguíneos. Selección de basófilos, la citometría de flujo es CD20- CD16+ CD14- CD4- CD8- FcεR1+.

La Figura 149 muestra la reducción de basófilos de médula ósea, usando los mismos parámetros de selección.

La Figura 150 muestra la dosificación repetida que reduce las
25 células CD123+ en monos.

La Figura 151 muestra la reducción de células CD123+ en monos. Selección de basófilos, la citometría de flujo es CD20- CD16+ CD14- CD4- CD8- FcεR1+. Selección de células dendríticas plasmocitoides, citometría de flujo: CD20- CD16- CD14- Cd4- CD8-
5 CD303+.

La Figura 152 muestra la reducción en médula ósea en monos. Los parámetros de selección son como en la Figura 151.

La Figura 153 muestra que la reducción de células CD123+ se correlaciona con la redistribución y activación de células T; la Figura
10 153 es la redistribución de las células T.

La Figura 154 muestra que la reducción de células CD123+ se correlaciona con la redistribución y activación de células T; la Figura 154 es la activación de las células T.

La Figura 155 muestra que la reducción de células CD123+ se
15 correlaciona con la redistribución y activación de células T; la Figura 155 es la liberación de citocinas.

Las Figuras 156A-156D representan materiales asociados con la dificultad de humanizar secuencias anti-CD123 murinas como se describe en el Ejemplo 3. La Figura 125A-C muestra la pérdida de
20 afinidad debida a la humanización (principalmente a través de vH), ya que 13760 es el Fab del anticuerpo murino de partida H0L0, siendo 13763 el primer candidato de vH humanizado y teniendo 13761 cadenas de Fab tanto ligeras como pesadas humanizadas. La Figura 125D muestra la pérdida de ~10 veces en la potencia de
25 RTCC como resultado de la humanización.

La figura 157 representa los resultados de una primera vuelta de humanización ("biblioteca 1"), que genera 108 variantes, entre las que se incluyen LDA, sustituciones de reversión y dirigidas que se sometieron a exploración de afinidad en un formato Fab en una microtarjeta de CD123 de Biacore, explorándose la estabilidad de las variantes de afinidad neutra y superior por DSF.

Las Figuras 158A y 158B muestran el aumento de Tm como se analiza en el Ejemplo 3.

Las Figuras 159A y 159B muestran los resultados de convertir Fab en un formato de abridor de botella, usando un scFv contra CD3 y el Fab según se desarrolló. La Figura 159A muestra el ensayo de unión y la Figura 159B muestra el ensayo RTCC.

Las Figuras 160A-160E muestran los resultados de la "vuelta 2" de la humanización como se indica en el Ejemplo 3. Debe tenerse en cuenta que XENP13967 es el equivalente de XENP14045 en el lado de CD123; 13967 tiene un scFv de CD3 diferente como se muestra en las secuencias.

La Figura 161 muestra los resultados de la vuelta 2 del ensayo de Tm del Ejemplo 3.

La Figura 162A-162D muestra las secuencias de varios esqueletos en formato de abridor de botella útiles, sin las secuencias de Fv (por ejemplo, el scFv y la vh y vl para el lado del Fab). Como apreciarán los expertos en la materia y como se indica más adelante, estas secuencias pueden usarse con cualquiera de los pares de vh y vl indicados en el presente documento, incluyendo un monómero un

scFv (incluyendo opcionalmente un enlazador de scFv cargado) e incluyendo el otro monómero las secuencias de Fab (por ejemplo, una vh unida a la "cadena pesada del lado del Fab" y una vl unida a la "cadena ligera constante"). El scFv puede ser anti-CD3 o anti-TTA, siendo el otro Fab. Es decir, cualquier secuencia de Fv indicada en el presente documento para CD3, CD123, CD38, CD19 o CD20 puede incorporarse en estos esqueletos de la Figura 162 en cualquier combinación.

Debe tenerse en cuenta que estos esqueletos de abridor de botella encuentran utilidad en el formato Central-scFv de la Figura 1B, cuando se añade un segundo Fab adicional (vh-CH1 y vl-ligera constante) con la misma unión a antígeno que el primer Fab, al extremo N del scFv en el "lado de abridor de botella".

La Figura 163 muestra la secuencia de un esqueleto de mAb-scFv de utilidad en la invención, al que se añaden las secuencias de Fv de la invención. Como apreciarán los expertos en la materia y como se indica más adelante, estas secuencias pueden usarse con cualquiera de los pares de vh y vl indicados en el presente documento, incluyendo un monómero tanto Fab como un scFv (incluyendo opcionalmente un enlazador de scFv cargado) e incluyendo el otro monómero la secuencia de Fab (por ejemplo, una vh unida a la "cadena pesada del lado del Fab" y una vl unida a la "cadena ligera constante"). El lado del monómero 1 es el lado de pl negativo de Fab-scFv, e incluye las variantes de heterodimerización L368D/K370S, las variantes de pl isostéricas

N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D, las variantes de anulación E233P/L234V/L235A/G236del/S267K, (todas con respecto a la IgG1). El lado del monómero 2 es el lado de pl positivo de scFv, e incluye las variantes de heterodimerización 364K/E357Q. Sin embargo, 5 pueden sustituirse por otros pares de variantes de sesgo, en particular [S364K/E357Q : L368D/K370S]; [L368D/K370S : S364K]; [L368E/K370S : S364K]; [T411T/E360E/Q362E : D401K]; [L368D/K370S : S364K/E357L] y [K370S : S364K/E357Q].

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

I. DEFINICIONES

Para que la solicitud pueda entenderse más completamente, a continuación se proporcionan varias definiciones. Se entiende que dichas definiciones incluyen sus equivalentes gramaticales.

Por “anulación” en el presente documento se entiende una 15 reducción o eliminación de actividad. Así pues, por ejemplo, “anulación de la unión de FcγR” significa que la variante de aminoácidos de la región Fc tiene menos de un 50 % de la unión de partida en comparación con una región Fc que no contiene la variante específica, siendo preferida una pérdida de actividad menor 20 del 70-80-90-95-98 %, y en general, estando la actividad por debajo del nivel de unión detectable en un ensayo Biacore. Son de un uso particular en la anulación de la unión a FcγR los mostrados en la Figura 16.

Por “ADCC” o “citotoxicidad mediada por células dependiente 25 de anticuerpo” como se usa en el presente documento, se entiende

la reacción mediada por células en la que células citotóxicas no específicas que expresan FcγR reconocen el anticuerpo unido en una célula diana y posteriormente producen la lisis de la célula diana. La ADCC está correlacionada con la unión a FcγRIIIa; una mayor unión a FcγRIIIa conduce a un aumento de la actividad ADCC.

Por “ADCP” o fagocitosis mediada por células dependiente de anticuerpos, como se usa en el presente documento, se entiende la reacción mediada por células en donde células citotóxicas no específicas que expresan FcγR reconocen el anticuerpo unido sobre una célula diana y posteriormente producen la fagocitosis de la célula diana.

Por “modificación”, en el presente documento, se entiende una sustitución, inserción y/o delección de aminoácidos en una secuencia de polipéptido o una alteración en un resto unido químicamente a una proteína. Por ejemplo, una modificación puede ser una estructura PEG o carbohidrato alterado unido a una proteína. Por “modificación de aminoácido” en el presente documento se entiende una sustitución, inserción y/o delección de aminoácido en una secuencia de polipéptido. Por motivos de claridad, a menos que se indique otra cosa, la modificación de aminoácidos siempre es en un aminoácido codificado por ADN, por ejemplo, los 20 aminoácidos que tienen codones en el ADN y ARN.

Por “sustitución de aminoácido” o “sustitución”, en el presente documento se entiende el reemplazo de un aminoácido en una posición particular en una secuencia de polipéptido parental con un

aminoácido diferente. En particular, en algunas realizaciones, la sustitución es en un aminoácido que no es natural en la posición particular, o bien no es natural dentro del organismo o en ningún organismo. Por ejemplo, la sustitución E272Y se refiere a un

5 polipéptido variante, en este caso una variante de Fc, en la que el ácido glutámico en la posición 272 se ha reemplazado con tirosina. Por motivos de claridad, una proteína que se ha modificado por ingeniería genética para cambiar el ácido nucleico que codifica la secuencia pero sin cambiar el aminoácido de partida (por ejemplo,

10 cambiando CGG (que codifica arginina) por CGA (que sigue codificando arginina) para aumentar los niveles de expresión en el organismo hospedador) no es una “sustitución de aminoácido”; es decir, a pesar de la creación de un nuevo gen que codifica la misma proteína, si la proteína tiene el mismo aminoácido en la posición

15 particular que inicialmente no es una sustitución de aminoácido.

Por “inserción de aminoácido” o “inserción”, como se usa en el presente documento, se entiende la adición de una secuencia de aminoácidos en una posición particular en una secuencia de polipéptido parental. Por ejemplo, -233E o 233E designa una

20 inserción de ácido glutámico después de la posición 233 y antes de la posición 234. Además, -233ADE o A233ADE designa una inserción de AlaAspGlu después de la posición 233 y antes de la posición 234.

Por “delección de aminoácido” o “delección”, como se usa en el presente documento, se entiende la eliminación de una secuencia de

25 aminoácidos en una posición particular en una secuencia de

polipéptido parental. Por ejemplo, E233- o E233# o E233()designa una delección de ácido glutámico en la posición 233. Además, EDA233- o EDA233# designa una delección de la secuencia GluAspAla que empieza en la posición 233.

5 Por “proteína variante” o “variante de proteína” o “variante”, como se usan en el presente documento, se entiende una proteína que difiere de la proteína parental en al menos una modificación de aminoácido. La variante de proteína puede hacer referencia a la propia proteína, una composición que comprende la proteína, o la
10 secuencia amino que la codifica. Preferentemente, la variante de proteína tiene al menos una modificación de aminoácido en comparación con la proteína parental, por ejemplo, de aproximadamente una a aproximadamente setenta modificaciones de aminoácidos, y preferentemente de aproximadamente una a
15 aproximadamente cinco modificaciones de aminoácidos en comparación con la secuencia parental. Como se describe más adelante, en algunas realizaciones, el polipéptido parental, por ejemplo un polipéptido parental Fc, es una secuencia humana de tipo silvestre, tal como la región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, aunque
20 ciertas secuencias humanas con variantes también pueden servir como “polipéptidos parentales”, por ejemplo, el híbrido IgG1/2 de la Figura 19. La secuencia variante de proteína en el presente documento preferentemente poseerá al menos aproximadamente un
25 80 % de identidad con una secuencia de proteína parental, y aún más preferentemente al menos aproximadamente un 90 % de

identidad, más preferentemente al menos un 95-98-99 % de identidad. Proteína variante puede hacer referencia a la propia proteína variante, a composiciones que comprenden la variante de proteína, o a la secuencia de ADN que la codifica. Por consiguiente, por

5 “variante de anticuerpo” o “anticuerpo variante” como se usa en el presente documento, se entiende un anticuerpo que difiere de un anticuerpo parental por al menos una modificación de aminoácido, por “variante de IgG” o “IgG variante”, como se usan en el presente documento, se entiende un anticuerpo que difiere de una IgG

10 parental (de nuevo, en muchos casos, de una secuencia de IgG humana) al menos en una modificación de aminoácido, y por “variante de inmunoglobulina” o “inmunoglobulina variante”, como se usan en el presente documento, se entiende una secuencia de inmunoglobulina que difiere de una secuencia de inmunoglobulina

15 parental por al menos una modificación de aminoácido. Por “variante de Fc” o “Fc variante”, como se usan en el presente documento, se entiende una proteína que comprende una modificación de aminoácido en un dominio Fc. Las variantes de Fc de la presente invención se definen de acuerdo con las modificaciones de

20 aminoácidos que las componen. De esta manera, por ejemplo, N434S o 434S es una variante de Fc con la sustitución de serina en posición 434 con respecto al polipéptido Fc parental, en donde la numeración está de acuerdo con el índice EU. De forma similar, M428L/N434S define una variante de Fc con las sustituciones M428L y N434S con

25 respecto al polipéptido Fc parental. La identidad del aminoácido WT

puede no estar especificada, en cuyo caso la variante mencionada anteriormente se denomina 428L/434S. Debe indicarse que el orden en el que se proporcionan las sustituciones es arbitrario, es decir que, por ejemplo, 428L/434S es la misma variante de Fc que

5 M428L/N434S, y así sucesivamente. Para todas las posiciones analizadas en la presente invención que se refieren a anticuerpos, a menos que se indique otra cosa, la numeración de posiciones de aminoácidos está de acuerdo con el índice EU. El índice EU o índice EU como en Kabat o el esquema de numeración EU se refiere a la

10 numeración del anticuerpo EU (Edelman et al., 1969, Proc Natl Acad Sci USA 63: 78-85, incorporado en su totalidad en el presente documento por referencia). La modificación puede ser una adición, delección o sustitución. Las sustituciones pueden incluir aminoácidos naturales y, en algunos casos, aminoácidos sintéticos. Los ejemplos

15 incluyen la Patente de Estados Unidos n.º 6.586.207; WO 98/48032; WO 03/073238; US2004-0214988A1; WO 05/35727A2; WO 05/74524A2; J. W. Chin et al., (2002), Journal of the American Chemical Society 124: 9026-9027; J. W. Chin, y P. G. Schultz, (2002), ChemBioChem 11: 1135-1137; J. W. Chin, et al., (2002), PICAS

20 United States of America 99: 11020-11024; y, L. Wang, y P. G. Schultz, (2002), Chem. 1-10, todos incorporados en su totalidad por referencia.

Como se usa en el presente documento, “proteína” en el presente documento significa al menos dos aminoácidos unidos

25 covalentemente, que incluye proteína, polipéptidos, oligopéptidos y

péptidos. El grupo peptidilo puede comprender aminoácidos naturales y enlaces peptídicos o estructuras peptidomiméticas sintéticas, es decir, “análogos”, tales como peptoides (véase Simon et al., PNAS USA 89(20): 9367 (1992), incorporado en su totalidad por referencia). Los aminoácidos pueden ser naturales o sintéticos (por ejemplo, no un aminoácido que está codificado por ADN); como apreciarán los expertos en la materia. Por ejemplo, homofenilalanina, citrulina, ornitina y norleucina se consideran aminoácidos sintéticos para los fines de la invención, y pueden utilizarse aminoácidos tanto en configuración D como en configuración L (R o S). Las variantes de la presente invención pueden comprender modificaciones que incluyen el uso de aminoácidos sintéticos incorporados usando, por ejemplo, las tecnologías desarrolladas por Shultz y colaboradores, incluyendo pero sin limitación métodos descritos por Cropp y Shultz, 2004, Trends Genet. 20(12): 625-30, Anderson et al., 2004, Proc Natl Acad Sci USA 101 (2): 7566-71, Zhang et al., 2003, 303(5656): 371-3, y Chin et al., 2003, Science 301(5635): 964-7, todos incorporados en su totalidad por referencia. Además, los polipéptidos pueden incluir derivatización sintética de una o más cadenas laterales o extremos, glicosilación, PEGilación, permutación circular, ciclación, enlazadores con otras moléculas, fusión con proteínas o dominios de proteína y adición de etiquetas o marcadores peptídicos.

Por “resto” como se usa en el presente documento se entiende una posición en una proteína y su identidad de aminoácido asociada.

Por ejemplo, la Asparagina 297 (también denominada Asn297 o N297) es un resto en la posición 297 en el anticuerpo humano IgG1.

Por “Fab” o “región Fab”, como se usa en el presente documento, se entiende el polipéptido que comprende los dominios de inmunoglobulina VH, CH1, VL y CL. Fab puede hacer referencia a esta región aislada, o a esta región en el contexto de un anticuerpo de longitud completa, fragmento de anticuerpo o proteína de fusión de Fab. Por “Fv” o “fragmento Fv” o “región Fv”, como se usa en el presente documento, se entiende un polipéptido que comprende los dominios VL y VH de un solo anticuerpo. Como apreciarán los expertos en la materia, estos generalmente están constituidos por dos cadenas.

Por “modificación de subclase de IgG” o “modificación de isotipo”, como se usa en el presente documento, se entiende una modificación de aminoácidos que convierte un aminoácido de un isotipo IgG en el aminoácido correspondiente en un isotipo de IgG alienado diferente. Por ejemplo, como IgG1 comprende una tirosina e IgG2 una fenilalanina en la posición EU 296, una sustitución F296Y en IgG2 se considera una modificación de subclase de IgG.

Por “modificación no natural”, como se usa en el presente documento, se entiende una modificación de aminoácido que no es isotópica. Por ejemplo, como ninguna de las IgG comprende una serina en la posición 434, la sustitución 434S en IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (o híbridos de las mismas) se considera una modificación no natural.

Por “aminoácido” y “identidad de aminoácido”, como se usa en el presente documento, se entiende uno de los 20 aminoácidos naturales que se codifican por el ADN y ARN.

5 Por “función efectora” como se usa en el presente documento, se entiende un acontecimiento bioquímico que resulta de la interacción de una región Fc de anticuerpo con un receptor Fc o ligando. Las funciones efectoras incluye, pero sin limitación, ADCC, ADCCP y CDC.

10 Por “ligando de Fc de IgG”, como se usa en el presente documento, se entiende una molécula, preferentemente un polipéptido, de cualquier organismo que se une a la región Fc de un anticuerpo IgG para formar un complejo de Fc/ligando Fc. Los ligandos de Fc incluyen, pero sin limitación, FcγRI, FcγRII, FcγRIII, FcRn, C1q, C3, lectina de unión a manano, receptor de manosa, 15 proteína A de estafilococo, proteína G de estreptococo y FcγR viral. Los ligandos de Fc también incluyen homólogos del receptor Fc (FcRH), que son una familia de receptores Fc que son homólogos a los FcγR (Davis et al., 2002, Immunological Reviews 190: 123-136, incorporado en su totalidad por referencia). Los ligandos de Fc 20 pueden incluir moléculas no descubiertas que se unen a Fc. Son ligandos de Fc de IgG particulares FcRn y los receptores Fc gamma. Por “ligando de Fc”, como se usa en el presente documento, se entiende una molécula, preferentemente un polipéptido, de cualquier organismo que se une a la región Fc de un anticuerpo para formar un 25 complejo de Fc/ligando de Fc.

Por “receptor Fc gamma”, “FcγR” o “FcγammaR”, como se usan en el presente documento, se entiende cualquier miembro de la familia de proteínas que se unen a la región Fc de un anticuerpo IgG y se codifican por un gen FcγR. En seres humanos, esta familia incluye, pero sin limitación, FcγRI (CD64), incluyendo las isoformas FcγRIa, FcγRIb y FcγRIc; FcγRII (CD32), incluyendo las isoformas FcγRIIa (incluyendo los alotipos H131 y R131), FcγRIIb (incluyendo FcγRIIb-1 y FcγRIIb-2) y FcγRIIc; y FcγRIII (CD16), incluyendo las isoformas FcγRIIIa (incluyendo los alotipos V158 y F158) y FcγRIIIb (incluyendo los alotipos FcγRIIb-NA1 y FcγRIIb-NA2) (Jefferis et al., 2002, Immunol Lett 82: 57-65, incorporado en su totalidad por referencia), así como cualquier alotipo o isoforma de FcγR o FcγR humanos no descubiertos. Un FcγR puede proceder de cualquier organismo, incluyendo pero sin limitación, seres humanos, ratones, ratas, conejos y monos. Los FcγR de ratón incluyen pero sin limitación FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), FcγRIII (CD16) y FcγRIII-2 (CD16-2), así como cualquier alotipo o isoforma de FcγR o FcγR de ratón no descubiertos.

Por “FcRn” o “Receptor Fc neonatal”, como se usa en el presente documento, se entiende una proteína que se une a la región Fc de un anticuerpo IgG y se codifica al menos en parte por un gen FcRn. El FcRn puede proceder de cualquier organismo, incluyendo pero sin limitación seres humanos, ratones, ratas, conejos y monos. Como se conoce en la técnica, la proteína FcRn funcional comprende dos polipéptidos, a menudo denominados la cadena pesada y la

cadena ligera. La cadena ligera es beta-2-microglobulina y la cadena pesada se codifica por el gen FcRn. A menos que se indique otra cosa en el presente documento, FcRn o una proteína FcRn se refiere al complejo de la cadena pesada de FcRn con beta-2-microglobulina.

5 En la Leyenda de la Figura 83 se muestra una diversidad de variantes de FcRn usadas para aumentar la unión al receptor FcRn y, en algunos casos, para aumentar la semivida en suero.

Por “polipéptido parental”, como se usa en el presente documento, se entiende un polipéptido de partida que posteriormente
10 se modifica para generar una variante. El polipéptido parental puede ser un polipéptido natural, o una variante o versión modificada por ingeniería genética de un polipéptido natural. El polipéptido parental puede hacer referencia al propio polipéptido, a composiciones que comprenden el polipéptido parental o a la secuencia de aminoácidos
15 que lo codifica. Por consiguiente, por “inmunoglobulina parental”, como se usa en el presente documento, se entiende un polipéptido de inmunoglobulina no modificado que se modifica para generar una variante y por “anticuerpo parental”, como se usa en el presente documento, se entiende un anticuerpo no modificado que se modifica
20 para generar un anticuerpo variante. Debe indicarse que “anticuerpo parental” incluye anticuerpos comerciales, producidos de forma recombinante conocidos como se indica más adelante.

Por “Fc” o “región Fc” o “dominio Fc”, como se usa en el presente documento, se entiende el polipéptido que comprende la
25 región constante de un anticuerpo excluyendo el primer dominio de

inmunoglobulina de la región constante y, en algunos casos, parte de la bisagra. De esta manera, Fc se refiere a al menos dos dominios de inmunoglobulina de región constante de IgA, IgD e IgG, los tres últimos dominios de inmunoglobulina de región constante de IgE e IgM, y el extremo N terminal de bisagra flexible de estos dominios. En el caso de IgA e IgM, Fc puede incluir la cadena J. En el caso de IgG, el dominio Fc comprende dominios de inmunoglobulina C γ 2 y C γ 3 (C γ 2 y C γ 3) y la región de bisagra inferior entre C γ 1 (C γ 1) y C γ 2 (C γ 2). Aunque los límites de la región Fc pueden variar, normalmente se define que la región Fc de la cadena pesada de IgG humana incluye los restos C226 o P230 hasta su extremo carboxilo, en donde la numeración está de acuerdo con el índice EU como en Kabat. En algunas realizaciones, como se describe de forma más detallada más adelante, las modificaciones de aminoácidos se realizan en la región Fc, por ejemplo, para alterar la unión a uno o más receptores Fc γ R o en el receptor FcRn.

Por “región constante pesada” en el presente documento se entiende la parte CH1-bisagra-CH2-CH3 de un anticuerpo.

Por “proteína de fusión Fc” o “inmunoadesina”, en el presente documento, se entiende una proteína que comprende una región Fc, generalmente unida (opcionalmente a través de un resto enlazador, como se describe en el presente documento) a una proteína diferente, tal como un resto de unión a una proteína diana, como se describe en el presente documento. En algunos casos, un monómero del anticuerpo heterodimérico comprende una cadena pesada de

anticuerpo (que incluye un scFv o que incluye además una cadena ligera) y el otro monómero es una fusión de Fc, que comprende un dominio de Fc variante y un ligando. En algunas realizaciones, estas “proteínas medio anticuerpo-medio fusión” se denominan “cuerpos de fusión”.

Por “posición”, como se usa en el presente documento, se entiende una localización en la secuencia de una proteína. Las posiciones pueden numerarse secuencialmente, o de acuerdo con un formato establecido, por ejemplo el índice EU para la numeración de anticuerpos.

Por “antígeno diana”, como se usa en el presente documento, se entiende la molécula que se une específicamente por la región variable de un anticuerpo dado. Un antígeno diana puede ser una proteína, carbohidrato, lípido u otro compuesto químico. A continuación se describen un amplio número de antígenos diana adecuados.

Por “capacidad de emparejamiento” en el contexto de los monómeros de los anticuerpos heterodiméricos de la invención en el presente documento se entiende que, de forma similar a las dos cadenas de ADN que “se emparejan”, se incorporan variantes de heterodimerización en cada monómero para conservar la capacidad de “emparejarse” para formar heterodímeros. Por ejemplo, si algunas variantes de pl se modifican por ingeniería genética en el monómero A (por ejemplo, haciendo que el pl sea superior) entonces las variantes estéricas que son “pares de carga” que pueden utilizarse

tampoco interfieren con las variantes de pl, por ejemplo, las variantes de carga que hacen que un pl sea superior se ponen en la misma "cadena" o "monómero" para conservar las dos funcionalidades. De forma similar, para variantes "sesgadas" que se
5 convierten en pares de un conjunto como se indica con más detalle más adelante, el experto en la materia considerará el pl para decidir en que cadena o monómero incorpora un conjunto del par, de tal forma que la separación de pl se maximice usando el pl de los sesgos también.

10 Por "célula diana", como se usa en el presente documento, se entiende una célula que expresa un antígeno diana.

Por "región variable", como se usa en el presente documento, se entiende la región de una inmunoglobulina que comprende uno o más dominios de Ig sustancialmente codificados por cualquiera de
15 los genes de V. kappa, V. lambda y/o VH que constituyen los loci genéticos de inmunoglobulina de cadena kappa, lambda y pesada respectivamente.

Por "tipo silvestre o WT" en el presente documento se entiende una secuencia de aminoácidos o una secuencia de nucleótidos que
20 se encuentra en la naturaleza, incluyendo variaciones alélicas. Una proteína WT tiene una secuencia de aminoácidos o una secuencia de nucleótidos que no se ha modificado intencionadamente.

Los anticuerpos de la presente invención generalmente están aislados o son recombinantes. "Aislados", cuando se usa para
25 describir los diversos polipéptidos desvelados en el presente

documento, significa un polipéptido que se ha identificado y separado y/o recuperado de una célula o cultivo celular en el que se expresó. Normalmente, un polipéptido aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación. Un “anticuerpo aislado”, se
5 refiere a un anticuerpo que carece sustancialmente de otros anticuerpos que tienen especificidades antigénicas diferentes. “Recombinante” significa que los anticuerpos se han generado usando técnicas de ácido nucleico recombinante en células hospedadoras exógenas.

10 “Unión específica” o “se une específicamente a” o es “específico para” un antígeno o un epítipo particular significa una unión que es mediblemente diferente de una interacción no específica. La unión específica puede medirse, por ejemplo, determinando la unión de una molécula en comparación con la unión
15 de una molécula de control, que generalmente es una molécula de estructura similar que no tiene actividad de unión. Por ejemplo, la unión específica puede determinarse por competición con una molécula de control que es similar a la diana.

La unión específica para un antígeno o un epítipo particular
20 puede presentarse, por ejemplo, por un anticuerpo que tiene una KD para un antígeno o epítipo de al menos aproximadamente 10^{-4} M, al menos aproximadamente 10^{-5} M, al menos aproximadamente 10^{-6} M, al menos aproximadamente 10^{-7} M, al menos aproximadamente 10^{-8} M, al menos aproximadamente 10^{-9} M, al menos aproximadamente
25 10^{-10} M, al menos aproximadamente 10^{-11} M, al menos

aproximadamente 10-12 M, o mayor, donde KD se refiere a una tasa de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular. Típicamente, un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno tendrá una KD que es 20-, 50-, 100-, 500-, 1000-, 5.000-, 10.000- o más veces mayor para una molécula de control con respecto al antígeno o epítipo.

Además, la unión específica para un antígeno o un epítipo particular puede presentarse, por ejemplo, por un anticuerpo que tiene una KA o Ka para un antígeno o epítipo de al menos 20-, 50-, 100-, 500-, 1000-, 5.000-, 10.000- o más veces mayor para el epítipo con respecto a un control, donde KA o Ka se refiere a una tasa de asociación de una interacción de anticuerpo-antígeno particular. La afinidad de unión se mide generalmente usando un ensayo Biacore.

II. VISIÓN GENERAL

Se han diseñado anticuerpos biespecíficos que se acoplan conjuntamente a CD3 y a un antígeno tumoral diana y se han usado para redirigir las células T para que ataquen y lisen células tumorales diana. Los ejemplos incluyen los formatos BiTE y DART, que se acoplan de forma monovalente a CD3 y a un antígeno tumoral. Aunque el enfoque de dirección a CD3 ha resultado ser considerablemente prometedor, un efecto secundario común de estas terapias es la producción asociada de citocinas, que con frecuencia conduce al síndrome tóxico de liberación de citocinas. Como el dominio de unión anti-CD3 del anticuerpo biespecífico se acopla a

todas las células T, se recluta la subserie de células T CD4 de alta producción de citocinas. Además, la subserie de células T CD4 incluye células T reguladoras, cuyo reclutamiento y expansión puede conducir potencialmente a una supresión inmune y tener un impacto negativo sobre la supresión tumoral a largo plazo. Además, estos formatos no contienen dominios de Fc y muestran semividas en suero muy cortas en los pacientes.

Aunque el enfoque de dirección a CD3 ha resultado ser considerablemente prometedor, un efecto secundario común de estas terapias es la producción asociada de citocinas, que con frecuencia conduce al síndrome tóxico de liberación de citocinas. Como el dominio de unión anti-CD3 del anticuerpo biespecífico se acopla a todas las células T, se recluta la subserie de células T CD4 de alta producción de citocinas. Además, la subserie de células T CD4 incluye células T reguladoras, cuyo reclutamiento y expansión puede conducir potencialmente a una supresión inmune y tener un impacto negativo sobre la supresión tumoral a largo plazo. Una de estas posibles formas para reducir la producción de citocinas y posiblemente reducir la activación de células T CD4 es reducir la afinidad del dominio anti-CD3 por CD3.

Por consiguiente, en algunas realizaciones la presente invención proporciona construcciones de anticuerpos que comprenden dominios de unión a antígenos anti-CD3 que son agentes de unión “fuertes” o “de alta afinidad” a CD3 (por ejemplo, un ejemplo son los dominios variables pesado y ligero representados

como H1.30_L1-47 (incluyendo opcionalmente un enlazador cargado cuando sea apropiado)) y también se unen a CD38. En otras realizaciones, la presente invención proporciona construcciones de anticuerpo que comprenden dominios de unión a antígeno anti-CD3
5 que son agentes de unión “débiles” o “de menor afinidad” a CD3. Otras realizaciones proporcionan construcciones de anticuerpo que comprenden dominios de unión a antígeno anti-CD3 que tienen una afinidad intermedia o “media” por CD3 que también se unen a CD38. La afinidad se mide generalmente usando un ensayo Biacore.

10 Debe apreciarse que las secuencias de anti-CD3 “altos, medios, bajos” de la presente invención pueden usarse en una diversidad de formatos de heterodimerización. Aunque la mayor parte de la divulgación del presente documento usa el formato “abridor de botella” de los heterodímeros, estas secuencias pesada y ligera
15 variables, así como las secuencias de scFv (y secuencias de Fab que comprenden estas secuencias pesada y ligera variables) pueden usarse en otros formatos, tales como los representados en la Figura 2 de la Publicación WO n.º 2014/145806, cuyas Figuras, formatos y leyendas se incorporan expresamente en el presente documento por
20 referencia.

Por consiguiente, la presente invención proporciona anticuerpos heterodiméricos que se unen a dos antígenos diferentes, por ejemplo los anticuerpos son “biespecíficos”, ya que se unen a dos antígenos diana diferentes, en general antígenos tumorales
25 diana (TTA) como se describe más adelante. Estos anticuerpos

heterodiméricos pueden unirse a estos antígenos diana de forma monovalente (por ejemplo, hay un solo dominio de unión a antígeno tal como un par de dominios ligero variable y pesado variable) o de forma bivalente (hay dos dominios de unión a antígeno que se unen cada uno independientemente al antígeno). Los anticuerpos heterodiméricos de la invención se basan en el uso de diferentes monómeros que contienen sustituciones de aminoácidos que “favorecen” la formación de heterodímeros sobre los homodímeros, como se indica con más detalles más adelante, acoplados con “variantes de pl” que permiten una purificación sencilla de los heterodímeros de entre los homodímeros, como se indica de forma similar más adelante. Para los anticuerpos biespecíficos heterodiméricos de la invención, la presente invención generalmente se basa en el uso de dominios de Fc modificados por ingeniería genética o variantes que pueden autoensamblarse en células de producción para producir proteínas heterodiméricas, y métodos para generar y purificar dichas proteínas heterodiméricas.

III. ANTICUERPOS

La presente invención se refiere a la generación de anticuerpos biespecíficos que se unen a dos antígenos diferentes, por ejemplo CD3 y un antígeno tumoral diana tal como CD19, CD20, CD38 y CD123, y en general son anticuerpos terapéuticos. Como se analiza más adelante, el término “anticuerpo” se usa de forma general. Los anticuerpos que encuentran utilidad en la presente invención pueden tener varios formatos como se describe en el presente documento,

incluyendo anticuerpos tradicionales así como derivados, fragmentos y miméticos de anticuerpo, descritos en el presente documento.

Las unidades estructurales de anticuerpo tradicionales típicamente comprenden un tetrámero. Cada tetrámero está
5 compuesto típicamente de dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "ligera" (típicamente que tiene un peso molecular de aproximadamente 25 kDa) y una cadena "pesada" (que tiene típicamente un peso molecular de aproximadamente 50-70 kDa). Las cadenas ligeras humanas se
10 clasifican como cadenas ligeras kappa y lambda. La presente invención se refiere a la clase de IgG, que tiene varias subclases, incluyendo, pero sin limitación, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Debe tenerse en cuenta que la IgG1 tiene diferentes alotipos con polimorfismos en 356 (D o E) y 358 (L o M). Las secuencias
15 representadas en el presente documento usan el alotipo 356D/358M, sin embargo, el otro alotipo se incluye en el presente documento. Es decir, cualquier secuencia que incluya un dominio Fc de IgG1 incluido en el presente documento puede tener 356E/358L reemplazando al alotipo 356D/358M.

20 Además, muchas de las secuencias del presente documento tienen al menos una de las cisteínas en la posición 220 reemplazada por una serina; generalmente esto ocurre en el lado del "monómero de scFv" en la mayor parte de las secuencias representadas en el presente documento, aunque también puede ocurrir en el lado del
25 "monómero de Fab", o en ambos, para reducir la formación de

disulfuro. Dentro de las secuencias del presente documento, se incluyen específicamente una o las dos de estas cisteínas reemplazadas (C220S).

De esta manera, “isotipo” como se usa en el presente documento se refiere a cualquiera de las subclases de inmunoglobulinas definidas por las características químicas y antigénicas de sus regiones constantes. Debe entenderse que los anticuerpos terapéuticos también pueden comprender híbridos de isotipos y/o subclases. Por ejemplo, como se muestra en la Publicación US 2009/0163699, incorporada por referencia, la presente invención cubre la modificación por ingeniería genética por pl de híbridos IgG1/G2.

La parte amino terminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento del antígeno, generalmente denominado en la técnica y en el presente documento “dominio Fv” o “región Fv”. En la región variable, tres bucles están juntos para cada uno de los dominios V de la cadena pesada y cadena ligera para formar un sitio de unión al antígeno. Cada uno de los bucles se denomina región determinante de complementariedad (denominado en lo sucesivo “CDR”), en la que la variación en la secuencia de aminoácidos es muy significativa. “Variable” se refiere al hecho de que ciertos segmentos de la región variable difieren extensivamente en secuencia entre los anticuerpos. La variabilidad dentro de la región variable no está distribuida de forma uniforme. En

su lugar, las regiones V consisten en tramos relativamente invariantes denominados regiones marco(FR) de 15-30 aminoácidos separadas por regiones más cortas de variabilidad extrema denominadas “regiones hipervariables” que tienen cada una 9-15 aminoácidos de longitud o más.

Cada VH y VL está compuesta de tres regiones hipervariables (“regiones determinantes de complementariedad,” “CDR” y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxi en el siguiente orden: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4.

La región hipervariable en general incluye los restos de aminoácido desde aproximadamente los restos de aminoácido 24-34 (LCDR1; “L” indica cadena ligera), 50-56 (LCDR2) y 89-97 (LCDR3) en la región variable de cadena ligera y aproximadamente 31-35B (HCDR1; “H” indica cadena pesada), 50-65 (HCDR2) y 95-102 (HCDR3) en la región variable de cadena pesada; Kabat et al., SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991) y/o los restos que forman un bucle hipervariable (por ejemplo, restos 26-32 (LCDR1), 50-52 (LCDR2) y 91-96 (LCDR3) en la región variable de cadena ligera y 26-32 (HCDR1), 53-55 (HCDR2) y 96-101 (HCDR3) en la región variable de cadena pesada; Chothia y Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-917. Más adelante se describen CDR específicas de la invención.

Como apreciarán los expertos en la materia, la colocación y la numeración exacta de las CDR puede ser diferente entre los

diferentes sistemas de numeración. Sin embargo, debe entenderse que la divulgación de una secuencia pesada variable y/o ligera variable incluye la divulgación de las CDR asociadas. Por consiguiente, la divulgación de cada región pesada variable es una divulgación de las vhCDR (por ejemplo, vhCDR1, vhCDR2 y vhCDR3) y la divulgación de cada región ligera variable es una divulgación de las vlCDR (por ejemplo, vlCDR1, vlCDR2 y vlCDR3).

A lo largo de la presente memoria descriptiva, el sistema de numeración de Kabat generalmente se usa cuando se hace referencia a un resto en el dominio variable (aproximadamente, restos 1-107 de la región variable de cadena ligera y restos 1-113 de la región variable de cadena pesada) y el sistema de numeración EU para regiones Fc (por ejemplo, Kabat et al., supra (1991)).

La presente invención proporciona un gran número de conjuntos de CDR diferentes. En este caso, un “conjunto de CDR completo” comprende las tres CDR ligeras variables y tres CDR pesadas variables, por ejemplo, una vlCDR1, vlCDR2, vlCDR3, vhCDR1, vhCDR2 y vhCDR3. Estas pueden formar parte de un dominio ligero variable o pesado variable de mayor tamaño, respectivamente. Además, como se indica con más detalle en el presente documento, los dominios pesado variable y ligero variable pueden estar en cadenas polipeptídicas separadas, cuando se usa una cadena pesada y ligera (por ejemplo, cuando se usan Fab) o en una sola cadena polipeptídica en el caso de las secuencias de scFv.

Las CDR contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno, o más específicamente sitio de unión a epítopo de los anticuerpos. “Epítopo” se refiere a un determinante que interacciona con un sitio de unión a antígeno específico en la región variable de una molécula de anticuerpo conocido como parátopo. Los epítopos son agrupamientos de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y normalmente tienen características estructurales específicas, así como características de carga específicas. Un solo antígeno puede tener más de un epítopo.

El epítopo puede comprender restos de aminoácido directamente implicados en la unión (también denominados componentes inmunodominantes del epítopo) y otros restos de aminoácido, que no están implicados directamente en la unión, tales como restos de aminoácido que están bloqueados efectivamente por el péptido de unión a antígeno específicamente; en otras palabras, el resto de aminoácido está dentro de la huella del péptido de unión a antígeno específicamente.

Los epítopos pueden ser conformacionales o lineales. Un epítopo conformacional se produce por aminoácidos yuxtapuestos espacialmente de diferentes segmentos de la cadena polipeptídica lineal. Un epítopo lineal es uno producido por restos de aminoácido adyacentes en una cadena polipeptídica. Los epítopos conformacionales y no conformacionales pueden distinguirse en que la unión al primero pero no al último se pierde en presencia de disolventes desnaturalizantes.

Un epítopo típicamente incluye al menos 3, y más habitualmente al menos 5 u 8-10 aminoácidos en una única conformación espacial. Los anticuerpos que reconocen el mismo epítopo pueden verificarse en un inmunoensayo sencillo que muestre la capacidad de un anticuerpo para bloquear la unión de otro anticuerpo a un antígeno diana, por ejemplo, “binning”.

La parte carboxi terminal de cada cadena define una región constante principalmente responsable de la función efectora. Kabat et al. recogieron numerosas secuencias primarias de las regiones variables de cadenas pesadas y cadenas ligeras. Basándose en el grado de conservación de las secuencias, clasificaron las secuencias primarias individuales en la CDR y el marco e hicieron una lista de las mismas (véase SEQUENCES OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5ª edición, NIH publication, No. 91-3242, E.A. Kabat et al., incorporado en su totalidad por referencia).

En la subclase de inmunoglobulinas IgG, hay varios dominios de inmunoglobulina en la cadena pesada. Por “dominio de inmunoglobulina (Ig)” en el presente documento se entiende una región de una inmunoglobulina que tiene una estructura terciaria característica. Son de interés en la presente invención los dominios de cadena pesada incluyendo, los dominios pesado constante (CH) y los dominios de bisagra. En el contexto de los anticuerpos IgG, los isotipos de IgG tienen cada uno tres regiones CH. Por consiguiente, dominios “CH” en el contexto de las IgG son los siguientes: “CH1” se refiere a las posiciones 118-220 de acuerdo con el índice EU como

en Kabat. "CH2" se refiere a las posiciones 237-340 de acuerdo con el índice EU como en Kabat y "CH3" se refiere a las posiciones 341-447 de acuerdo con el índice EU como en Kabat. Como se muestra en el presente documento y se describe más adelante, las variantes de pl pueden estar en una o más de las regiones CH, así como en la región de bisagra, analizada más adelante.

Debe indicarse que las secuencias representadas en el presente documento empiezan en la región CH1, posición 118; las regiones variables no están incluidas excepto cuando se indica. Por ejemplo, el primer aminoácido de SEQ ID NO: 2, aunque se denomina posición "1" en el listado de secuencias, corresponde a la posición 118 de la región CH1, de acuerdo con la numeración EU.

Otro tipo de dominio de Ig de la cadena pesada es la región de bisagra. Por "bisagra" o "región de bisagra" o "región de bisagra de anticuerpo" o "región de bisagra de inmunoglobulina" en el presente documento se entiende el polipéptido flexible que comprende los aminoácidos entre el primer y segundo dominios constantes de un anticuerpo. Estructuralmente, el dominio CH1 de IgG termina en la posición EU 220, y el dominio CH2 de IgG empieza en el resto en la posición 237 EU. De esta manera, para la IgG, la bisagra de anticuerpo en el presente documento se define de manera que incluye las posiciones 221 (D221 en IgG1) a 236 (G236 en IgG1), en donde la numeración está de acuerdo con el índice EU como en Kabat. En algunas realizaciones, por ejemplo en el contexto de una región Fc, está incluida la bisagra inferior, haciendo referencia en

general “bisagra inferior” a las posiciones 226 o 230. Como se indica en el presente documento, también pueden realizarse variantes de pl en la región de bisagra.

La cadena ligera en general comprende dos dominios, el dominio ligero variable (que contiene las CDR de cadena ligera y junto con los dominios pesados variables que forman la región Fv), y una región de cadena ligera constante (con frecuencia denominada CL o Ck).

Otra región de interés para sustituciones adicionales, indicadas más adelante, es la región Fc.

De esta manera, la presente invención proporciona diferentes dominios de anticuerpo. Como se describe en el presente documento y se conoce en la técnica, los anticuerpos heterodiméricos de la invención comprenden diferentes dominios dentro de las cadenas pesada y ligera, que pueden ser también solapantes. Estos dominios incluyen, pero sin limitación, el dominio Fc, el dominio CH1, el dominio CH2, el dominio CH3, el dominio de bisagra, el dominio constante pesado (CH1-bisagra-dominio Fc o CH1-bisagra-CH2-CH3), el dominio pesado variable, el dominio ligero variable, el dominio constante ligero, dominios FAb y dominios scFv.

De esta manera, el “dominio Fc” incluye el dominio -CH2-CH3 y, opcionalmente, un dominio de bisagra. En las realizaciones del presente documento, cuando un scFv se une a un dominio Fc, es el extremo C de la construcción de scFv el que se une a la bisagra del dominio Fc; por ejemplo, generalmente se une a la secuencia EPKS

que es el comienzo de la bisagra. La cadena pesada comprende un dominio pesado variable y un dominio constante, que incluye un CH1-bisagra opcional-dominio Fc que comprende un CH2-CH3. La cadena ligera comprende una cadena ligera variable y el dominio constante ligero. Un scFv comprende una cadena pesada variable, un enlazador de scFv y un dominio ligero variable. En la mayoría de las construcciones y secuencias indicadas en el presente documento, el extremo C de la cadena ligera variable está unido al extremo N del enlazador de scFv, cuyo extremo C está unido al extremo N de una cadena pesada variable (N-vh-enlazador-vl-C), aunque este puede cambiarse (N-vl-enlazador-vh-C).

Algunas realizaciones de la invención comprenden al menos un dominio scFv, que, aunque no se produce de forma natural, generalmente incluye un dominio pesado variable y un dominio ligero variable, unidos entre sí por un enlazador de scFv. Como se muestra en el presente documento, hay varios enlazadores de scFv adecuados que pueden usarse, incluyendo enlaces peptídicos tradicionales generados por técnicas recombinantes.

El péptido enlazador puede incluir predominantemente los siguientes restos de aminoácido: Gly, Ser, Ala o Thr. El péptido enlazador debe tener una longitud que sea adecuada para unir dos moléculas de tal forma que asuman la conformación correcta una con respecto a la otra de forma que retenga la actividad deseada. En una realización, el enlazador tiene de aproximadamente 1 a 50 aminoácidos de longitud, preferentemente de aproximadamente 1 a

30 aminoácidos de longitud. En una realización, pueden usarse
enlazadores de 1 a 20 aminoácidos de longitud, encontrando utilidad
de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 aminoácidos en
algunas realizaciones. Los enlazadores útiles incluyen polímeros de
5 glicina-serina, incluyendo, por ejemplo, (GS)_n, (GSGGS)_n,
(GGGGS)_n y (GGGS)_n, donde n es un número entero de al menos
uno (y generalmente de 3 a 4), polímeros de glicina-alanina,
polímeros de alanina-serina y otros enlazadores flexibles. Como
alternativa, pueden encontrar utilidad como enlazadores, es decir
10 pueden encontrar uso como enlazadores una diversidad de polímeros
no proteicos, incluyendo pero sin limitación polietilenglicol (PEG),
polipropilenglicol, polioxialquilenos o copolímeros de polietilenglicol
y polipropilenglicol.

Otras secuencias enlazadoras pueden incluir cualquier
15 secuencia de cualquier longitud de dominio CL/CH1 pero no todos
los restos del dominio CL/CH1; por ejemplo, los primeros 5-12 restos
de aminoácido de los dominios CL/CH1. Los enlazadores pueden
proceder de la cadena ligera de inmunoglobulina, por ejemplo C κ o
C λ . Los enlazadores pueden proceder de cadenas pesadas de
20 inmunoglobulina de cualquier isotipo, incluyendo por ejemplo C γ 1,
C γ 2, C γ 3, C γ 4, C α 1, C α 2, C δ , C ϵ y C μ . Las secuencias enlazadoras
también pueden proceder de otras proteínas tales como proteínas de
tipo Ig (por ejemplo TCR, FcR, KIR), secuencias derivadas de
regiones bisagra y otras secuencias naturales de otras proteínas.

En algunas realizaciones, el enlazador es un “enlazador de dominios”, usado para unir dos dominios cualesquiera como se indica en el presente documento. Aunque puede usarse cualquier enlazador adecuado, muchas realizaciones utilizan un polímero de glicina-serina, incluyendo, por ejemplo, (GS) n , (GSGGS) n , (GGGGS) n y (GGGS) n , donde n es un número entero de al menos uno (y generalmente de 3 a 4 a 5) así como cualquier secuencia peptídica que permita la unión recombinante de los dos dominios con una longitud y flexibilidad suficiente para permitir que cada dominio retenga su función biológica. . En algunos casos, y prestando atención a la “capacidad de emparejamiento”, como se indica más adelante, pueden usarse enlazadores de dominio cargado, como se usa en algunas realizaciones de enlazadores de scFv.

En algunas realizaciones, el enlazador de scFv es un enlazador de scFv cargado, de los que se muestran varios en la Figura 33. Por consiguiente, la presente invención proporciona además enlazadores de scFv cargados, para facilitar la separación en pl entre un primer y un segundo monómero. Es decir, mediante la incorporación de un enlazador de scFv cargado, positivo o negativo (o ambos, en el caso de soportes que usan scFv en diferentes monómeros), esto permite que el monómero que comprende el enlazador cargado altere el pl sin realizar cambios adicionales en los dominios Fc. Estos enlazadores cargados pueden sustituirse en cualquier scFv que contenga enlazadores estándar. De nuevo, como apreciarán los expertos en la materia, los enlazadores de scFv cargados usados en

la “cadena” o monómero correcto, de acuerdo con los cambios
deseados en pl. Por ejemplo, como se analiza en el presente
documento, para realizar un anticuerpo heterodimérico en formato F
triple, se calcula el pl original de la región Fv de cada uno de los
5 dominios de unión a antígeno deseado, y se elige uno para fabricar
un scFv, y dependiendo del pl, se eligen enlazadores positivos o
negativos.

También pueden usarse enlazadores de dominio cargado para
aumentar la separación por pl de los monómeros de la invención y,
10 por lo tanto, estos se incluyen en la Figura 33 y pueden usarse en
cualquier realización del presente documento en la que se utilice un
enlazador.

En algunas realizaciones, los anticuerpos son de longitud
completa. Por “anticuerpo de longitud completa” en el presente
15 documento se entiende la estructura que constituye la forma
biológica natural de un anticuerpo, incluyendo regiones variable y
constante, incluyendo una o más modificaciones como se indican en
el presente documento, particularmente en los dominios Fc para
permitir la formación de heterodimerización o la purificación de
20 heterodímeros de entre los homodímeros. Los anticuerpos de
longitud completa generalmente incluyen dominios Fab y Fc y pueden
contener además dominios de unión a antígeno extra tales como
scFv, como se representa en general en las Figuras.

En una realización, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo,
25 siempre que contenga al menos un dominio constante que puede

modificarse por ingeniería genética para producir heterodímeros, tales como ingeniería genética de pl. Otros fragmentos de anticuerpo que pueden usarse incluyen fragmentos que contienen uno o más de los dominios CH1, CH2, CH3 bisagra y CL de la invención que se han
5 modificado por ingeniería genética de pl. Por ejemplo, las fusiones Fc son fusiones de la región Fc (CH2 y CH3, opcionalmente con la región de bisagra) fusionadas a otra proteína. En la técnica se conocen varias fusiones de Fc y pueden mejorarse por la adición de las variantes de heterodimerización de la invención. En el presente
10 caso, pueden realizarse fusiones de anticuerpos que comprenden CH1; CH1, CH2 y CH3; CH2; CH3; CH2 y CH3; CH1 y CH3, de las que cualquiera o todas pueden realizarse opcionalmente con la región de bisagra, utilizando cualquier combinación de variantes de heterodimerización descritas en el presente documento.

15 En particular, los formatos representados en la Figura 1 son anticuerpos, denominados normalmente “anticuerpos heterodiméricos”, lo que significa que la proteína tiene al menos dos secuencias de Fc asociadas autoensambladas en un dominio Fc heterodimérico.

20 **Anticuerpos quiméricos y humanizados**

En algunas realizaciones, el anticuerpo puede ser una mezcla de diferentes especies, por ejemplo un anticuerpo quimérico y/o un anticuerpo humanizado. En general, tanto “anticuerpos quiméricos” como “anticuerpos humanizados” se refiere a anticuerpos que
25 combinan regiones de más de una especie. Por ejemplo, los

“anticuerpos quiméricos” tradicionalmente comprenden una o más regiones variables de un ratón (o rata en algunos casos) y la región o regiones constantes de un humano. “Anticuerpos humanizados” en general se refieren a anticuerpos no humanos que han cambiado las

5 regiones marco de dominio variable por secuencias encontradas en anticuerpos humanos. En general, en un anticuerpo humanizado, el anticuerpo entero, excepto las CDR, se codifica por un polinucleótido de origen humano o es idéntico a dicho anticuerpo excepto dentro de sus CDR. Las CDR, de las que algunas o todas se codifican por

10 ácidos nucleicos que se han originado en un organismo no humano, se injertan en el marco de lámina beta de una región variable de anticuerpo humano para crear un anticuerpo, cuya especificidad se determina por las CDR injertadas. La creación de dichos anticuerpos se describe, por ejemplo, en el documento WO 92/11018, Jones,

15 1986, Nature 321: 522-525, Verhoeyen et al., 1988, Science 239: 1534-1536, todos incorporados en su totalidad por referencia. Con frecuencia se requiere una “retromutación” de restos marco aceptores seleccionados en los restos donadores correspondientes para volver a conseguir la afinidad que se pierde en las

20 construcciones injertadas iniciales (documentos US 5530101; US 5585089; US 5693761; US 5693762; US 6180370; US 5859205; US 5821337; US 6054297; US 6407213, todos incorporados en su totalidad por referencia). El anticuerpo humanizado óptimamente también comprenderá al menos una parte de una región constante de

25 inmunoglobulina, típicamente de una inmunoglobulina humana, y por

lo tanto típicamente comprenderá una región Fc humana. También pueden generarse anticuerpos humanizados usando ratones con un sistema inmunitario modificado por ingeniería genética. Roque et al., 2004, *Biotechnol. Prog.* 20: 639-654, incorporado en su totalidad por referencia. En la técnica se conocen bien una diversidad de técnicas y métodos para humanizar y reformar anticuerpos no humanos (véase Tsurushita y Vasquez, 2004, *Humanization of Monoclonal Antibodies, Molecular Biology of B Cells*, 533-545, Elsevier Science (USA), y referencias citadas en el presente documento, todas incorporadas en su totalidad por referencia). Los métodos de humanización incluyen, pero sin limitación, métodos descritos en Jones et al., 1986, *Nature* 321: 522-525; Riechmann et al., 1988; *Nature* 332: 323-329; Verhoeyen et al., 1988, *Science*, 239: 1534-1536; Queen et al., 1989, *Proc Natl Acad Sci, USA* 86: 10029-33; He et al., 1998, *J. Immunol.* 160: 1029-1035; Carter et al., 1992, *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 4285-9, Presta et al., 1997, *Cancer Res.* 57(20): 4593-9; Gorman et al., 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 4181-4185; O'Connor et al., 1998, *Protein Eng* 11: 321-8, todos incorporados en su totalidad por referencia. La humanización u otros métodos para reducir la inmunogenicidad de regiones variables de anticuerpos no humanos pueden incluir métodos de modificación de superficie, como se describe por ejemplo en Roguska et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 969-973, incorporado en su totalidad por referencia.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos de la invención comprenden una región variable de cadena pesada de un gen de inmunoglobulina de cadena pesada de línea germinal particular y/o una región variable de cadena ligera de un gen de inmunoglobulina de cadena ligera de línea germinal particular. Por ejemplo, dichos anticuerpos pueden comprender o consistir en un anticuerpo humano que comprende regiones variables de cadena pesada o ligera que son "el producto de" o "proceden de" una secuencia de línea germinal particular. Un anticuerpo humano que es "el producto de" o "procede de" una secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana puede identificarse como tal comparando la secuencia de aminoácidos del anticuerpo humano con las secuencias de aminoácidos de inmunoglobulinas de línea germinal humana y seleccionando la secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana que se parece más en secuencia (es decir, de mayor % de identidad) a la secuencia del anticuerpo humano. Un anticuerpo humano que es "el producto de" o "procede de" una secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana particular puede contener diferencias de aminoácidos en comparación con la secuencia de la línea germinal, debido a, por ejemplo, mutaciones somáticas naturales o la introducción interna de mutaciones dirigidas. Sin embargo, un anticuerpo humanizado típicamente es al menos un 90% idéntico en la secuencia de aminoácidos a una secuencia de aminoácidos codificada por un gen de inmunoglobulina de línea germinal humana y contiene restos de aminoácido que identifican el

anticuerpo como un anticuerpo derivado de secuencias humanas cuando se compara con las secuencias de aminoácidos de inmunoglobulina de línea germinal de otras especies (por ejemplo, secuencias de línea germinal murina). En ciertos casos, un anticuerpo humanizado puede ser al menos un 95, 96, 97, 98 o 99%, o incluso al menos un 96%, 97%, 98% o 99% idéntico en la secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de la línea germinal. Típicamente, un anticuerpo humanizado derivado de una secuencia de línea germinal humana particular presentará no más de 10-20 diferencias de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal humana (antes de la introducción de cualquier variante de sesgo, pl y anulación en la misma; es decir, el número de variantes generalmente es bajo, antes de la introducción de las variantes de la invención). En ciertos casos, el anticuerpo humanizado puede presentar no más de 5, o incluso no más de 4, 3, 2 o 1 diferencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal (de nuevo, antes de la introducción de cualquier variante de sesgo, pl y anulación en la misma; es decir, el número de variantes generalmente es bajo, antes de la introducción de las variantes de la invención).

En una realización, el anticuerpo parental se ha madurado por afinidad, como se conoce en la técnica. Pueden emplearse métodos basados en la estructura para la humanización y la maduración de

afinidad, por ejemplo como se describe en USSN 11/004.590. Pueden emplearse métodos basados en selección para humanizar y/o madurar la afinidad de regiones variables de anticuerpos, incluyendo pero sin limitación los métodos descritos en Wu et al.,
5 1999, J. Mol. Biol. 294: 151-162; Baca et al., 1997, J. Biol. Chem. 272(16): 10678-10684; Rosok et al., 1996, J. Biol. Chem. 271(37): 22611-22618; Rader et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 8910-8915; Krauss et al., 2003, Protein Engineering 16(10): 753-759, todos incorporados en su totalidad por referencia. Otros métodos de
10 humanización pueden implicar el injerto de únicamente partes de las CDR, incluyendo pero sin limitación los métodos descritos en USSN 09/810.510; Tan et al., 2002, J. Immunol. 169:1119-1125; De Pascalis et al., 2002, J. Immunol. 169: 3076-3084, todos incorporados en su totalidad por referencia.

15 **IV. ANTICUERPOS HETERODIMÉRICOS**

Por consiguiente, en algunas realizaciones, la presente invención proporciona anticuerpos heterodiméricos que se basan en el uso de dos secuencias Fc variantes de cadena pesada diferentes, que se autoensamblarán para formar dominios Fc heterodiméricos y
20 anticuerpos heterodiméricos.

La presente invención se refiere a nuevas construcciones para proporcionar anticuerpos heterodiméricos que permiten la unión a más de un antígeno o ligando, por ejemplo, para permitir la unión
25 biespecífica. Las construcciones de anticuerpo heterodimérico se basan en la naturaleza de autoensamblamiento de los dos dominios

Fc de las cadenas pesadas de los anticuerpos, por ejemplo dos “monómeros” que se ensamblan formando un “dímero”. Los anticuerpos heterodiméricos se obtienen alterando la secuencia de aminoácidos de cada monómero como se analiza con más detalle
5 más adelante. De esta manera, la presente invención generalmente se dirige a la creación de anticuerpos heterodiméricos que pueden acoplarse conjuntamente a antígenos de varias formas, basándose en las variantes de aminoácidos en las regiones constantes que son diferentes en cada cadena para promover la formación
10 heterodimérica y/o facilitar la purificación de los heterodímeros de entre los homodímeros.

De esta manera, la presente invención proporciona anticuerpos biespecíficos. Un problema en curso en las tecnologías de anticuerpos es el deseo de anticuerpos “biespecíficos” que se unan a
15 dos antígenos diferentes de forma simultánea, permitiendo de esta forma en general que los diferentes antígenos estén próximos y den como resultado nuevas funcionalidades y nuevas terapias. En general, estos anticuerpos se obtienen incluyendo genes de cada cadena pesada y ligera en las células hospedadoras. Esto
20 generalmente da como resultado la formación del heterodímero deseado (A-B), así como los dos homodímeros (A-A y B-B (sin incluir los elementos heterodiméricos de cadena ligera)). Sin embargo, un obstáculo importante en la formación de anticuerpos biespecíficos es la dificultad de purificar los anticuerpos heterodiméricos de entre los

anticuerpos homodiméricos y/o desviar la formación del heterodímero con respecto a la formación de los homodímeros.

Hay varios mecanismos que pueden usarse para generar los heterodímeros de la presente invención. Además, como apreciarán los expertos en la materia, estos mecanismos pueden combinarse para asegurar una alta heterodimerización. De esta manera, las variantes de aminoácidos que conducen a la producción de heterodímeros se denominan “variantes de heterodimerización”. Como se analiza más adelante, las variantes de heterodimerización pueden incluir variantes estéricas (por ejemplo, las variantes de “llave y cerradura” o “sesgadas” descritas más adelante y las variantes de “pares de carga” descritas más adelante) así como “variantes de pl”, lo cual permite la purificación de homodímeros de entre los heterodímeros. Como se describe en general en el documento WO2014/145806, incorporado en el presente documento por referencia en su totalidad y como se indica específicamente más adelante para la discusión de “variantes de heterodimerización”, los mecanismos útiles para la heterodimerización incluyen variantes de “llave y cerradura” (“KIH”; algunas veces en el presente documento como variantes “sesgadas” (véase la discusión en el documento WO2014/145806), “dirección electroestática” o “pares de carga” como se describe en el documento WO2014/145806, variantes de pl como se describe en el documento WO2014/145806, y variantes de Fc adicionales generales como se indica en el documento WO2014/145806 y más adelante.

En la presente invención, hay varios mecanismos básicos que pueden facilitar la purificación de anticuerpos heterodiméricos; uno se basa en el uso de variantes de pI, de tal forma que cada monómero tiene un pI diferente, permitiéndose de esta manera la purificación isoelectrica de proteínas diméricas A-A, A-B y B-B. Como alternativa, algunos formatos de armazón, tales como el formato "triple F", también permiten la separación basándose en el tamaño. Como se indica adicionalmente más adelante, también es posible "desviar" la formación de heterodímeros con respecto a los homodímeros. De esta manera, una combinación de variantes de heterodimerización estéricas y variantes de pI o de par de carga encuentran utilidad particular en la invención.

En general, las realizaciones de uso particular en la presente invención se basan en conjuntos de variantes que incluyen variantes de sesgo, que promueven la formación de heterodimerización con respecto a la formación de homodimerización, junto con variantes de pI, que aumentan la diferencia de pI entre los dos monómeros.

Además, como se indica con más detalle más adelante, dependiendo del formato del anticuerpo de heterodímero, las variantes de pI pueden estar contenidas dentro de los dominios constante y/o Fc de un monómero, o pueden usarse enlazadores cargados, enlazadores de dominio o enlazadores de scFv. Es decir, los armazones que utilizan scFv tales como el formato Triple F pueden incluir enlazadores de scFv cargados (positivos o negativos), que proporcionan un refuerzo de pI adicional con fines de

purificación. Como apreciarán los expertos en la materia, algunos formatos Triple F son útiles con enlazadores de scFv cargados y sin ajustes de pI adicionales, aunque la invención proporciona variantes de pI que están en uno o los dos monómeros, y/o también enlazadores de dominio cargado. Además, una modificación por ingeniería genética de aminoácidos adicional para funcionalidades alternativas también puede conferir cambios de pI, tales como variantes de Fc, FcRn y KO.

La presente invención que utiliza pI como mecanismo de separación para permitir la purificación de proteínas heterodiméricas, pueden introducirse variantes de aminoácidos en uno o los dos polipéptidos del monómero; es decir, el pI de uno de los monómeros (denominado en el presente documento por simplificar “monómero A”) puede modificarse por ingeniería genética de manera que sea distinto del del monómero B, o pueden cambiarse tanto el monómero A como el monómero B, aumentándose el pI del monómero A y reduciéndose el pI del monómero B. Como se indica con más detalle más adelante, los cambios de pI de uno o los dos monómeros pueden realizarse retirando o añadiendo un resto cargado (por ejemplo, un aminoácido neutro se reemplaza por un resto de aminoácido cargado positiva o negativamente, por ejemplo glicina por ácido glutámico), cambiando un resto cargado de positivo o negativo a la carga opuesta (ácido aspártico por lisina) o cambiando un resto cargado por un resto neutro (por ejemplo pérdida de carga,

lisina por serina). En las Figuras se muestran varias de estas variantes.

Por consiguiente, esta realización de la presente invención permite crear un cambio suficiente en el pI en al menos uno de los monómeros de tal forma que los heterodímeros puedan separarse de los homodímeros. Como apreciarán los expertos en la materia y como se analiza más adelante adicionalmente, esto puede hacerse usando una región constante de cadena pesada “de tipo silvestre” y una región variante que se haya modificado por ingeniería genética para aumentar o disminuir su pI (wt A-+B o wt A- -B), o aumentando una región y reduciendo la otra región (A+ -B- o A- B+).

De esta manera, en general, un componente de algunas realizaciones de la presente invención son variantes de aminoácido en las regiones constantes de anticuerpos que se dirigen para alterar el punto isoeléctrico (pI) de al menos uno, si no los dos, monómeros de una proteína dimérica para formar “anticuerpos de pI”) incorporando sustituciones de aminoácidos (“variantes de pI” o “sustituciones de pI”) en uno o los dos monómeros. Como se muestra en el presente documento, la separación de los heterodímeros de los dos homodímeros puede realizarse si los pI de los dos monómeros difieren en una cantidad tan pequeña como 0.1 unidades de pH, encontrando utilidad en la presente invención diferencias de 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 o mayores.

Como apreciarán los expertos en la materia, el número de variantes de pI a incluir en cada uno o los dos monómeros para

conseguir una buena separación dependerá en parte del pl de partida de los componentes, por ejemplo en el formato triple F, el pl de partida del scFv y Fab de interés. Es decir, para determinar que monómero modificar por ingeniería genética o en que “dirección” (por ejemplo, más positivo o más negativo), las secuencias de Fv de los dos antígenos diana se calculan y se toma una decisión a partir de esto. Como se conoce en la técnica, los diferentes Fv tendrán diferentes pl de partida que se explotan en la presente invención. En general, como se indica en el presente documento, los pl se modifican por ingeniería genética para dar como resultado una diferencia de pl total de cada monómero de al menos aproximadamente 0.1 log, siendo preferido de 0.2 a 0.5 como se indica en el presente documento.

Además, como apreciarán los expertos en la materia y como se indica en el presente documento, en algunas realizaciones, los heterodímeros pueden separarse de los homodímeros basándose en el tamaño. Como se muestra en las Figuras 1, por ejemplo, varios de los formatos permiten la separación de heterodímeros y homodímeros basándose en el tamaño.

En el caso en el que se usan variantes de pl para conseguir la heterodimerización, mediante el uso de la región o regiones constantes de la cadena o cadenas pesadas, se proporciona un enfoque más modular par diseñar y purificar proteínas biespecíficas, incluyendo anticuerpos. De esta manera, en algunas realizaciones, no se incluyen variantes de heterodimerización (incluyendo variantes

de heterodimerización de sesgo y purificación) en las regiones variables, de tal forma que cada anticuerpo individual debe modificarse por ingeniería genética. Además, en algunas realizaciones, la posibilidad de inmunogenicidad resultante de las variantes de pl se reduce significativamente al importar variantes de pl de diferentes isotipos de IgG de tal forma que el pl se cambia sin introducir una inmunogenicidad significativa. De esta manera, un problema adicional a solucionar es el esclarecimiento de dominios constantes de bajo pl con un alto contenido de secuencia humana, por ejemplo, la minimización o evitación de restos no humanos en cualquier posición particular.

Un efecto beneficioso secundario que puede producirse con esta ingeniería genética de pl es también la extensión de la semivida en suero y el aumento de la unión a FcRn. Es decir, como se describe en USSN 13/194.904 (incorporado por referencia en su totalidad), la reducción del pl de dominios constantes de anticuerpo (incluyendo los encontrados en anticuerpos y fusiones de Fc) pueden conducir a una mayor retención en suero *in vivo*. Estas variantes de pl para aumentar la semivida en suero también facilitan cambios de pl para la purificación.

Además, debe indicarse que las variantes de pl de las variantes de heterodimerización proporcionan un efecto beneficioso adicional para la analítica y el proceso de control de calidad de los anticuerpos biespecíficos, ya que la capacidad de eliminar, minimizar y distinguir cuando están presentes homodímeros es significativa. De

forma similar, la capacidad de ensayar de forma fiable la reproducibilidad de la producción de anticuerpos heterodiméricos es importante.

VARIANTES DE HETERODIMERIZACIÓN

5 La presente invención proporciona proteínas heterodiméricas, incluyendo anticuerpos heterodiméricos en una diversidad de formatos, que utilizan variantes heterodiméricas para permitir la formación heterodimérica y/o la purificación de entre los homodímeros.

10 Hay varios pares adecuados de conjuntos de variantes de sesgo de heterodimerización. Estas variantes vienen en “pares” de “conjuntos”. Es decir, un conjunto del par se incorporar en el primer monómero y el otro conjunto del par se incorpora en el segundo monómero. Debe tenerse en cuenta que estos conjuntos no se

15 comportan necesariamente como variantes de “llave en cerradura”, con una correspondencia de uno a uno entre un resto en un monómero y un resto en el otro; es decir, estos pares de conjuntos forman una interfaz entre los dos monómeros que promueve la formación de heterodímeros y reduce la formación de homodímeros,

20 permitiendo que el porcentaje de heterodímeros que se forman espontáneamente en condiciones biológicas sea mayor del 90 %, en lugar del 50 % esperado (25 % homodímero A/A:50 % heterodímero A/B:25 % homodímero B/B).

VARIANTES ESTÉRICAS

En algunas realizaciones, la formación de heterodímeros puede facilitarse por la adición de variantes estéricas. Es decir, cambiando aminoácidos en cada cadena pesada, es más probable que cadenas pesadas diferentes se asocien para formar la estructura heterodimérica que para formar homodímeros con las mismas secuencias de aminoácidos de Fc. En la Figura 29 se incluyen variantes estéricas adecuadas.

Un mecanismo se denomina en general en la técnica “llaves y cerraduras”, que se refiere a que también puede usarse opcionalmente la modificación por ingeniería genética de aminoácidos que crea influencias estéricas para favorecer la formación heterodimérica y desfavorecer la formación homodimérica; esto se denomina algunas veces “llaves y cerraduras”, como se describe en USSN 61/596.846, Ridgway et al., Protein Engineering 9(7): 617 (1996); Atwell et al., J. Mol. Biol. 1997 270: 26; Patente de Estados Unidos n.º 8.216.805, todos los cuales se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad. Las Figuras identifican varios pares de “monómero A - monómero B” que se basan en “llaves y cerraduras”. Además, como se describe en Merchant et al., Nature Biotech. 16: 677 (1998), estas mutaciones de “llave y cerradura” pueden combinarse con enlaces disulfuro para desviar la formación hacia la heterodimerización.

Un mecanismo adicional que encuentra utilidad en la generación de heterodímeros algunas veces se denomina “dirección electroestática” como se describe en Gunasekaran et al., J. Biol.

Chem. 285(25): 19637 (2010), incorporado en el presente documento por referencia en su totalidad. Esto algunas veces se denomina en el presente documento "pares de carga". En esta realización, se usan cargas electroestáticas para desviar la formación hacia la heterodimerización. Como apreciarán los expertos en la materia, esto puede tener también un efecto sobre el pl, y por lo tanto sobre la purificación, y de esta manera en algunos casos también podrían considerarse variantes de pl. Sin embargo, como estas se generaron para forzar la heterodimerización y no se usaron como herramientas de purificación, se clasifican como "variantes estéricas". Estas incluyen pero sin limitación, D221E/P228E/L368E emparejado con D221R/P228R/K409R (por ejemplo, estos son "conjuntos correspondientes a monómeros") y C220E/P228E/368E emparejado con C220R/E224R/P228R/K409R.

Otras variantes de monómero A y monómero B adicionales que pueden combinarse con otras variantes, opcional e independientemente en cualquier cantidad, tales como variantes de pl indicadas en el presente documento u otras variantes estéricas que se muestran en la Figura 37 del documento US 2012/0149876, cuyas figuras y leyendas y SEQ ID NO se incorporan expresamente por referencia en el presente documento.

En algunas realizaciones, las variantes estéricas indicadas en el presente documento pueden incorporarse de forma opcional e independiente con cualquier variante de pl (u otras variantes tales como variantes de Fc, variantes de FcRn etc.) en uno o los dos

monómeros, y pueden incluirse o excluirse de forma independiente y opcional de las proteínas de la invención.

En la Figura 29 se encuentra una lista de variantes de sesgo adecuadas, mostrando la Figura 34 algunos pares de utilidad particular en muchas realizaciones. Son de utilidad particular en muchas realizaciones los pares de conjuntos que incluyen, pero sin limitación, S364K/E357Q: L368D/K370S; L368D/K370S: S364K; L368E/K370S: S364K; T411T/E360E/Q362E: D401K; L368D/K370S: S364K/E357L y K370S: S364K/E357Q. En términos de nomenclatura, el par “S364K/E357Q: L368D/K370S” significa que uno de los monómeros tiene el conjunto doble variante S364K/E357Q y el otro tiene el conjunto doble variante L368D/K370S.

VARIANTES DE PI (PUNTO ISOELÉCTRICO) PARA HETERODÍMEROS

En general, como apreciarán los expertos en la materia, hay dos categorías generales de variantes de PI: las que aumentan el pl de la proteína (cambios básicos) y las que reducen en pl de la proteína (cambios ácidos). Como se describe en el presente documento, pueden realizarse todas las combinaciones de estas variantes: un monómero puede ser de tipo silvestre, o una variante que no presenta un pl significativamente diferente del tipo silvestre, y el otro puede ser más básico o más ácido. Como alternativa, cada monómero se cambia, uno a más básico y otro a más ácido.

En la Figura 30 se muestran combinaciones preferidas de variantes de pl. Como se indica en el presente documento y se

muestra en las figuras, estos cambios se muestran con respecto a IgG1, pero todos los isotipos pueden alterarse de esta manera, así como híbridos de isotipo. En el caso en el que el dominio constante procede de IgG2-4, también puede usarse R133E y R133Q.

5 En una realización, por ejemplo en el formato de abridor de
botella, una combinación preferida de variantes de pl tiene un
monómero (el lado de Fab negativo) que comprende variantes
208D/295E/384D/418E/421D (N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D
con respecto a la IgG1 humana) y un segundo monómero (el lado de
10 scFv positivo) que comprende un enlazador de scFv cargado
positivamente, incluyendo (GKPGS)₄. Sin embargo, como apreciarán
los expertos en la materia, el primer monómero incluye un dominio
CH1, que incluye la posición 208. Por consiguiente, en
construcciones que no incluyen un dominio CH1 (por ejemplo, en el
15 caso de proteínas de fusión de Fc heterodiméricas que no utilizan un
dominio CH1 en uno de los dominios, por ejemplo, en un formato de
scFv doble), un conjunto de Fc de variantes de pl negativo preferidas
incluye variantes 295E/384D/418E/421D
(Q295E/N384D/Q418E/N421D con respecto a la IgG1 humana).

20 HETERODÍMEROS DE ANTICUERPO VARIANTES DE CADENA
LIGERA

sustituciones de aminoácidos para reducir el pI de la cadena ligera incluyen, pero sin limitación K126E, K126Q, K145E, K145Q, N152D, S156E, K169E, S202E, K207E y la adición del péptido DEDE en el extremo c de la cadena ligera. Los cambios en esta categoría
5 basados en la cadena ligera lambda constante incluyen una o más sustituciones en R108Q, Q124E, K126Q, N138D, K145T y Q199E. Además, también puede aumentarse el pI de las cadenas ligeras.

VARIANTES ISOTÍPICAS

Además, muchas realizaciones de la invención se basan en la
10 “importación” de aminoácidos de pI en posiciones particulares de un isotipo de IgG en otro, reduciéndose o eliminándose de esta manera la posibilidad de introducir inmunogenicidad indeseada en las variantes. Se muestran varias de estas en la Figura 21 de la Publicación de Estados Unidos 2014/0370013, incorporada en el
15 presente documento por referencia. Es decir, la IgG1 es un isotipo común para anticuerpos terapéuticos por una diversidad de razones, incluyendo una alta función efectora. Sin embargo, la región constante pesada de IgG1 tiene un mayor pI que la de IgG2 (8.10 frente a 7.31). Mediante la introducción de restos de IgG2 en
20 posiciones particulares en el esqueleto de IgG1, se reduce (o se aumenta) el pI del monómero resultante y presenta adicionalmente una mayor semivida en suero. Por ejemplo, IgG1 tiene una glicina (pI 5.97) en la posición 137, e IgG2 tiene un ácido glutámico (pI 3.22); la importación del ácido glutámico afectará al pI de la proteína
25 resultante. Como se describe más adelante, generalmente se

requieren varias sustituciones de aminoácidos para afectar de forma significativa al pI del anticuerpo variante. Sin embargo, debe indicarse como se analiza más adelante que incluso cambios en las moléculas de IgG2 permiten una mayor semivida en suero.

5 En otras realizaciones, se realizan cambios de aminoácidos no isotópicos, para reducir el estado de carga total de la proteína resultante (por ejemplo, cambiando un aminoácido de mayor pI por un aminoácido de menor pI) o para permitir acomodaciones en la estructura para conseguir estabilidad, etc., como se describe
10 adicionalmente más adelante.

 Además, mediante la modificación del pI por ingeniería genética de los dominios constantes tanto ligero como pesado, pueden verse cambios significativos en cada monómero del heterodímero. Como se analiza en el presente documento, si los pI
15 de los dos monómeros difieren en al menos 0.5 se puede permitir la separación por cromatografía de intercambio iónico o enfoque isoeléctrico, u otros métodos sensibles al punto isoeléctrico.

CÁLCULO DEL PI

 El pI de cada monómero puede depender del pI del dominio
20 constante de cadena pesada variante y el pI del monómero total, incluyendo el dominio constante de cadena pesada variante y el compañero de fusión. De esta manera, en algunas realizaciones, el cambio de pI se calcula basándose en el dominio constante de cadena pesada variante, usando el esquema de la Figura 19 de la
25 Publicación de Estados Unidos 2014/0370013. Como se analiza en el

presente documento, cada monómero a modificar por ingeniería genética generalmente se decide por el pl intrínseco de las regiones Fv y armazón. Como alternativa, el pl de cada monómero puede compararse.

5 **VARIANTES DE PI QUE TAMBIÉN CONFIEREN MEJOR UNIÓN**
A FCRN *IN VIVO*

En el caso en el que la variante de pl reduce el pl del monómero, pueden tener el efecto beneficioso añadido de mejorar la retención en suero *in vivo*.

10 Aunque aún se está examinando, se cree que las regiones Fc tienen mayores semividas *in vivo*, por que la unión a FcRn a pH 6 en un endosoma se encuentra la región Fc (Ghetie y Ward, 1997 Immunol Today. 18(12): 592-598, incorporado en su totalidad por referencia). El compartimento endosómico después recicla el Fc a la

15 superficie celular. Una vez que el compartimento se abre al espacio extracelular, el mayor pH, ~7.4, induce la liberación de Fc de nuevo a la sangre. En ratones, Dall' Acqua et al. mostraron que mutantes de Fc con mayor unión a FcRn a pH 6 y pH 7.4 realmente tenían concentraciones en suero reducidas y la misma semivida que el Fc

20 de tipo silvestre (Dall' Acqua et al. 2002, J. Immunol. 169: 5171-5180, incorporado en su totalidad por referencia). La mayor afinidad de Fc por FcRn a pH 7.4 se cree que impide la liberación del Fc de nuevo a la sangre. Por lo tanto, las mutaciones de Fc que aumentarán la semivida de Fc *in vivo* idealmente aumentarán la unión de FcRn a

25 menor pH mientras que se permite la liberación de Fc a mayor pH. El

aminoácido histidina cambia su estado de carga en el intervalo de pH de 6.0 a 7.4. Por lo tanto, no es sorprendente encontrar restos de His en posiciones importantes en el complejo Fc/FcRn.

Recientemente se ha sugerido que anticuerpos con regiones variables que tienen puntos isoeléctricos menores también pueden tener mayores semivida en suero (Igawa et al., 2010 PEDS. 23(5): 385-392, incorporado en su totalidad por referencia). Sin embargo, el mecanismo de esto aún no se entiende bien. Además, las regiones variables difieren de un anticuerpo a otro. Las variantes de región constante con pI reducido y una semivida prolongada proporcionarían un enfoque más modular para mejorar las propiedades farmacocinéticas de los anticuerpos, como se describe en el presente documento.

OTRAS VARIANTES DE FC PARA UNA FUNCIONALIDAD ADICIONAL

Además de las variantes de aminoácidos de pI, hay varias modificaciones de aminoácidos de Fc útiles que pueden realizarse por una diversidad de razones, incluyendo, pero sin limitación, para alterar la unión a uno o más receptores FcγR, alterar la unión a receptores FcRn, etc.

Por consiguiente, las proteínas de la invención pueden incluir modificaciones de aminoácidos, incluyendo las variantes de heterodimerización indicadas en el presente documento, que incluye las variantes de pI y variantes estéricas. Cada conjunto de variantes

puede incluirse o excluirse de forma independiente y opcional de cualquier proteína heterodimérica particular.

VARIANTES DE FCYR

Por consiguiente, hay varias sustituciones de Fc útiles que
5 pueden realizarse para alterar la unión a uno o más de los
receptores FcγR. Pueden ser útiles sustituciones que den como
resultado una mayor unión así como una menor unión. Por ejemplo,
se sabe que la mayor unión a Fc RIIIa generalmente da como
resultado una mayor ADCC (citotoxicidad mediada por células
10 dependiente de anticuerpos; la reacción mediada por células en
donde células citotóxicas no específicas que expresan FcγR
reconocen el anticuerpo unido en una célula diana y posteriormente
producen la lisis de la célula diana). De forma similar, la unión
reducida a FcγRIIb (un receptor inhibidor) puede ser beneficiosa
15 también en algunas circunstancias. Las sustituciones de aminoácidos
que encuentran utilidad en la presente invención incluyen las
indicadas en USSN 11/124.620 (particularmente en la Figura 41),
11/174.287, 11/396.495, 11/538.406, todos los cuales se incorporan
expresamente en el presente documento por referencia en su
20 totalidad y específicamente para las variantes desveladas en el
presente documento. Las variantes particulares que encuentran
utilidad incluyen, pero sin limitación, 236A, 239D, 239E, 332E, 332D,
239D/332E, 267D, 267E, 328F, 267E/328F, 236A/332E,
239D/332E/330Y, 239D, 332E/330L, 243A, 243L, 264A, 264V y 299T.

Además, hay sustituciones de Fc adicionales que encuentran utilidad para aumentar la unión al receptor FcRn y aumentar la semivida en suero, como se desvela específicamente en USSN 12/341.769, incorporado en el presente documento por referencia en su totalidad, incluyendo, pero sin limitación 434S, 434A, 428L, 308F, 259I, 428L/434S, 259I/308F, 436I/428L, 436I o V/434S, 436V/428L y 259I/308F/428L.

VARIANTES DE ABLACIÓN

De forma similar, otra categoría de variantes funcionales son las “variantes de ablación de FcγR” o “variantes knock out de Fc(FcKO o KO)”. En estas realizaciones, para algunas aplicaciones terapéuticas, es deseable reducir o eliminar la unión normal del dominio Fc a uno o más o a todos los receptores de Fcγ (por ejemplo FcγR1, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa, etc.) para evitar mecanismos de acción adicionales. Es decir, por ejemplo, en muchas realizaciones, particularmente en el uso de anticuerpos biespecíficos que se unen a CD3 de forma monovalente, generalmente es deseable anular la unión a FcγRIIIa para eliminar o reducir significativamente la actividad ADCC, en donde uno de los dominios Fc comprende una o más variantes de ablación del receptor de Fcγ. Estas variantes de anulación se representan en la Figura 31 y cada una puede incluirse o excluirse independiente y opcionalmente, utilizando los aspectos preferidos variantes de anulación seleccionadas del grupo que consiste en G236R/L328R, E233P/L234V/L235A/G236del/S239K, E233P/L234V/L235A/G236del/S267K,

E233P/L234V/L235A/G236del/S239K/A327G,

E233P/L234V/L235A/G236del/S267K/A327G y

E233P/L234V/L235A/G236del. Debe tenerse en cuenta que las variantes de ablación mencionadas en el presente documento anular

5 la unión a FcyR, pero generalmente no anulan la unión a FcRn.

COMBINACIÓN DE VARIANTES HETERODIMÉRICAS Y DE FC

Como apreciarán los expertos en la materia, todas las variantes de heterodimerización mencionadas (incluyendo variantes de sesgo y/o pl) pueden combinarse opcional e independientemente de cualquier manera, siempre que conserven su “capacidad de emparejamiento” o “partición de monómeros”. Además, todas estas variantes pueden combinarse en cualquiera de los formatos de heterodimerización.

En el caso de variantes de pl, aunque en las Figuras se muestran realizaciones que encuentran utilidad particular, pueden generarse otras combinaciones, siguiendo la norma básica de alterar la diferencia de pl entre dos monómeros para facilitar la purificación.

Además, cualquiera de las variantes de heterodimerización, sesgo y pl también se combinan de forma independiente y opcional con variantes de anulación de Fc, variantes de Fc, variantes de FcRn, como se indica en general en el presente documento.

FORMATOS ÚTILES DE LA INVENCION

Como apreciarán los expertos en la materia y analizarán con más detalle más adelante, las proteínas de fusión heterodiméricas de la presente invención pueden tener una amplia diversidad de

configuraciones, como se representa en general en las Figuras 1. Algunas figuras representan configuraciones “de un solo extremo”, en las que hay un tipo de especificidad en un “brazo” de la molécula y una especificidad diferente en el otro “brazo”. Otras figuras
5 representan configuraciones de “doble extremo”, en las que hay al menos un tipo de especificidad en la “parte superior” de la molécula y una o más especificidades diferentes en la “parte inferior” de la molécula. De esta manera, la presente invención se dirige a nuevas composiciones de inmunoglobulina que se acoplan conjuntamente a
10 un primer y un segundo antígeno diferente.

Como apreciarán los expertos en la materia, los formatos heterodiméricos de la invención pueden tener diferentes valencias así como pueden ser biespecíficos. Es decir, los anticuerpos heterodiméricos de la invención pueden ser bivalentes y específicos,
15 en donde un antígeno tumoral diana (por ejemplo CD3) se une por un dominio de unión y el otro antígeno tumoral diana (por ejemplo CD20, CD38, CD123, etc.) se une por un segundo dominio de unión. Los anticuerpos heterodiméricos también pueden ser trivalentes y biespecíficos, en donde el primer antígeno se une por dos dominios
20 de unión y el segundo antígeno por un segundo dominio de unión. Como se indica en el presente documento, cuando CD3 es uno de los antígenos diana, es preferible que CD3 se una solo de forma monovalente, para reducir los posibles efectos secundarios.

La presente invención utiliza dominios de unión a antígeno anti-
25 CD3 en combinación con dominios de unión a antígeno anti-antígeno

tumoral diana (TTA). Como apreciarán los expertos en la materia, puede usarse cualquier colección de anti-CDR de CD3, anti-dominios pesados variables y ligeros variables de CD3, Fab y scFv como se representa en cualquiera de las Figuras (véanse en particular las Figuras 2 a 7, y la Figura 68). De forma similar, puede usarse cualquier de los dominios de unión a antígeno anti-TTA, por ejemplo, los dominios de unión a antígeno anti-CD38 anti-CD20 y anti-CD19 y anti-CD123, ya sean CDR, dominios ligeros variables o dominios pesados variables, Fab y scFv como se representa en cualquiera de las Figuras, opcional e independientemente combinados en cualquier combinación.

FORMATO DE ABRIDOR DE BOTELLA

Un armazón heterodimérico que encuentra utilidad particular en la presente invención es el formato de armazón “triple F” o “abridor de botella” como se muestra en la Figura 1A, A y B. En esta realización, una cadena pesada del anticuerpo contiene un Fv monocatenario (“scFv”, como se define más adelante) y la otra cadena pesada es un formato FAb “regular”, que comprende una cadena pesada variable y una cadena ligera. Esta estructura algunas veces se denomina en el presente documento formato “triple F” (scFv-FAb-Fc) o formato de “abridor de botella”, debido a la similitud visual general a un abridor de botellas (véanse las Figuras 1). Las dos cadenas se juntan mediante el uso de variantes de aminoácido en las regiones constantes (por ejemplo, el dominio Fc, el dominio CH1 y/o la región de bisagra) que promueven la formación de

anticuerpos heterodiméricos como se describe con más detalle más adelante.

Hay varias ventajas distintas en el presente formato “triple F”. Como se conoce en la técnica, los análogos de anticuerpo que se basan en dos construcciones de scFv con frecuencia tienen problemas de estabilidad y de agregación, que pueden aliviarse en la presente invención mediante la adición de un par de cadena ligera y pesada “regular”. Además, a diferencia de los formatos que se basan en dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, no hay problemas con el emparejamiento incorrecto de las cadenas pesadas y ligeras (por ejemplo, emparejamiento pesada 1 con ligera 2, etc.).

Muchas de las realizaciones indicadas en el presente documento se basan en general en el formato de abridor de botella que comprende un primer monómero que comprende un scFv, que comprende un dominio pesado variable y ligero variable, unidos covalentemente usando un enlazador de scFv (cargado, en muchos pero no en todos los casos), donde el scFv está unido covalentemente al extremo N de un primer dominio Fc normalmente a través de un enlazador de dominios (que, como se indica en el presente documento, puede estar sin carga o cargado). El segundo monómero del formato de abridor de botella es una cadena pesada y la composición comprende además una cadena ligera.

En general, en muchas realizaciones preferidas, el scFv es el dominio que se une al CD3, uniéndose el Fab de las cadenas pesada y ligera al otro TTA.

Además, los dominios Fc de la invención generalmente comprenden variantes de sesgo (por ejemplo, un conjunto de sustituciones de aminoácidos como se muestra en la Figura 29 y Figura 34, seleccionándose las variantes de sesgo particularmente
5 útiles del grupo que consiste en S364K/E357Q : L368D/K370S; L368D/K370S: S364K; L368E/K370S: S364K; T411T/E360E/Q362E: D401K; L368D/K370S: S364K/E357L y K370S: S364K/E357Q), opcionalmente variantes de ablación (incluyendo las mostradas en la Figura 31), opcionalmente enlazadores de scFv cargados (incluyendo
10 los mostrados en la Figura 33) y la cadena pesada comprende variantes de pl (incluyendo las mostradas en la Figura 30).

En algunas realizaciones, cualquiera de las secuencias de vh y vl representadas en el presente documento (incluyendo todas las secuencias de vh y vl representadas en las Figuras, incluyendo las
15 dirigidas a CD20, CD38 y CD123) pueden añadirse a los formatos de esqueleto de abridor de botella de la Figura 162 como el "lado del Fab", usando cualquiera de las secuencias de scFv anti-CD3 mostradas en las Figuras. Las secuencias anti-CD3 que encuentran
utilidad particular en estas realizaciones son H1.30_L1.47 anti-CD3, H1.32_L1.47 anti-CD3, H1.89_L1.47 anti-CD3, H1.90_L1.47 anti-CD3,
20 H1.33_L1.47 anti-CD3 y H1.31_L1.47 anti-CD3, unidas como el lado de scFv de los esqueletos mostrados en la Figura 162.

La presente invención proporciona formatos de abridor de botella en los que las secuencias de scFv anti-CD3 son como se
25 muestran en la Figura 2 a la Figura 7 y la Figura 68, incluyendo

cualquier combinación con los formatos de esqueleto de la Figura 162. Además, cualquiera de las secuencias de vh y vl anti-CD3 mostradas en la Figura 2 a la Figura 7 y en la Figura 68 puede usarse como lado de Fab.

5 La presente invención proporciona formatos de abridor de botella con dominios de unión al antígeno CD38 en los que las secuencias anti-CD38 son como se muestran en las Figuras, incluyendo las Figuras 8 a 10. Como se ha indicado anteriormente, cada secuencia de vh y vl anti-CD38 puede ser el lado de Fab o el
10 lado de scFv, y puede unirse como uno de los dominios de unión a antígeno de un formato de abridor de botella, incluyendo los de la Figura 162. Cuando las secuencias anti-CD38 son el lado del Fab, puede usarse cualquier secuencia de scFv anti-CD3 de las Figuras, entre las que se incluyen, en particular H1.30_L1.47 anti-CD3,
15 H1.32_L1.47 anti-CD3, H1.89_L1.47 anti-CD3, H1.90_L1.47 anti-CD3, H1.33_L1.47 anti-CD3 y H1.31_L1.47 anti-CD3, unidas como el lado de scFv de los esqueletos mostrados en la Figura 162.

 La presente invención proporciona formatos de abridor de botella con dominios de unión al antígeno CD20 en los que las
20 secuencias anti-CD20 son como se muestran en las Figuras. Como se ha indicado anteriormente, cada secuencia de vh y vl anti-CD20 puede ser el lado de Fab o el lado de scFv, y puede unirse como uno de los dominios de unión a antígeno de un formato de abridor de botella, incluyendo los de la Figura 162. Cuando las secuencias anti-
25 CD20 son el lado del Fab, puede usarse cualquier secuencia de scFv

anti-CD3 de las Figuras, entre las que se incluyen, en particular H1.30_L1.47 anti-CD3, H1.32_L1.47 anti-CD3, H1.89_L1.47 anti-CD3, H1.90_L1.47 anti-CD3, H1.33_L1.47 anti-CD3 y H1.31_L1.47 anti-CD3, unidas como el lado de scFv de los esqueletos mostrados en la

5 Figura 162.

La presente invención proporciona formatos de abridor de botella con dominios de unión al antígeno CD123 en los que las secuencias anti-CD123 son como se muestran en las Figuras. Como se ha indicado anteriormente, cada secuencia de vh y vl anti-CD123

10 puede ser el lado de Fab o el lado de scFv, y puede unirse como uno de los dominios de unión a antígeno de un formato de abridor de botella, incluyendo los de la Figura 162. Cuando las secuencias anti-CD123 son el lado del Fab, puede usarse cualquier secuencia de scFv anti-CD3 de las Figuras, entre las que se incluyen, en particular

15 H1.30_L1.47 anti-CD3, H1.32_L1.47 anti-CD3, H1.89_L1.47 anti-CD3, H1.90_L1.47 anti-CD3, H1.33_L1.47 anti-CD3 y H1.31_L1.47 anti-CD3, unidas como el lado de scFv de los esqueletos mostrados en la Figura 162.

FORMATO MAB-FV

20 Un almacén heterodimérico que encuentra utilidad particular en la presente invención es el formato mAb-Fv mostrado en la Figura 1. En esta realización, el formato se basa en el uso de una unión C-terminal de un dominio pesado variable “extra” a un monómero y la unión C-terminal de un dominio ligero variable “extra” al otro

25 monómero, formándose así un tercer dominio de unión a antígeno, en

donde las partes Fab de los dos monómeros se unen a un TTA y el dominio de scFv “extra” se une a CD3.

En esta realización, el primer monómero comprende una primera cadena pesada, que comprende un primer dominio pesado variable y un primer dominio pesado constante que comprende un
5 primer dominio Fc, con un primer dominio ligero variable unido covalentemente al extremo C del primer dominio Fc usando un enlazador de dominios (vh1-CH1-bisagra-CH2-CH3-[enlazador opcional]-vl2). El segundo monómero comprende un segundo dominio
10 pesado variable del segundo dominio pesado constante que comprende un segundo dominio Fc, y un tercer dominio pesado variable unido covalentemente al extremo C del segundo dominio Fc usando un enlazador de dominios (vj1-CH1-bisagra-CH2-CH3-[enlazador opcional]-vh2. Los dos dominios variables unidos en el
15 extremo C constituyen un scFv que se une a CD3 (ya que es menos preferido que haya unión bivalente a CD3). Esta realización utiliza además una cadena ligera común que comprende un dominio ligero variable y un dominio ligero constante, que se asocia con las cadenas pesadas para formar dos Fab idénticos que se unen a un
20 TTA. Como ocurre con muchas de las realizaciones del presente documento, estas construcciones incluyen variantes de sesgo, variantes de pl, variantes de ablación, variantes de Fc adicionales, etc. según se desee y como se describe en el presente documento.

La presente invención proporciona formatos de mAb-Fv en los que las secuencias anti-scFv de CD3 son como se muestran en la Figura 2 a la Figura 7 y en la Figura 68.

La presente invención proporciona formatos de mAb-Fv en donde las secuencias anti-CD38 son como se muestran en las Figuras 8 a 10.

La presente invención proporciona formatos de mAb-Fv con dominios de unión al antígeno CD20 en los que las secuencias anti-CD20 son como se muestran en las Figuras.

La presente invención proporciona formatos de mAb-Fv con dominios de unión al antígeno CD19 en los que las secuencias anti-CD19 son como se muestran en las Figuras.

La presente invención proporciona formatos de mAb-Fv con dominios de unión al antígeno CD123 en los que las secuencias anti-CD123 son como se muestran en las Figuras.

La presente invención proporciona formatos de mAb-Fv que comprenden variantes de ablación como se muestra en la Figura 31.

La presente invención proporciona formatos de mAb-Fv que comprenden variantes de sesgo como se muestra en las Figuras 29 y 34.

MAB-SCFV

Un armazón heterodimérico que encuentra utilidad particular en la presente invención es el formato mAb-scFv mostrado en la Figura 1. En esta realización, el formato se basa en el uso de una unión C-terminal de un scFv a uno de los monómeros, formándose así un

tercer dominio de unión a antígeno, en donde las partes Fab de los dos monómeros se unen a un TTA y el dominio scFv “extra” se une a CD3. De esta manera, el primer monómero comprende una primera cadena pesada (que comprende un dominio pesado variable y un dominio constante), con un scFv unido covalentemente al extremo C que comprende un dominio ligero variable de scFv, un enlazador de scFv y un dominio pesado variable de scFv en cualquier orientación (vh1-CH1-bisagra-CH2-CH3-[enlazador opcional]-vh2-enlazador de scFv-vl2 o vh1-CH1-bisagra-CH2-CH3-[enlazador opcional]-vl2-enlazador de scFv-vh2). Esta realización utiliza además una cadena ligera común que comprende un dominio ligero variable y un dominio ligero constante, que se asocia con las cadenas pesadas para formar dos Fab idénticos que se unen a un TTA. Como ocurre con muchas de las realizaciones del presente documento, estas construcciones incluyen variantes de sesgo, variantes de pl, variantes de ablación, variantes de Fc adicionales, etc. según se desee y como se describe en el presente documento.

La presente invención proporciona formatos de mAb-Fv en los que las secuencias anti-scFv de CD3 son como se muestran en la Figura 2 a la Figura 7 y en la Figura 68.

La presente invención proporciona formatos de mAb-Fv en donde las secuencias anti-CD38 son como se muestran en las Figuras 8 a 10.

La presente invención proporciona formatos de mAb-Fv con dominios de unión al antígeno CD20 en los que las secuencias anti-CD20 son como se muestran en las Figuras.

5 La presente invención proporciona formatos de mAb-Fv con dominios de unión al antígeno CD19 en los que las secuencias anti-CD19 son como se muestran en las Figuras.

La presente invención proporciona formatos de mAb-Fv con dominios de unión al antígeno CD123 en los que las secuencias anti-CD123 son como se muestran en las Figuras.

10 La presente invención proporciona formatos de mAb-Fv que comprenden variantes de ablación como se muestra en la Figura 31.

La presente invención proporciona formatos de mAb-Fv que comprenden variantes de sesgo como se muestra en las Figuras 29 y 34.

15 **CENTRAL SCFV**

Un almacén heterodimérico que encuentra utilidad particular en la presente invención es el formato Central-scFv mostrado en la Figura 1. En esta realización, el formato se basa en el uso de un dominio scFv insertado formándose de esta manera un tercer dominio de unión a antígeno, en donde las partes Fab de los dos monómeros se unen a un TTA y el dominio scFv “extra” se une a CD3. El dominio scFv se inserta entre el dominio Fc y la región CH1-Fv de uno de los monómeros, proporcionando así un tercer dominio de unión a antígeno.

En esta realización, un monómero comprende una primera cadena pesada que comprende un primer dominio pesado variable, un dominio CH1 (y opcionalmente bisagra) y un dominio Fc, con un scFv que comprende un dominio ligero variable de scFv, un
5 enlazador de scFv y un dominio pesado variable de scFv. El scFv se une covalentemente entre el extremo C del dominio CH1 del dominio constante pesado y el extremo N del primer dominio Fc usando enlazadores de dominio opcionales (vh1-CH1-[enlazador opcional]-vh2-enlazador de scFv-vl2-[enlazador opcional que incluye la
10 bisagra]-CH2-CH3, o la orientación opuesta para el scFv, vh1-CH1-[enlazador opcional]-vl2-enlazador de scFv-vh2-[enlazador opcional que incluye la bisagra]-CH2-CH3). El otro monómero es un lado de Fab convencional. Esta realización utiliza además una cadena ligera común que comprende un dominio ligero variable y un dominio ligero
15 constante, que se asocia con las cadenas pesadas para formar dos Fab idénticos que se unen a un TTA. Como ocurre con muchas de las realizaciones del presente documento, estas construcciones incluyen variantes de sesgo, variantes de pl, variantes de ablación, variantes de Fc adicionales, etc. según se desee y como se describe en el
20 presente documento.

La presente invención proporciona formatos Central-scFv en los que las secuencias anti-scFv de CD3 son como se muestran en la Figura 2 a la Figura 7 y en la Figura 68.

La presente invención proporciona formatos Central-scFv en los que las secuencias anti-CD38 son como se muestran en las Figuras 8 a 10.

La presente invención proporciona formatos Central-scFv con dominios de unión al antígeno CD20 en los que las secuencias anti-CD20 son como se muestran en las Figuras.

La presente invención proporciona formatos Central-scFv con dominios de unión al antígeno CD19 en los que las secuencias anti-CD19 son como se muestran en las Figuras.

La presente invención proporciona formatos Central-scFv con dominios de unión al antígeno CD123 en los que las secuencias anti-CD123 son como se muestran en las Figuras.

La presente invención proporciona formatos Central-scFv que comprenden variantes de ablación como se muestra en la Figura 31.

La presente invención proporciona formatos Central-scFv que comprenden variantes de sesgo como se muestra en las Figuras 29 y 34.

FORMATO CENTRAL-FV

Un armazón heterodimérico que encuentra utilidad particular en la presente invención es el formato Central-Fv mostrado en la Figura 1. En esta realización, el formato se basa en el uso de un dominio scFv insertado formándose de esta manera un tercer dominio de unión a antígeno, en donde las partes Fab de los dos monómeros se unen a un TTA y el dominio scFv “extra” se une a CD3. El dominio scFv se inserta entre el dominio Fc y la región CH1-Fv de los

monómeros, proporcionando así un tercer dominio de unión a antígeno, en donde cada monómero contiene un componente del scFv (por ejemplo, un monómero comprende un dominio pesado variable y el otro un dominio ligero variable).

5 En esta realización, un monómero comprende una primera cadena pesada que comprende un primer dominio pesado variable, un dominio CH1, y un dominio Fc, y un dominio ligero variable adicional. El dominio ligero está unido covalentemente entre el extremo C del dominio CH1 del dominio constante pesado y el
10 extremo N del primer dominio Fc usando enlazadores de dominios (vh1-CH1-[enlazador opcional]-vl2-bisagra-CH2-CH3). El otro monómero comprende una primera cadena pesada que comprende un primer dominio pesado variable, un dominio CH1 y dominio Fc, y un dominio pesado variable adicional (vh1-CH1-[enlazador opcional]-
15 vh2-bisagra-CH2-CH3). El dominio ligero está unido covalentemente entre el extremo C del dominio CH1 del dominio constante pesado y el extremo N del primer dominio Fc usando enlazadores de dominios.

 Esta realización utiliza además una cadena ligera común que comprende un dominio ligero variable y un dominio ligero constante,
20 que se asocia con las cadenas pesadas para formar dos Fab idénticos que se unen a un TTA. Como ocurre con muchas de las realizaciones del presente documento, estas construcciones incluyen variantes de sesgo, variantes de pl, variantes de ablación, variantes de Fc adicionales, etc. según se desee y como se describe en el
25 presente documento.

La presente invención proporciona formatos Central-Fv en los que las secuencias de scFv anti-CD3 son como se muestran en la Figura 2 a la Figura 7 y en la Figura 68.

La presente invención proporciona formatos Central-Fv en los que las secuencias anti-CD38 son como se muestran en las Figuras 8 a 10.

La presente invención proporciona formatos Central-Fv con dominios de unión al antígeno CD20 en los que las secuencias anti-CD20 son como se muestran en las Figuras.

La presente invención proporciona formatos Central-Fv con dominios de unión al antígeno CD19 en los que las secuencias anti-CD19 son como se muestran en las Figuras.

La presente invención proporciona formatos de mAb-Fv con dominios de unión al antígeno CD123 en los que las secuencias anti-CD123 son como se muestran en las Figuras.

La presente invención proporciona formatos Central-Fv que comprenden variantes de ablación como se muestra en la Figura 31.

La presente invención proporciona formatos Central-Fv que comprenden variantes de sesgo como se muestra en las Figuras 29 y 34.

UN CENTRAL-SCFV ARMADO

Un armazón heterodimérico que encuentra utilidad particular en la presente invención es un formato central-scFv armado mostrado en la Figura 1. En esta realización, un monómero comprende solo un dominio Fc, mientras que el otro monómero usa un dominio scFv

insertado formando así el segundo dominio de unión a antígeno. En este formato, la parte Fab se une a un TTA y el scFv se une a CD3 o viceversa. El dominio scFv se inserta entre el dominio Fc y la región CH1-Fv de uno de los monómeros.

5 En esta realización, un monómero comprende una primera cadena pesada que comprende un primer dominio pesado variable, un dominio CH1 y un dominio Fc, con un scFv que comprende un dominio ligero variable de scFv, un enlazador de scFv y un dominio pesado variable de scFv. El scFv está unido covalentemente entre el
10 extremo C del dominio CH1 del dominio constante pesado y el extremo N del primer dominio Fc usando enlazadores de dominios. El segundo monómero comprende un dominio Fc. Esta realización utiliza además una cadena ligera que comprende un dominio ligero variable y un dominio ligero constante, que se asocia con la cadena
15 pesada para formar un Fab. Como ocurre con muchas de las realizaciones del presente documento, estas construcciones incluyen variantes de sesgo, variantes de pl, variantes de ablación, variantes de Fc adicionales, etc. según se desee y como se describe en el presente documento.

20 La presente invención proporciona formatos central-scFv de un brazo en los que las secuencias de scFv anti-CD3 son como se muestran en la Figura 2 a la Figura 7 y en la Figura 68.

 La presente invención proporciona formatos central-scFv de un brazo en los que las secuencias anti-CD38 son como se muestran en
25 las Figuras 8 a 10.

La presente invención proporciona formatos central-scFv de un brazo con dominios de unión al antígeno CD20 en los que las secuencias anti-CD20 son como se muestran en las Figuras.

5 La presente invención proporciona formatos central-scFv de un brazo con dominios de unión al antígeno CD19 en los que las secuencias anti-CD19 son como se muestran en las Figuras.

La presente invención proporciona formatos central-scFv de un brazo con dominios de unión al antígeno CD123 en los que las secuencias anti-CD123 son como se muestran en las Figuras.

10 La presente invención proporciona formatos central-scFv de un brazo que comprenden variantes de ablación como se muestra en la Figura 31.

La presente invención proporciona formatos central-scFv de un brazo que comprenden variantes de sesgo como se muestra en las
15 Figuras 29 y 34.

FORMATOS SCFV DOBLES

La presente invención también proporciona formatos scFv dobles como se muestra en la técnica y se muestra en la Figura 1.

20 La presente invención proporciona formatos de scFv dobles en los que las secuencias de scFv anti-CD3 son como se muestran en la Figura 2 a la Figura 7 y en la Figura 68.

La presente invención proporciona formatos de scFv dobles en los que las secuencias anti-CD38 son como se muestran en las Figuras 8 a 10.

La presente invención proporciona formatos de scFv dobles con dominios de unión al antígeno CD20 en los que las secuencias anti-CD20 son como se muestran en las Figuras.

5 La presente invención proporciona formatos de scFv dobles con dominios de unión al antígeno CD19 en los que las secuencias anti-CD19 son como se muestran en las Figuras.

La presente invención proporciona formatos de scFv dobles con dominios de unión al antígeno CD123 en los que las secuencias anti-CD123 son como se muestran en las Figuras.

10 La presente invención proporciona formatos de scFv dobles que comprenden variantes de ablación como se muestran en la Figura 31.

La presente invención proporciona formatos de scFv dobles que comprenden variantes de sesgo como se muestra en las Figuras 29 y 34.

15 La presente invención proporciona formatos de scFv dobles que comprenden variantes de pl y/o enlazadores de scFv cargados (en general, un monómero cualquiera comprende Q295E/N384D/Q418E/N481D y el otro un enlazador de scFv cargado positivamente, o ambos comprenden enlazadores de scFv cargados
20 positivamente).

ANTÍGENOS DIANA

Los anticuerpos biespecíficos de la invención tienen dos dominios de unión al antígeno diferentes: uno que se une a CD3 (generalmente de forma monovalente) y otro que se une a un
25 antígeno tumoral diana (algunas veces denominado en el presente

documento “TTA”). Los antígenos tumorales diana adecuados incluyen, pero sin limitación, CD20, CD38, CD123; ROR1, ROR2, BCMA; PSMA; SSTR2; SSTR5, CD19, FLT3, CD33, PSCA, ADAM 17, CEA, Her2, EGFR, EGFR-vIII, CD30, FOLR1, GD-2, CA-IX, Trop-2, CD70, CD38, mesotelina, EphA2, CD22, CD79b, GPNMB, CD56, CD138, CD52, CD74, CD30, CD123, RON, ERBB2, y EGFR.

El formato “triple F” es particularmente beneficioso para dirigirse a dos (o más) antígenos distintos. (Como se indica en el presente documento, esta dirección puede ser cualquier combinación de unión monovalente y divalente, dependiendo del formato). De esta manera, las inmunoglobulinas del presente documento preferentemente se acoplan conjuntamente a dos antígenos distintos. La especificidad de cada monómero puede seleccionarse de las listas presentadas en el presente documento. En la Figura 1 se muestran formatos biespecíficos útiles adicionales para uso con un dominio de unión anti-CD3.

Son aplicaciones adecuadas particulares de los anticuerpos heterodiméricos del presente documento pares co-diana para los que es beneficioso o crítico que cada antígeno diana se acople de forma monovalente. Dichos antígenos pueden ser, por ejemplo, receptores inmunitarios que se activan tras la formación de complejos inmunitarios. La activación celular de muchos receptores inmunitarios se produce solo por reticulación, lo que se consigue típicamente por complejos inmunitarios anticuerpo/antígeno, o mediante el acoplamiento de células efectoras a células diana. Para

algunos receptores inmunitarios, por ejemplo, el receptor de señalización CD3 en células T, la activación es crítica únicamente tras el acoplamiento con la diana co-acoplada, ya que la reticulación no específica en una situación clínica puede inducir una tormenta de

5 citocinas y toxicidad. Desde el punto de vista terapéutico, mediante el acoplamiento de dichos antígenos de forma monovalente en lugar de en forma multivalente, usando las inmunoglobulinas del presente documento, dicha activación se produce solo en respuesta a la reticulación solo en el microentorno del antígeno diana primario. La

10 capacidad de dirigirse a dos antígenos diferentes con diferentes valencias es un aspecto nuevo y útil de la presente invención. Los ejemplos de antígenos diana para los que puede ser terapéuticamente beneficioso o necesario el co-acoplamiento de forma monovalente incluyen, pero sin limitación, receptores de

15 activación inmunitaria tales como CD3, FcγR, receptores de tipo toll (TLR) tales como TLR4 y TLR9, citocinas, quimiocinas, receptores de citocinas y receptores de quimiocinas. En muchas realizaciones, uno de los sitios de unión a antígeno se une a CD3 y en algunas realizaciones es el monómero que contiene scFv.

20 Prácticamente cualquier antígeno puede fijarse como diana por las inmunoglobulinas del presente documento, incluyendo pero sin limitación, proteínas, subunidades, dominios, motivos y/o epítomos que pertenecen a la siguiente lista de antígenos diana, que incluye tanto factores solubles tales como citocinas como factores unidos a

25 la membrana, incluyendo receptores transmembrana: 17-1A, 4-1BB,

4Dc, 6-ceto-PGF1a, 8-iso-PGF2a, 8-oxo-dG, A1 Receptor de Adenosina, A33, ACE, ACE-2, Activina, Activina A, Activina AB, Activina B, Activina C, Activina RIA, Activina RIA ALK-2, Activina RIB ALK-4, Activina RIIA, Activina RIIB, ADAM, ADAM10, ADAM12, ADAM15, ADAM17/TACE, ADAM8, ADAM9, ADAMTS, ADAMTS4, ADAMTS5, Adresinas, aFGF, ALCAM, ALK, ALK-1, ALK-7, alfa-1-antitripsina, antagonista alfa-V/beta-1, ANG, Ang, APAF-1, APE, APJ, APP, APRIL, AR, ARC, ART, Artemina, anti-Id, ASPARTIC, Factor natriurético auricular, integrina av/b3, Axl, b2M, B7-1, B7-2, B7-H, Estimulador de linfocitos B (BlyS), BACE, BACE-1, Bad, BAFF, BAFF-R, Bag-1, BAK, Bax, BCA-1, BCAM, Bcl, BCMA, BDNF, b-ECGF, bFGF, BID, Bik, BIM, BLC, BL-CAM, BLK, BMP, BMP-2 BMP-2a, BMP-3 Osteogenina, BMP-4 BMP-2b, BMP-5, BMP-6 Vgr-1, BMP-7 (OP-1), BMP-8 (BMP-8a, OP-2), BMPR, BMPR-IA (ALK-3), BMPR-IB (ALK-6), BRK-2, RPK-1, BMPR-II (BRK-3), BMPs, b-NGF, BOK, Bombesina, Factor neurotrófico derivado de hueso, BPDE, BPDE-DNA, BTC, factor del complemento 3 (C3), C3a, C4, C5, C5a, C10, CA125, CAD-8, Calcitonina, AMPc, antígeno carcinoembrionario(CEA), antígeno asociado a carcinoma, Catepsina A, Catepsina B, Catepsina C/DPPI, Catepsina D, Catepsina E, Catepsina H, Catepsina L, Catepsina O, Catepsina S, Catepsina V, Catepsina X/Z/P, CBL, CCI, CCK2, CCL, CCL1, CCL11, CCL12, CCL13, CCL14, CCL15, CCL16, CCL17, CCL18, CCL19, CCL2, CCL20, CCL21, CCL22, CCL23, CCL24, CCL25, CCL26, CCL27, CCL28, CCL3, CCL4, CCL5, CCL6, CCL7, CCL8, CCL9/10, CCR,

CCR1, CCR10, CCR10, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CD1, CD2, CD3, CD3E, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8, CD10, CD11a, CD11b, CD11c, CD13, CD14, CD15, CD16, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD27L, CD28, CD29, CD30, CD30L, CD32, CD33 (p67 proteins), CD34, CD38, CD40, CD40L, CD44, CD45, CD46, CD49a, CD52, CD54, CD55, CD56, CD61, CD64, CD66e, CD74, CD80 (B7-1), CD89, CD95, CD123, CD137, CD138, CD140a, CD146, CD147, CD148, CD152, CD164, CEACAM5, CFTR, cGMP, CINC, toxina de Clostridium botulinum, toxina de Clostridium perfringens, CKb8-1, CLC, CMV, CMV UL, CNTF, CNTN-1, COX, C-Ret, CRG-2, CT-1, CTACK, CTGF, CTLA-4, CX3CL1, CX3CR1, CXCL, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL4, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCL14, CXCL15, CXCL16, CXCR, CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CXCR6, antígeno asociado a tumor de citoqueratina, DAN, DCC, DcR3, DC-SIGN, factor de aceleración de la Degradación, des(1-3)-IGF-I (IGF-1 de cerebro), Dhh, digoxina, DNAM-1, Dnasa, Dpp, DPPIV/CD26, Dtk, ECAD, EDA, EDA-A1, EDA-A2, EDAR, EGF, EGFR (ErbB-1), EMA, EMMPRIN, ENA, receptor de endotelina, Enkefalinas, eNOS, Eot, eotaxina1, EpCAM, Efrina B2/EphB4, EPO, ERCC, E-selectina, ET-1, Factor IIa, Factor VII, Factor VIIIc, Factor IX, la proteína de activación de fibroblastos (FAP), Fas, FcR1, FEN-1, Ferritina, FGF, FGF-19, FGF-2, FGF3, FGF-8, FGFR, FGFR-3, Fibrina, FL, FLIP, Flt-3, Flt-4, hormona estimuladora del Folículo, Fractalquina, FZD1, FZD2, FZD3, FZD4, FZD5, FZD6, FZD7, FZD8, FZD9, FZD10, G250,

Gas 6, GCP-2, GCSF, GD2, GD3, GDF, GDF-1, GDF-3 (Vgr-2), GDF-5 (BMP-14, CDMP-1), GDF-6 (BMP-13, CDMP-2), GDF-7 (BMP-12, CDMP-3), GDF-8 (Miostatina), GDF-9, GDF-15 (MIC-1), GDNF, GDNF, GFAP, GFRa-1, GFR-alfa1, GFR-alfa2, GFR-alfa3, GTR, Glucagón, Glut 4, glicoproteína IIb/IIIa (GP IIb/IIIa), GM-CSF, gp130, gp72, GRO, factor de liberación de hormona de crecimiento Hapteno (NP-cap o NIP-cap), HB-EGF, HCC, glicoproteína de la envuelta de gB de HCMV, HCMV) glicoproteína de la envuelta de gH, UL de HCMV, factor de crecimiento Hemopoyético (HGF), gp120 de Hep B, heparanasa, Her2, Her2/neu (ErbB-2), Her3 (ErbB-3), Her4 (ErbB-4), glicoproteína gB del virus del herpes simple (HSV), glicoproteína gD de HSV, HGFA, antígeno asociado a melanoma de alto peso molecular (HMW-MAA), gp120 de HIV, bucle V3 de gp 120 de HIV IIIB, HLA, HLA-DR, HM1.24, HMFG PEM, HRG, Hrk, miosina cardiaca humana, citomegalovirus humano (HCMV), hormona de crecimiento humana (HGH), HVEM, I-309, IAP, ICAM, ICAM-1, ICAM-3, ICE, ICOS, IFNg, Ig, receptor de IgA, IgE, IGF, proteínas de unión a IGF, IGF-1R, IGFBP, IGF-I, IGF-II, IL, IL-1, IL-1R, IL-2, IL-2R, IL-4, IL-4R, IL-5, IL-5R, IL-6, IL-6R, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-18, IL-18R, IL-23, interferón (INF)-alfa, INF-beta, INF-gamma, Inhibina, iNOS, cadena A de Insulina, cadena B de Insulina, factor de crecimiento similar a Insulina 1, integrina alfa2, integrina alfa3, integrina alfa4, integrina alfa4/beta1, integrina alfa4/beta7, integrina alfa5 (alfaV), integrina alfa5/beta1, integrina alfa5/beta3, integrina alfa6, integrina beta1, integrina beta2, interferón gamma, IP-10, I-

TAC, JE, Calicreína 2, Calicreína 5, Calicreína 6,, Calicreína 11, Calicreína 12, Calicreína 14, Calicreína 15, Calicreína L1, Calicreína L2, Calicreína L3, Calicreína L4, KC, KDR, Factor de Crecimiento de Queratinocitos (KGF), laminina 5, LAMP, LAP, LAP (TGF- 1), TGF-1

5 Latente, TGF-1 bp1 Latente, LBP, LDGF, LECT2, Lefty, antígeno Y de Lewis, antígeno relacionado con Y de Lewis, LFA-1, LFA-3, Lfo, LIF, LIGHT, lipoproteínas, LIX, LKN, Lptn, L-Selectina, LT-a, LT-b, LTB4, LTBP-1, Surfactante pulmonar, hormona Luteinizante, Receptor Beta de Linfotoxina, Mac-1, MAdCAM, MAG, MAP2, MARC,

10 MCAM, MCAM, MCK-2, MCP, M-CSF, MDC, Mer, METALLOPROTEASES, receptor de MGDF, MGMT, MHC (HLA-DR), MIF, MIG, MIP, MIP-1-alfa, MK, MMAC1, MMP, MMP-1, MMP-10, MMP-11, MMP-12, MMP-13, MMP-14, MMP-15, MMP-2, MMP-24, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MPIF, Mpo, MSK, MSP, mucina

15 (Muc1), MUC18, sustancia inhibidora Muellieriana, Mug, MuSK, NAIP, NAP, NCAD, N-Cadherina, NCA 90, NCAM, NCAM, Neprilisina, Neurotrofina-3,-4 o -6, Neurturina, factor de crecimiento Neuronal (NGF), NGFR, NGF-beta, nNOS, NO, NOS, Npn, NRG-3, NT, NTN, OB, OGG1, OPG, OPN, OSM, OX40L, OX40R, p150, p95, PADPr,

20 hormona Paratiroidea, PARC, PARP, PBR, PBSF, PCAD, P-Cadherina, PCNA, PDGF, PDGF, PDK-1, PECAM, PEM, PF4, PGE, PGF, PGI2, PGJ2, PIN, PLA2, fosfatasa alcalina placentaria (PLAP), PIGF, PLP, PP14, Proinsulina, Prorelaxina, Proteína C, PS, PSA, PSCA, antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), PTEN,

25 PTHrp, Ptk, PTN, R51, RANK, RANKL, RANTES, RANTES, cadena A

de Relaxina, cadena B de Relaxina, renina, virus sincitial respiratorio (RSV) F, RSV Fgp, Ret, factores Reumatoides, RLIP76, RPA2, RSK, S100, SCF/KL, SDF-1, SERINE, albúmina Sérica, sFRP-3, Shh, SIGIRR, SK-1, SLAM, SLPI, SMAC, SMDF, SMOH, SOD, SPARC, Stat, STEAP, STEAP-II, TACE, TACI, TAG-72 (glicoproteína-72 asociada a tumores), TARC, TCA-3, receptores de células T (por ejemplo, receptor alfa/beta de células T), TdT, TECK, TEM1, TEM5, TEM7, TEM8, TERT, fosfatasa alcalina de tipo PLAP testicular, Tfr, TGF, TGF-alfa, TGF-beta, TGF-beta Pan Específico, TGF-beta RI (ALK-5), TGF-beta RII, TGF-beta RIIf, TGF-beta RIII, TGF-beta1, TGF-beta2, TGF-beta3, TGF-beta4, TGF-beta5, Trombina, Ck-1 de Timo, hormona estimuladora del Tiroides, Tie, TIMP, TIQ, Factor Tisular, TMEFF2, Tmpo, TMPRSS2, TNF, TNF-alfa, TNF-alfa beta, TNF-beta2, TNFc, TNF-RI, TNF-RII, TNFRSF10A (TRAIL R1 Apo-2, DR4), TNFRSF10B (TRAIL R2 DR5, KILLER, TRICK-2A, TRICK-B), TNFRSF10C (TRAIL R3 DcR1, LIT, TRID), TNFRSF10D (TRAIL R4 DcR2, TRUNDD), TNFRSF11A (RANK ODF R, TRANCE R), TNFRSF11B (OPG OCIF, TR1), TNFRSF12 (TWEAK R FN14), TNFRSF13B (TACI), TNFRSF13C (BAFF R), TNFRSF14 (HVEM ATAR, HveA, LIGHT R, TR2), TNFRSF16 (NGFR p75NTR), TNFRSF17 (BCMA), TNFRSF18 (GITR AITR), TNFRSF19 (TROY TAJ, TRADE), TNFRSF19L (RELT), TNFRSF1A (TNF RI CD120a, p55-60), TNFRSF1B (TNF RII CD120b, p75-80), TNFRSF26 (TNFRH3), TNFRSF3 (LTbR TNF RIII, TNFC R), TNFRSF4 (OX40 ACT35, TXGP1 R), TNFRSF5 (CD40 p50), TNFRSF6 (Fas Apo-1, APT1, CD95),

TNFRSF6B (DcR3 M68, TR6), TNFRSF7 (CD27), TNFRSF8 (CD30),
TNFRSF9 (4-1BB CD137, ILA), TNFRSF21 (DR6), TNFRSF22
(DcTRAIL R2 TNFRH2), TNFRST23 (DcTRAIL R1 TNFRH1),
TNFRSF25 (DR3 Apo-3, LARD, TR-3, TRAMP, WSL-1), TNFSF10
5 (Ligando TRAIL Apo-2, TL2), TNFSF11 (Ligando TRANCE/RANK ODF,
Ligando OPG), TNFSF12 (Ligando TWEAK Apo-3, Ligando DR3),
TNFSF13 (APRIL TALL2), TNFSF13B (BAFF BLYS, TALL1, THANK,
TNFSF20), TNFSF14 (Ligando LIGHT HVEM), TNFSF15 (TL1A/VEGI),
TNFSF18 (Ligando GITR Ligando AITR, TL6), TNFSF1A (TNF-a
10 Conectina, DIF, TNFSF2), TNFSF1B (TNF-b LTa, TNFSF1), TNFSF3
(LTb TNFC, p33), TNFSF4 (Ligando OX40 gp34, TXGP1), TNFSF5
(Ligando CD40 CD154, gp39, HIGM1, IMD3, TRAP), TNFSF6
(Ligando Fas Ligando Apo-1, Ligando APT1), TNFSF7 (Ligando CD27
CD70), TNFSF8 (Ligando CD30 CD153), TNFSF9 (Ligando 4-1BB
15 Ligando CD137), TP-1, t-PA, Tpo, TRAIL, TRAIL R, TRAIL-R1,
TRAIL-R2, TRANCE, receptor de transferencia, TRF, Trk, TROP-2,
TSG, TSLP, antígeno CA 125 asociado a tumores, antígeno asociado
a tumores que expresa carbohidrato relacionado con Y de Lewis,
TWEAK, TXB2, Ung, uPAR, uPAR-1, Uroquinasa, VCAM, VCAM-1,
20 VECAD, VE-Cadherina, VE-cadherina-2, VEGFR-1 (flt-1), VEGF,
VEGFR, VEGFR-3 (flt-4), VEGI, VIM, antígenos Virales, VLA, VLA-1,
VLA-4, integrina VNR, factor de von Willebrand, WIF-1, WNT1, WNT2,
WNT2B/13, WNT3, WNT3A, WNT4, WNT5A, WNT5B, WNT6, WNT7A,
WNT7B, WNT8A, WNT8B, WNT9A, WNT9A, WNT9B, WNT10A,

WNT10B, WNT11, WNT16, XCL1, XCL2, XCR1, XCR1, XEDAR, XIAP, XPD, y receptores para hormonas y factores de crecimiento.

Los antígenos ejemplares que pueden fijarse como diana específicamente por las inmunoglobulinas de la invención incluyen
5 pero sin limitación: CD20, CD19, Her2, EGFR, EpCAM, CD3, FcγRIIIa (CD16), FcγRIIIa (CD32a), FcγRIIb (CD32b), FcγRI (CD64), receptores de tipo Toll (TLR) tales como TLR4 y TLR9, citocinas tales como IL-2, IL-5, IL-13, IL-12, IL-23 y TNFα y receptores de citocinas tales como IL-2R, quimiocinas, receptores de quimiocinas, factores de
10 crecimiento tales como VEGF y HGF y similares. Para formar los anticuerpos biespecíficos de la invención, pueden prepararse anticuerpos contra cualquier combinación de estos antígenos; es decir, cada uno de estos antígenos puede incluirse o excluirse opcional e independientemente de un anticuerpo biespecífico de
15 acuerdo con la presente invención.

Son combinaciones particularmente preferidas para anticuerpos biespecíficos un dominio de unión a antígeno contra CD3 y un dominio de unión a antígeno seleccionado de un dominio que se une a CD19, CD20, CD38 y CD123, cuyas secuencias se muestran en las
20 Figuras.

ÁCIDOS NUCLEICOS DE LA INVENCION

La invención proporciona además composiciones de ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos biespecíficos de la invención. Como apreciarán los expertos en la materia, las composiciones de
25 ácidos nucleicos dependerán del formato y armazón de la proteína

heterodimérica. De esta manera, por ejemplo, cuando el formato requiere tres secuencias de aminoácidos, tal como para el formato triple F (por ejemplo, un primer monómero de aminoácido que comprende un dominio Fc y un scFv, un segundo monómero de aminoácido que comprende una cadena pesada y una cadena ligera),
5 pueden incorporarse tres secuencias de ácido nucleico en uno o más vectores de expresión para la expresión. De forma similar, en algunos formatos (por ejemplo, formatos scFv dobles tales como se desvela en la Figura 1) solo se necesitan dos ácidos nucleicos; de nuevo, pueden ponerse en uno o dos vectores de expresión.
10

Como se conoce en la técnica, los ácidos nucleicos que codifican los componentes de la invención pueden incorporarse en vectores de expresión como es conocido en la técnica y dependiendo de las células hospedadoras usadas para producir los anticuerpos heterodiméricos de la invención. En general, los ácidos nucleicos se unen operativamente a cualquier número de elementos reguladores (promotores, origen de replicación, marcadores de selección, sitios de unión a ribosomas, inductores, etc.). Los vectores de expresión pueden ser extracromosómicos o vectores de integración.
15

Los ácidos nucleicos y/o vectores de expresión de la invención después se utilizan para transformar cualquier número de tipos diferentes de células hospedadoras como es bien conocido en la técnica, incluyendo células de mamífero, bacterianas, de levadura, de insecto y/o fúngicas, encontrando utilidad las células de mamífero (por ejemplo células CHO) en muchas realizaciones.
20
25

En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos que codifican cada monómero y el ácido nucleico opcional que codifica una cadena ligera, según es aplicable dependiendo del formato, están contenidos cada uno dentro de un solo vector de expresión, generalmente bajo
5 controles de promotor diferentes o el mismo control de promotor. En realizaciones de utilidad particular en la presente invención, cada uno de estos dos o tres ácidos nucleicos está contenido en un vector de expresión diferente. Como se muestra en el presente documento y en el documento 62/025.931, incorporado en el presente documento
10 por referencia, pueden usarse diferentes relaciones de vector para dirigir la formación de heterodímeros. Es decir, sorprendentemente, aunque las proteínas comprenden primer monómero:segundo monómero:cadenas ligeras (en el caso de muchas de las realizaciones del presente documento que tienen tres polipéptidos
15 que comprenden el anticuerpo heterodimérico) en una relación 1:1:2, estas no son las relaciones que proporcionan los mejores resultados. Véase **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..**

Los anticuerpos heterodiméricos de la invención se preparan cultivando células hospedadoras que comprenden el vector o los
20 vectores de expresión como es bien conocido en la técnica. Una vez producidos, se realizan etapas de purificación de anticuerpo tradicionales, incluyendo una etapa de cromatografía de intercambio iónico. Como se analiza en el presente documento, si los pI de los dos monómeros difieren en al menos 0.5 se puede permitir la
25 separación por cromatografía de intercambio iónico o enfoque

isoeléctrico, u otros métodos sensibles al punto isoeléctrico. Es decir, la inclusión de sustituciones de pl que alteren el punto isoeléctrico (pl) de cada monómero de forma que cada monómero tenga un pl diferente y el heterodímero también tenga un pl distinto, facilita de esta manera la purificación isoeléctrica del heterodímero “triple F” (por ejemplo, columnas de intercambio aniónico, columnas de intercambio catiónico). Estas sustituciones también ayudan en la determinación y supervisión de cualquier homodímero scFv-Fc doble y mAb después de la purificación (por ejemplo, geles IEF, cIEF y columnas IEX analíticas).

TRATAMIENTOS

Una vez fabricadas, las composiciones de la invención encuentran utilidad en varias aplicaciones. CD20, CD38 y CD123 están sin regular todos ellos en muchas malignidades hematopoyéticas y en líneas celulares derivadas de diversas malignidades hematopoyéticas, por consiguiente, los anticuerpos heterodiméricos de la invención encuentran utilidad en el tratamiento de cánceres incluyendo, pero sin limitación, todos los linfomas de células B y leucemias, incluyendo pero sin limitación el linfoma no Hodgkin (NHL), linfoma de Burkitt (BL), mieloma múltiple (MM), leucemia linfocítica crónica B (B-CLL), leucemia linfocítica aguda B y T (ALL), linfoma de células T (TCL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia de células pilosas (HCL), Linfoma de Hodgkin (HL), leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma no Hodgkin y leucemia mieloide crónica (CML).

Por consiguiente, las composiciones heterodiméricas de la invención encuentran utilidad en el tratamiento de estos cánceres.

COMPOSICIONES DE ANTICUERPO PARA ADMINISTRACIÓN

IN VIVO

5 Las formulaciones de los anticuerpos usados de acuerdo con la presente invención se preparan para el almacenamiento mezclando un anticuerpo que tiene el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences 16^a edición, Osol,
10 A. Ed. [1980]), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables son no tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y
15 metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos tales como metilo o propiol parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (de menos
20 de aproximadamente 10 restos) proteínas tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes
25 quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol,

trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sal tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos Zn-proteína) y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

5 La formulación del presente documento también puede contener más de un compuesto activo cuando sea necesario para la indicación particular a tratar, preferentemente los que tienen actividades complementarias que no afectan adversamente entre sí. Por ejemplo, puede ser deseable proporcionar anticuerpos con otras
10 especificidades. Como alternativa, o además, la composición puede comprender un agente citotóxico, citocina, agente inhibidor del crecimiento y/o antagonista de molécula pequeña. Dichas moléculas están presentes convenientemente en combinación en cantidades que son eficaces para el fin deseado.

15 Los principios activos también pueden estar atrapados en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de liberación de
20 fármaco coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se desvelan en Remington's Pharmaceutical Sciences 16^a edición, Osol, A. Ed. (1980).

Las formulaciones a usar para la administración *in vivo* deben ser estériles o casi estériles. Esto se consigue fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles.

Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Los
5 ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos que contienen el anticuerpo, estando dichas matrices en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres
10 hidrogeles (por ejemplo poli(2-hidroxietil-metacrilato) o poli(vinilalcohol)), polilactidas (Patente de Estados Unidos n.º 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma. etil-L-glutamato, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como LUPRON
15 DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Aunque polímeros tales como el etileno-acetato de vinilo y el ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan
20 proteínas durante periodos de tiempo más cortos.

Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el cuerpo durante un largo periodo, pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de la exposición a la humedad a 37 °C, dando como resultado una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en
25 inmunogenicidad. Pueden aconsejarse estrategias racionales para la

estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlaces S--S intermoleculares a través de intercambio tio-disulfuro, la estabilización puede conseguirse modificando restos sulfhidrilo, liofilizando soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos apropiados y desarrollando composiciones de matriz poliméricas específicas.

MODALIDADES DE ADMINISTRACIÓN

Los anticuerpos y agentes quimioterapéuticos de la invención se administran a un sujeto, de acuerdo con métodos conocidos, tales como administración intravenosa como una embolada o mediante infusión continua durante un periodo de tiempo, por vía intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica o inhalación. Se prefiere la administración intravenosa subcutánea del anticuerpo.

MODALIDADES DE TRATAMIENTO

En los métodos de la invención, se usa terapia para proporcionar una respuesta terapéutica positiva con respecto a una enfermedad o afección. Por "respuesta terapéutica positiva" se entiende una mejora en la enfermedad o afección y/o una mejora en los síntomas asociados con la enfermedad o afección. Por ejemplo, una respuesta terapéutica positiva se referiría a una o más de las siguientes mejoras en la enfermedad: (1) una reducción en el número de células neoplásicas; (2) un aumento de la muerte de células neoplásicas; (3) inhibición de la supervivencia de células neoplásicas,

(5) inhibición (es decir ralentización en alguna medida, preferentemente detención) del crecimiento tumoral; (6) un aumento de la tasa de supervivencia del paciente; y (7) algún alivio de uno o más síntomas asociados con la enfermedad o afección.

5 Las respuestas terapéuticas positivas en cualquier enfermedad o afección dada pueden determinarse por criterios de respuesta estandarizados específicos para esa enfermedad o afección. La respuesta del tumor puede evaluarse con respecto a cambios en la morfología tumoral (es decir, carga tumoral total, tamaño del tumor y
10 similares) usando técnicas de exploración por imágenes de resonancia magnética (MRI), exploración por imágenes de rayos x, exploración tomográfica computarizada (CT), formación de imágenes de barrido óseo, endoscopia y toma de muestras de biopsias de tumor incluyendo aspiración de médula ósea (BMA) y recuento de
15 células tumorales en la circulación.

Además de estas respuestas terapéuticas positivas, el sujeto que se somete a terapia puede experimentar el efecto beneficioso de una mejora en los síntomas asociados con la enfermedad.

Una mejora en la enfermedad puede caracterizarse como una
20 respuesta completa. Por “respuesta completa” se entiende la ausencia de una enfermedad clínicamente detectable con normalización de cualquier estudio radiográfico previamente anormal, médula ósea y líquido cefalorraquídeo (CSF) o proteína monoclonal anormal en caso de mieloma.

Dicha respuesta puede persistir durante al menos 4 a 8 semanas, o algunas veces de 6 a 8 semanas, después del tratamiento de acuerdo con los métodos de la invención. Como alternativa, una mejoría en la enfermedad puede clasificarse como una respuesta parcial. Por “respuesta parcial” se entiende al menos aproximadamente un 50 % de reducción en toda la carga tumoral mediable (es decir, el número de células malignas presentes en el sujeto o el volumen medido de masas tumorales o la cantidad de proteína monoclonal anormal) en ausencia de nuevas lesiones, que pueden persistir durante 4 a 8 semanas o 6 a 8 semanas.

El tratamiento de acuerdo con la presente invención incluye una “cantidad terapéuticamente eficaz” de los medicamentos usados. Una “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir un resultado terapéutico deseado.

Una cantidad terapéuticamente eficaz puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de enfermedad, edad, sexo y peso del individuo, y la capacidad de los medicamentos de inducir una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo o parte de anticuerpo se compensan por los efectos terapéuticamente beneficiosos.

Una “cantidad terapéuticamente eficaz” para terapia tumoral también puede medirse por su capacidad de estabilizar la progresión de la enfermedad. La capacidad de un compuesto de inhibir el cáncer

puede evaluarse en un sistema modelo animal predictivo de eficacia en tumores humanos.

5 Como alternativa, esta propiedad de una composición puede evaluarse examinando la capacidad del compuesto de inhibir el crecimiento celular o de inducir apoptosis mediante ensayos *in vitro* conocidos por los expertos en la materia. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto terapéutico puede reducir el tamaño tumoral o mejorar de otra manera los síntomas en un sujeto. Un experto habitual en la materia podría determinar dichas
10 cantidades basándose en factores tales como las dimensiones del sujeto, la gravedad de los síntomas del sujeto y la composición particular o vía de administración seleccionada.

Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo una respuesta terapéutica).
15 Por ejemplo, puede administrarse una sola embolada, pueden administrarse varias dosis divididas a lo largo del tiempo o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente según lo indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Las composiciones parenterales pueden formularse en forma de dosificación unitaria
20 para facilitar la administración y uniformidad de la dosificación. Forma de dosificación unitaria como se usa en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada

para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido.

La especificación para las formas de dosificación unitaria de la presente invención se dicta por y es directamente dependiente de (a)
5 las características típicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular a conseguir y (b) las limitaciones intrínsecas en la técnica de la composición de dicho compuesto activo para el tratamiento de sensibilidad en individuos.

Las dosificaciones eficaces y los regímenes de dosificación
10 para los anticuerpos biespecíficos usados en la presente invención dependen de la enfermedad o afección a tratar y pueden determinarse por los expertos en la materia.

Un intervalo ejemplar y no limitante para una cantidad terapéuticamente eficaz y un anticuerpo biespecífico usado en la
15 presente invención es aproximadamente 0.1-100 mg/kg, tal como aproximadamente 0.1-50 mg/kg, por ejemplo aproximadamente 0.1-20 mg/kg, tal como aproximadamente 0.1-10 mg/kg, por ejemplo aproximadamente 0.5, aproximadamente tal como 0.3, aproximadamente 1, o aproximadamente 3 mg/kg. En otra realización,
20 el anticuerpo se administra en una dosis de 1 mg/kg o mayor, tal como una dosis de 1 a 20 mg/kg, por ejemplo una dosis de 5 a 20 mg/kg, por ejemplo una dosis de 8 mg/kg.

Un profesional médico con experiencia habitual en la técnica puede determinar fácilmente y recetar la cantidad eficaz de la
25 composición farmacéutica requerida. Por ejemplo, un médico o

veterinario podría empezar dosis del medicamento empleado en la composición farmacéutica a niveles menores de los requeridos para conseguir el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta que se consiga el efecto deseado.

5 En una realización, el anticuerpo biespecífico se administra por infusión en una dosificación semanal de 10 a 500 mg/kg tal como de 200 a 400 mg/kg. Dicha administración puede repetirse, por ejemplo, de 1 a 8 veces, tal como de 3 a 5 veces. La administración puede realizarse por infusión continua durante un periodo de 2 a 24 horas,
10 tal como de 2 a 12 horas.

 En una realización, el anticuerpo biespecífico se administra por infusión continua lenta durante un periodo prolongado, tal como mayor de 24 horas, si se desea para reducir efectos secundarios incluyendo toxicidad.

15 En una realización, el anticuerpo biespecífico se administra en una dosificación semanal de 250 mg a 2000 mg, tal como por ejemplo 300 mg, 500 mg, 700 mg, 1000 mg, 1500 mg o 2000 mg, durante hasta 8 veces, tal como de 4 a 6 veces. La administración puede realizarse por infusión continua durante un periodo de 2 a 24
20 horas, tal como de 2 a 12 horas. Dicho régimen puede repetirse una o más veces cuando sea necesario, por ejemplo, después de 6 meses o 12 meses. La dosificación puede determinarse o ajustarse midiendo la cantidad de compuesto de la presente invención en la sangre después de la administración, por ejemplo, tomando una

muestra biológica y usando anticuerpos anti-idiotípicos que se dirigen a la región de unión a antígeno del anticuerpo biespecífico.

En una realización adicional, el anticuerpo biespecífico se administra una vez por semana durante 2 a 12 semanas, tal como durante 3 a 10 semanas, tal como durante 4 a 8 semanas.

En una realización, el anticuerpo biespecífico se administra por terapia de mantenimiento, tal como, por ejemplo, una vez por semana durante un periodo de 6 meses o mayor.

En una realización, el anticuerpo biespecífico se administra por un régimen que incluye una infusión de un anticuerpo biespecífico seguida de una infusión de un anticuerpo biespecífico conjugado con un radioisótopo. El régimen puede repetirse, por ejemplo, de 7 a 9 días después.

Como ejemplos no limitantes, el tratamiento de acuerdo con la presente invención puede proporcionarse como una dosificación diaria de un anticuerpo en una cantidad de aproximadamente 0.1-100 mg/kg, tal como 0.5, 0.9, 1.0, 1.1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 mg/kg, por día, en al menos uno de los días 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40, o, como alternativa, al menos una de las semanas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 después del inicio del tratamiento, o cualquier combinación

de los mismos, usando dosis únicas o divididas de cada 24, 12, 8, 6, 4, o 2 horas o cualquier combinación de las mismas.

En algunas realizaciones, la molécula de anticuerpo
bienespecífica se usa en combinación con uno o más agentes
5 terapéuticos adicionales, por ejemplo un agente quimioterapéutico.
Los ejemplos no limitantes de agentes quimioterapéuticos que dañan
el ADN incluyen inhibidores de la topoisomerasa I (por ejemplo,
irinotecán, topotecán, camptotecina y análogos o metabolitos de los
mismos y doxorubicina); inhibidores de la topoisomerasa II (por
10 ejemplo, etopósido, tenipósido y daunorrubicina); agentes alquilantes
(por ejemplo melfalán, clorambucilo, busulfán, tiotepa, ifosfamida,
carmustina, lomustina, semustina, estreptozocina, decarbacina,
metotrexato, mitomicina C y ciclofosfamida); intercalantes de ADN
(por ejemplo, cisplatino, oxaliplatino y carboplatino); intercalantes de
15 ADN y generadores de radicales libres tales como bleomicina; y
miméticos de nucleósidos (por ejemplo 5-fluorouracilo, capecitabina,
gemcitabina, fludarabina, citarabina, mercaptopurina, tioguanina,
pentostatina e hidroxiurea).

Los agentes quimioterapéuticos que interrumpen la replicación
20 celular incluyen: paclitaxel, docetaxel y análogos relacionados;
vincristina, vinblastina y análogos relacionados; talidomida,
lenalidomida y análogos relacionados (por ejemplo CC-5013 y CC-
4047); inhibidores de proteína tirosina quinasa (por ejemplo mesilato
de imatinib y gefitinib); inhibidores de proteasoma (por ejemplo
25 bortezomib); inhibidores de NF- κ B, incluyendo inhibidores de la

quinasa I κ B; anticuerpos que se unen a proteínas sobreexpresadas en cánceres y por lo tanto regulan negativamente la replicación celular (por ejemplo trastuzumab, rituximab, cetuximab y bevacizumab) y otros inhibidores de proteínas o enzimas que se sabe que están regulados positivamente, sobreexpresados o
5 activados en cánceres, cuya inhibición regula negativamente la replicación celular.

En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención pueden usarse antes, junto con o después del tratamiento con
10 Velcade® (bortezomib).

Todas las referencias citadas se incorporan expresamente en el presente documento por referencia en su totalidad.

Aunque anteriormente se han descrito realizaciones particulares de la invención con fines ilustrativos, los expertos en la
15 materia apreciarán que pueden realizarse numerosas variaciones de los detalles sin apartarse de la invención como se describe en las reivindicaciones adjuntas.

EJEMPLOS

A continuación se proporcionan ejemplos para ilustrar la
20 presente invención. No debe considerarse que estos ejemplos limitan la presente invención a ninguna aplicación o teoría de operación particular. Para todas las posiciones de región constante discutidas en la presente invención, la numeración está de acuerdo con el índice EU como en Kabat (Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins
25 of Immunological Interest, 5^a Ed., United States Public Health

Service, National Institutes of Health, Bethesda, incorporada en su totalidad por referencia). Los expertos en la materia de los anticuerpos apreciarán que esta invención consiste en una numeración no secuencial en regiones específicas de una secuencia de inmunoglobulina, que permite una referencia normalizada a posiciones conservadas en familias de inmunoglobulina. Por consiguiente, las posiciones de cualquier inmunoglobulina dada como se define por el índice EU no corresponderá necesariamente a su secuencia secuencial.

En las Publicaciones US 2015/0307629, 2014/0288275 y WO2014/145806, todas ellas incorporadas expresamente por referencia en su totalidad se indica técnicas científicas generales y específicas, y particularmente para las técnicas indicadas en el presente documento.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1: FORMATOS ALTERNATIVOS

Producción de biespecíficos

En las Figuras 1 se muestran viñetas de biespecíficos anti-CD38 x anti-CD3. En la Figura 39 a Figura 43 se indican secuencias de aminoácidos para biespecíficos anti-CD38 x anti-CD3 de formato alternativo. El ADN que codifica las tres cadenas necesarias para la expresión de biespecíficos se generaron por síntesis de genes (Blue Heron Biotechnology, Bothell, Wash.) y se subclonaron usando técnicas de biología molecular convencionales en el vector de expresión pTT5. Se introdujeron sustituciones usando mutagénesis

dirigida (QuikChange, Stratagene, Cedar Creek, Tex.) o síntesis de genes adicionales y subclonación. El ADN se introdujo por transfección en células HEK293E para la expresión y las proteínas resultantes se purificaron de los sobrenadantes usando cromatografía de afinidad en proteína A (GE Healthcare) y cromatografía de intercambio catiónico. En la Figura 35 se muestran los rendimientos después de la purificación por afinidad en proteína A. La purificación por cromatografía de intercambio catiónico se realizó usando una columna HiTrap SP HP (GE Healthcare) con un tampón de lavado/equilibrio de MES 50 mM , pH 6.0 y un tampón de elución de MES 50 mM, pH 6.0 + gradiente lineal de NaCl 1 M (véanse los cromatogramas en la Figura 36).

CITOTOXICIDAD DE CÉLULAS T REDIRIGIDA

Se caracterizaron biespecíficos anti-CD38 x anti-CD3 *in vitro* con respecto a la citotoxicidad de células T redirigida (RTCC) de la línea celular de mieloma RPMI8266 CD38⁺. Se incubaron 10.000 células RPMI8266 durante 24 h con 500.000 PBMC humanas. La RTCC se midió por fluorescencia LDH como se indica (véase la Figura 37).

EJEMPLO 2

CITOTOXICIDAD DE CÉLULAS T REDIRIGIDA

Se caracterizaron biespecíficos Fab-scFv-Fc anti-CD38 x anti-CD3 *in vitro* con respecto a la citotoxicidad de células T redirigida (RTCC) de la línea celular de mieloma RPMI8266 CD38⁺. Se incubaron 40.000 células RPMI8266 durante 96 h con 400.000 PBMC

humanas. La RTCC se midió por citometría de flujo como se indica (véase la Figura 44). También se caracterizaron la expresión de células T CD4+ y CD8+ de CD69, Ki-67 y PI-9 por citometría de flujo y se muestran en la Figura 45.

5 **MODELO EN RATÓN DE ACTIVIDAD ANTITUMORAL**

En cuatro grupos de cinco ratones NOD scid gamma (NSG) se injertaron 5×10^6 células tumorales RPMI8226TrS (mieloma múltiple, que expresa luciferasa) por inyección intravenosa en la vena de la cola el Día 23. El Día 0, en los ratones se injertaron por vía
10 intraperitoneal 10×10^6 PBMC humanas. Después del injerto de PBMC el Día 0, los artículos de ensayo se dosifican semanalmente (Días 0, 7) por inyección intraperitoneal a niveles de dosificación indicados en la Figura 4. El diseño del estudio se resume adicionalmente en la Figura 46. El crecimiento tumoral se controló midiendo el flujo total
15 por ratón usando un sistema de formación de imágenes *in vivo* (IVIS®). Tanto XmAb13551 como XmAb15426 mostraron efectos antitumorales sustanciales (véase la Figura 47 y la Figura 48).

ESTUDIOS EN MONO CINOMOLGUS

A monos cinomolgus se les administró una sola dosis de
20 biespecíficos anti-CD38 x anti-CD3. También se incluyó un control de biespecífico anti-RSV x anti-CD3. Los niveles de dosificación fueron: 20 µg/kg XmAb13551 (n=2), 0.5 mg/kg XmAb15426 (n=3), 3 mg/kg XmAb14702 (n=3), o 3 mg/kg XmAb13245 (control anti-RSV x anti-CD3, n=3) (en 3 estudios independientes). Los biespecíficos anti-
25 CD38 x anti-CD3 redujeron rápidamente las células CD38+ en sangre

periférica(véase la Figura 49). Los biespecíficos anti-CD38 x anti-CD3 dieron como resultado una activación de células T como se mide por expresión de CD69 (véase la Figura 50). También se midieron los niveles en suero de IL-6 (véase la Figura 51). Obsérvese que, en comparación con XmAb13551, XmAb15426 tuvo una mayor duración de reducción de células CD38+ y menores niveles de activación de células T de producción de IL-6.

XmAb15426 y XmAb14702 se ensayaron a dosis únicas de 0.5 mg/kg y 3 mg/kg respectivamente. Ambos anticuerpos se toleraron bien a esas dosis superiores, coherente con los niveles moderados de IL6 observados en suero de los monos tratados. Además, XmAb15426, con afinidad CD3 intermedia, redujo más eficazmente las células CD38+ a 0.5 mg/kg en comparación con el XmAb13551 de alta afinidad original dosificado a 2, 5 o 20 µg/kg. La reducción por XmAb15426 fue más sostenida en comparación con la dosis superior de XmAb13551 en el estudio previo (7 frente a 2 días, respectivamente). Debe destacarse que, aunque la reducción de células diana fue mayor en el caso de XmAb15426, la activación de células T (CD69, CD25 e inducción de PD1) fue mucho menor en los monos tratados con XmAb15426 incluso cuando se la dosis fue 25 veces mayor que el grupo de 20 µg/kg de XmAb13551. XmAb14702, con afinidad muy baja por CD3 tuvo poco efecto sobre las células CD38+ y la activación de células T.

Estos resultados demuestran que la modulación de la activación de células T mediante la atenuación de la afinidad por

CD3 es un método prometedor para mejorar la ventana terapéutica de anticuerpos biespecíficos que se acoplan a las células T. Esta estrategia tiene posibilidad de expandir el conjunto de antígenos susceptibles de fijarse como diana en la inmunoterapia de células T al mejorar la tolerancia y permitir una mayor dosificación para superar el aclaramiento de antígeno con dianas tales como CD38. Los presentes inventores han demostrado que al reducir la afinidad por CD3, XmAb 15426 reduce de forma eficaz las células CD38+ mientras que minimiza los efectos de CRS observados con las dosis comparables de su homólogo de alta afinidad XmAb13551.

EJEMPLO 3

DESARROLLO DE CDR PARA CD123

El punto de partida para el desarrollo de CDR para la proteína CD123 humana de un anticuerpo humanizado Fab fue las regiones ligera y variable del anticuerpo murino 7G3, denominadas en el presente documento "7G3 H0L0", de la ATCC HB-12009. Sin embargo, la humanización inicial (H1_L1; secuencia mostrada en la Figura 136) dio como resultado una pérdida significativa de afinidad (pérdida de afinidad de 5 a 10 veces, como se muestra en las Figuras 156B y C). Esta pérdida de afinidad se debía principalmente a la humanización de la cadena pesada, como se muestra para la construcción H1_L0 (por ejemplo, la primera cadena pesada humanizada con la cadena ligera murina), mostrando la construcción H1_L1 la pérdida completa de 10 veces. Esto fue coherente con la pérdida de 10 veces en la potencia de RTCC (citotoxicidad de células

T redirigida), como se muestra en la Figura 156D, cuando se ensaya frente a células KG1a, que expresan CD123.

Por consiguiente, se realizaron dos vueltas de optimización de la afinidad/estabilización. La primera vuelta ("biblioteca 1" como se muestra en la Figura 157), fue la generación de 108 variantes, entre las que se incluyen LDA, sustituciones de reversión y dirigidas, que se sometieron a exploración de afinidad en un formato Fab (dominio pesado variable humanizado fusionado a CH1 humano de IgG1) en una microtarjeta de CD123, explorándose la estabilidad de las variantes de afinidad neutra y superior por DSF.

Como se muestra en la Figura 158, la T_m de la variante de H1L1 original aumentó en comparación con el H0L0, mostrándose también los resultados de variantes adicionales en el parental H1L1 en la Figura 158.

Después se construyeron variantes de la vuelta 1 en formato de abridor de botella como se indica adicionalmente en el presente documento, usando un scFv contra CD3 y los Fab según se desarrollaron, y posteriormente se ensayaron en un ensayo de unión de KG-1a así como en un ensayo de RTCC como se muestra en la Figura 159. Aunque la primera vuelta de optimización mejoró la afinidad y la eficacia de las variantes, se requería una optimización adicional.

La segunda vuelta, "Vuelta 2", como se muestra en la Figura 160, dio como resultado el retorno de la afinidad de unión a los niveles murinos de H0L0 así como el retorno de la actividad de

RTCC. El mejor variante, XENP14045 tenía mejor afinidad que la primera secuencia de humanización (H1L1; mostrando una mejora de +21 veces con respecto a H1L1), así como un aumento de actividad de dos veces con respecto al anticuerpo murino parental (7G3; H0L0).

5 Debe tenerse en cuenta que XENP13967 es el equivalente de XENP14045 en el lado de CD123; 13967 tiene un scFv de CD3 diferente como se muestra en las secuencias.

La vuelta 2 de optimización también dio como resultado un aumento de estabilidad medido por T_m. La Figura 161 muestra los resultados del ensayo de T_m, con una mejora de +5C de XENP13967 (y de manera correspondiente XENP14045) con respecto a la quimera original (por ejemplo, secuencias murinas ligera y pesada variables) y de +4C en comparación con la variante de H1L1 original. 13967/14045 tiene 11 sustituciones en comparación con la secuencia de H1L1 original). Además, durante la segunda vuelta, se retiró un posible sitio de desamidación (motivo -NS) de la CDR1 de cadena ligera.

EJEMPLO 4

DESARROLLO DE CDR PARA CD20

20 Se exploraron dos Fab anti-CD20 en el contexto del formato biespecífico CD20 x CD3 con respecto a la afinidad de unión y la eficacia. Tanto XENP13677 como XENP13676 están basados en rituximab. La variante 13677 presenta una potencia mejorada significativamente con respecto a la variante 13676, cuya afinidad por CD20 se aproxima a la del anticuerpo parental rituximab. Los dos

25

anticuerpos biespecíficos se dosificaron en un estudio de mono cynomolgus para comparar sus propiedades in vivo. Sin embargo, a causa de la mayor potencia de la variante 13677, se dosificó a una dosis 10 veces menor de 0.03 mg/kg frente a los 0.3 mg/kg dosificados para el 13676 de menor potencia. A estas dosis, los dos anticuerpos redujeron significativamente las células B de mono. Sin embargo, sorprendentemente, el 13677 significativamente más potente realmente mostró una recuperación más rápida de las células B a su dosis menor. Por otra parte, los dos anticuerpos produjeron aproximadamente la misma cantidad de liberación de IL6. En conclusión, la variante de menor afinidad 13676 inesperadamente presenta un perfil terapéutico más favorable, causando una reducción más prolongada de células B y manteniendo al mismo tiempo niveles similares de IL6.

15

20

25